

最終製品中に残存する遺伝子組換えウイルスの取扱いの検討（案）

1. 背景

- 遺伝子組換え生物の第二種使用においては、従来より、昆虫細胞—バキュロウイルス発現系を利用した有用タンパク質・試薬の生産が行われている。また、近年では、ヒト多能性幹細胞（ES/iPS 細胞）に組換えウイルスを用いて分化誘導させた神経細胞等が創薬研究用試薬等（経済産業省所管）として販売されるケースがある。
- このように組換えウイルスを利用して試薬等を生産する場合、最終製品中に当該ウイルスが残存している可能性が否定できないとして、製品全体をカルタヘナ法規制の対象とする法規制運用としている。
- このため、当該製品の使用にあたっては拡散防止措置を執ることが求められる他、研究開発であれば機関内承認・文部科学大臣の確認、生産においては主務大臣の確認が必要となる場合がある。この他、譲渡（販売）における表示や情報提供等の義務がかかる。
- 一方で、当該試薬の生産者、輸出入者、使用者等からは、これら残存組換えウイルスは増殖能や感染能が失われており、量も少量であるため、生物多様性等への影響がないと考えられることから、カルタヘナ法規制の対象外として法的扱いを整理することが求められている。
- 試薬は特に研究開発において施設内で用いられることから、生物多様性影響をもたらす恐れが基本的にはないと考えられるにも関わらずカルタヘナ法規制の対象とすることで、我が国の研究開発を阻害する要因の一つとなっている可能性があることも懸念される。
- 以上を踏まえ、改めて当該組換えウイルスが生物多様性等に及ぼすリスクを検証し、仮にリスクがない／無視できるものであれば、カルタヘナ法規制の対象外とする法的取り扱いを検討・整理し、有益な技術の活用による経済・産業の発展振興を図ることが重要と考えられる。

2. 参考・参照情報

- (1) 組換えバキュロウイルスを利用した試薬の取扱いについての過去の検討成果（別紙1）
（概要・ポイント）

- 当該試薬が実験室から不活化等されずに排水処理されたとのリスクシナリオに基づく分析も行った上で、組換えバキュロウイルスを用いて製造された試薬等による生物多様性影響の可能性は少ないものと考えられると評価。従って、これらの試薬を研究あるいは診断目的で使用する際には、通常の試薬と同様に取り扱って差し支えないものと考えられるとの結論。

- 本調査結果に基づき、産業構造審議会 DNA 技術小委員会（バイオ利用評価 WG の前身）で平成 23 年 6 月に審議。様々なご意見をいただき、再度審議することとなった（ただし、その後本件については審議されず）。
- (2) センダイウイルスベクターを使用してヒト多能性幹細胞（ES/iPS 細胞）から神経細胞等に分化誘導した細胞製品（創薬研究等用試薬）に係る照会

（概要・ポイント）

- ヒト多能性幹細胞（ES/iPS 細胞）から神経細胞や筋細胞等への分化誘導にセンダイウイルスベクターを使用。
 - 当該ウイルスベクターは、宿主細胞への侵入に関わる膜融合タンパク質を発現する遺伝子を別の遺伝子（分化誘導促進因子）に置換しており、感染後細胞内で感染性のあるウイルスを形成しない。また、分化誘導は 33 度の温度で行われ（2 日）、分化誘導後の細胞培養は 37 度で行われる（1 日程度）が、37 度の段階ではウイルスが不活化する（遺伝情報は維持されるものの、複製はしない）温度感受性変異が加えられている。37 度での培養後凍結保存され、譲渡（販売）される。
 - 以上のように、感染性のあるウイルスを形成せず、不活化されている（RNA が複製されず、mRNA の転写合成も起こらない）ことから、生物多様性影響は及ぼさないと考えられる。
 - 厚生労働省発出の遺伝子組換えウイルスの残存に関する考え方（以下、(3) 参照）に則れば、本件についてもカルタヘナ法規制の対象外と評価できるのではないかと事業者は主張。（注：ウイルスが異なること、ウイルスは PCR で検出されること、培養期間が短いこと等から同一には扱えないと考えられる。）
- (3) 厚生労働省「遺伝子導入細胞の製造に用いられた増殖性遺伝子組換えウイルスの残存に関する考え方について」（平成 25 年 12 月 16 日）（別紙 2）

（概要・ポイント）

- 対外（*ex vivo*）遺伝子治療で使用される遺伝子組換えウイルスについて、以下のいずれの要件も満たす場合は、遺伝子導入細胞に遺伝子組換えウイルスは残存していないものと整理。
- 1 遺伝子組換えウイルスについて
- ① レトロウイルス科ウイルス（ガンマレトロウイルス属、レンチウイルス属など）であること
 - ② 非増殖性のコンストラクトになっており、製造において増殖性ウイルス（以下「RCV」という。）が容易に出現しないようにデザインされた遺伝子改変がなされていること
 - ③ 製造された遺伝子組換えウイルスについて、RCV が検出限界以下であること
- 2 遺伝子導入細胞の製造方法について

以下のような方法により、細胞外液中の遺伝子組換えウイルスが適切に失活／希釈除去されていることが見込まれること。

- ・遺伝子導入以降に、当該ウイルスの感染能の半減期に比して十分に長く培養されること
- ・遺伝子導入工程以降で複数回の洗浄操作がなされていること

3 遺伝子導入細胞について

適切にバリデートされ、又は試験法の妥当性が広く支持されている検出系により、用いた遺伝子組換えウイルス及び RCV が検出限界以下であることを確認していること。なお、遺伝子導入細胞の複数ロット（ロットを形成しないものにおいては、個別に調製した由来の異なる複数の検体）において確認することが望ましい。

4 同一製品又は類似製品での知見について

同一製品又は同種のウイルスを用いて製造された類似製品について、海外臨床試験や国内遺伝子治療臨床研究等で臨床使用実績がある場合には、それらの試験等において遺伝子組換えウイルスの残存や顕在化を疑わせるような知見が得られていないこと

3. 今後の検討作業の進め方（案）

今後、以下のプロセスにより、調査、検討を行う。

なお、まずは、①以前から問題提起されている遺伝子組換えバキュロウイルスを使用した試薬の生産、②現在事業者より照会を受けている遺伝子組換えセンダイウイルスを使用し誘導した分化細胞試薬について整理、検討を行い、その上で後続案件がある場合の取扱い方針・要領を検討する。

（1） 要調査・情報収集事項

- 生産実態（組換えウイルスを活用した試薬等の生産、組換えウイルスの製品からの除去作業/最小限に留める措置等）
- 最終製品中の組換えウイルスの残存の実態
- 製品の利用実態
- 生物多様性影響に関する情報
- 諸外国における規制（文献、必要に応じ直接照会）

（2） 要検討事項

- 対象ウイルスの特定（ウイルスごとの特性を踏まえる必要があると考えられることから、基本的には個別に検討。なお、後続案件が出てきた際の検討要領も整理。）
- 生物多様性影響の考察・評価

- (規制対象外とする場合の) 条件設定の必要性、条件を設ける場合のその内容
 - ✓ 宿主・ベクター及び挿入遺伝子の限定
 - ✓ 生物学的封じ込め措置
 - ✓ 生産工程における当該ウイルス等の除去方法
 - ✓ 最終製品の使用用途 (試薬に限る等)
 - ✓ 経済産業省への事前照会・確認
 - ✓ その他の留意事項 (適切使用、廃棄、表示等)
- カルタヘナ議定書・カルタヘナ法解釈 (仮に法令改正が必要となる場合にはその案)
- 他分野 (医療・医薬品、研究開発分野等) への影響

(3) 検討プロセス

- 文献調査 (今年度委託調査)
- 実証試験 (必要な場合、来年度以降 NITE で実施する方向で調整中)
- ヒアリング (製造者/開発者/販売者、使用者、専門家・学識経験者 (ウイルス、生物多様性、カルタヘナ法・カルタヘナ議定書解釈等)、関係省庁・機関 等)
- (必要に応じ、) 専門家検討会の開催
- 取扱い方針についての関係省庁等との調整
- バイオ利用評価 WG での報告・審議
- (必要に応じ、) 一般の意見公募手続き (所謂パブリック・コメント手続き)
- 解釈通知の発出等 (検討成果次第)

(参考) 法解釈の整理 (案)

(1) カルタヘナ議定書・カルタヘナ法における「生物」の定義とウイルスの関係

- 生物学上ウイルス及びウイロイド¹は、自らが持つ機能のみでは増殖することができないなど生物の持つ基本的属性を満たさないため、生物学においては「生物」に分類されていない²。
- しかしカルタヘナ議定書では、遺伝子組換え技術により核酸を組み換えることができ、それらが増殖し生物の多様性を損なう恐れがある点では生物と変わらないことから、「『生きている生

¹ ウイルス及びウイロイド：核酸及びそれを包む蛋白質のみで構成される微小構造体 (ウイルス) 又は核酸のみからなる微小構造体 (ウイロイド) のこと

² なお、生物 (生命) の定義はさまざまあり、万人の認める説はないが、生物学的には、エネルギー転換 (代謝) を行い、自己増殖および自己保存の能力をもつものと定義するのが一般的。

(百科事典マイペディア (平凡社) 生物の定義抜粋。)

物』とは、不稔性の生物、ウイルス及びウイロイドを含む、**遺伝物質の伝達又は複製を行うことができる生物学的存在**」と、ウイルス及びウイロイドを「生物」に含める形で規定している。カルタヘナ法では、生物の定義について、カルタヘナ議定書に則して「この法律において『生物』とは、一の細胞（細胞群を構成しているものを除く。）又は細胞群であって **核酸を移転し又は複製する能力を有するものとして主務省令で定めるもの、ウイルス及びウイロイド** をいう。」と規定している。

→ 遺伝物質の伝達又は複製（拡散の移転又は複製）能力を持たないウイルスは、カルタヘナ法で規定する「生物」に該当するウイルスには該当しないと整理することができるか。

（2）カルタヘナ法の精神（リスク水準に応じた規制措置）

- カルタヘナ法産業二種省令では、リスク水準に基づき遺伝子組換え微生物を「GILSP」、「カテゴリー1」等に区分し、それぞれに応じた拡散防止措置を執ることを求めている。
- 特に GILSP については、「特殊な培養条件下以外では増殖が制限されること、病原性がないこと等のため **最小限の拡散防止措置を執ることにより使用等を行うことができるもの**」と定義している。この場合、仮に外部に放出・拡散される遺伝子組換え微生物があっても1種使用とはならず、法規制の対象から除かれていることになる。これは、GILSPレベルであれば、最小限の環境中への放出・拡散があっても生物多様性等に影響を及ぼさず、無視できると判断していることになると考えられる。
- 実際、GILSPの拡散防止措置では、カテゴリー1で求められている「外界との物理的分離」や「廃棄時の不活化」を求めておらず、廃棄において「**数を最小限にとどめる措置をとった後、廃棄すること**」とされている。これらは、完全な隔離・分離を求めておらず、最小限の放出・拡散が前提となっていると考えることができる。

→ 上記の考え方に基づけば、増殖能や感染能を失っている等生物多様性影響等が現実的に生じるリスクの低い遺伝子組換えウイルスについても、適切な措置を執った上で少量残存する可能性があるものまで厳格に規制する必要はないというのがカルタヘナ法の精神であると考えられるか。

／以上

資料4

組換えバキュロウイルスを利用した試薬等の取扱について

平成23年〇月〇日

経済産業省製造産業局生物化学産業課

事業環境整備室

I 背景

組換えバキュロウイルスを利用した試薬等は、技術的に同ウイルスを完全に除去することが困難であるため、製造者が販売もしくは譲渡する際にカルタヘナ法の対象になる可能性を考慮して、自主的に同法の対象物として扱っている。

一方、業界団体からは、試薬中に残存するバキュロウイルスが生物多様性に与える影響を科学的に評価し、その取扱を明確にすべきとの意見が寄せられている。

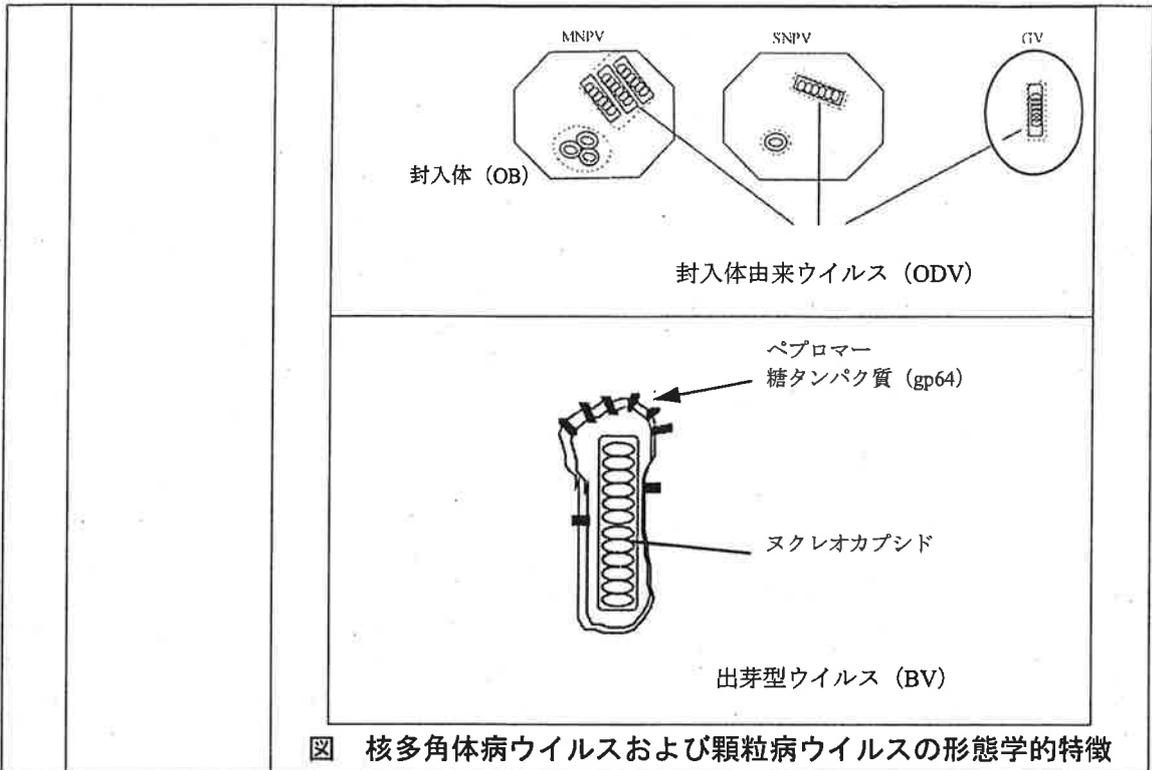
このため、有識者からなる検討会を設置し、同試薬等の我が国の生物多様性に与える影響を科学的な視点で検証した。

II 組換えバキュロウイルスを利用して製造した試薬等の概要

1 組換えバキュロウイルスの概要

(1)バキュロウイルスの基本情報

項目	内容		
1	(1) 一般名 バキュロウイルス (Baculovirus)		
	(2) 特徴 バキュロウイルスは節足動物を宿主とし、病原性を示すウイルスである。昆虫類に感染する約 1,100 種のウイルスのうち 60%以上がバキュロウイルスとされている。 バキュロウイルスは、核多角体病ウイルス (Nucleopolyhedrovirus : NPV) および顆粒病ウイルス (Granulovirus : GV) の 2 つに分類される。ゲノムは環状二本鎖 DNA で、そのサイズは 80 から 180 kb 程度であり、90 から 180 程度の遺伝子をコードする。また、長さは 230-385 nm で、直径 40-60 nm の棒状のヌクレオカプシドに含まれる。ウイルスの生活環において、ビリオンは封入体由来ウイルス (ODVs: Occlusion-Derived Virions) か出芽型ウイルス (BVs: Budded Virions) の形態を示す。 <table border="1" data-bbox="528 1798 1302 1892"><tr><td>科: バキュロウイルス</td></tr><tr><td>属: 核多角体病ウイルス (NPV) 顆粒病ウイルス (GV)</td></tr></table>	科: バキュロウイルス	属: 核多角体病ウイルス (NPV) 顆粒病ウイルス (GV)
科: バキュロウイルス			
属: 核多角体病ウイルス (NPV) 顆粒病ウイルス (GV)			



(3) 分類

バキュロウイルスの名称は、一般にバキュロウイルスが分離された宿主昆虫の名称と形成された封入体の種類で構成される。例えば、ヤガ科キンウワバ亜科の *Autographa californica* の多ヌクレオカプシド核多角体病ウイルスは、*Autographa californica* MNPV (Multiple Nuclear PolyhedroVirus)、略して AcMNPV と命名される (AcNPV と称されることが多い)。

国際ウイルス分類委員会(ICTV)は、バキュロウイルス科 (Baculoviridae) を、その宿主とウイルスの特徴から 4 つの属に分類している。

ICTVによるバキュロウイルス種の一覧

科: バキュロウイルス	
1. アルファバキュロウイルス属	鱗翅目NPVs
<i>Autographa californica</i> MNPV (基準種)	AcMNPV
<i>Adoxophyes honmai</i> NPV	AdhoNPV
<i>Agrotis ipsilon</i> MNPV	Agip NPV
<i>Anticarsia gemmatalis</i> MNPV	AgMNPV
<i>Bombyx mori</i> NPV	BmNPV
<i>Buzura suppressaria</i> NPV	BuzuNPV
<i>Choristoneura fumiferana</i> DEF MNPV	CfDefNPV
<i>Choristoneura fumiferana</i> MNPV	CfMNPV
<i>Choristoneura rosaceana</i> NPV	ChroNPV
<i>Ectropis obliqua</i> NPV	EcobMNPV
<i>Epiphyas postvittana</i> NPV	EppoNPV
<i>Helicoverpa armigera</i> NPV	HearNPV
<i>Helicoverpa zea</i> SNPV	HzSNPV
<i>Lymantria dispar</i> MNPV	LdMNPV
<i>Mamestra brassicae</i> MNPV	MbMNPV
<i>Mamestra configurata</i> MNPV A	MacoNPV-A
<i>Mamestra configurata</i> MNPV B	MacoNPV-B
<i>Orgyia pseudotsugata</i> MNPV	OpMNPV
<i>Rachiplusia ou</i> MNPV	RoMNPV
<i>Spodoptera exigua</i> MNPV	SeMNPV
<i>Spodoptera frugiperda</i> MNPV	SfMNPV
<i>Spodoptera littoralis</i> NPV	
<i>Spodoptera litura</i> NPV	SpltNPV
<i>Thysanoplusia orichalcea</i> NPV	

	<i>Trichoplusia ni</i> SNPV	TnSNPV
	<i>Wiseana signata</i> NPV	WisiNPV
	2. ベータバキュロウイルス属	鱗翅目GVs
	<i>Cydia pomonella</i> GV (基準種)	CpGV
	<i>Adoxophyes orana</i> GV	AdorGV
	<i>Artogeia rapae</i> GV	ArGV
	<i>Choristoneura fumiferana</i> GV	ChfuGV
	<i>Cryptophlebia leucotreta</i> GV	CrIeGV
	<i>Harrisina brillians</i> GV	HabrGV
	<i>Helicoverpa armigera</i> GV	HearGV
	<i>Lacanobia oleracea</i> GV	LaolGV
	<i>Phthorimaea operculella</i> GV	PhopGV
	<i>Plodia interpunctella</i> GV	PiGV
	<i>Plutella xylostella</i> GV	PlxyGV
	<i>Pseudaletia unipuncta</i> GV	PsunGV
	<i>Trichoplusia ni</i> GV	TnGV
	<i>Xestia c-nigrum</i> GV	XecnGV
	3. ガンマバキュロウイルス属	膜翅目NPVs
	<i>Neodiprion lecontei</i> NPV (基準種)	NeleNPV
	<i>Neodiprion sertifer</i> NPV	NeseNPV
	4. デルタバキュロウイルス属	双翅目NPVs
	<i>Culex nigripalpus</i> NPV (基準種)	CuniNPV

(4) 宿主域

①核多角体病ウイルス (NPV)

NPV は、7つの昆虫目に属する 400 以上の節足動物種、特に鱗翅目、双翅目、膜翅目を宿主とする。一般的に NPV の宿主域は、NPV が元々分離された宿主の属または科の一つの種または数種に限定されている。宿主域が比較的広いものは、(i) 鱗翅目の約 10 の科に属する 30 種余りに感染する AcMNPV、(ii) 鱗翅目の 10 科、31 種以上に感染する *Anagrapha falcifera* NPV、および(iii) 鱗翅目の異なる 4 科、32 種に感染する *Mamestra brassicae* MNPV である。

AcMNPV に感染する鱗翅目の一覧

科	種名	日本に存在
Arctiidae(ヒトリガ科)	<i>Hyphantria cunea</i>	○
Crambidae(ツトガ科)	<i>Hellula undalis</i>	○
Gelechiidae(キバガ垂科)	<i>Phthorimaea operculella</i>	○
Geometridae(シャクガ科)	<i>Alsophila pometaria</i>	
	(<i>Boarmia selenaria</i>)	
	<i>Buzura suppressaria</i>	
	<i>Ennomos subsignarius</i>	
Lasiocampidae(カレハガ科)	<i>Malacosoma americanum</i>	
Lymantriidae(ドクガ科)	<i>Lymantria dispar</i>	○
	<i>Euproctis latifascia</i>	
	<i>Lymantria albulunata</i>	
Noctuidae(ヤガ科)	<i>Helicoverpa armigera</i>	○
	<i>Mamestra brassicae</i>	○
	<i>Prodenia litura</i>	○
	<i>Spodoptera exigua</i>	○
	<i>Trichoplusia ni</i>	○
	<i>Autographa californica</i>	
	<i>Ceramica picta</i>	
	<i>Helicoverpa zea</i>	
	<i>Heliothis armigera</i>	
	<i>Heliothis peltigera</i>	
	<i>Sesamia cretica</i>	
	<i>Spodoptera frugiperda</i>	
	(<i>Spodoptera littoralis</i>)	

		<i>Xylena curvimacula</i>	
		Pieridae(シロチョウ科)	<i>Artogeia rapat</i>
		Plutellidae(コナガ科)	<i>Plutella xylostella</i> ○
		Pyralidae(メイガ科)	<i>Ephestia cautella</i> ○
			<i>Galleria mellonella</i> ○
		Saturniidae(ヤマモユガ科)	<i>Anisota senatoria</i>
		Thaumetopoeidae (ギョウレツケムシガ科)	<i>Thaumetopoea processionea</i>
		Tortricidae(ハマキガ科)	<i>Cydia Leucostoma</i> ○
			<i>Choristoneura fumiferana</i> ○
		<p>②顆粒病ウイルス (GV)</p> <p>GV は 100 以上の鱗翅目の昆虫種に感染する。</p>	
	(5) 節足動物以外への影響	バキュロウイルスは、節足動物の病原菌であり、その宿主域は、節足動物に限られており、植物や脊椎動物に対する感染性はないとされている。	
2	(1) バキュロウイルスの利用	<p>①組換えバキュロウイルスを利用して生産する試薬等</p> <p>バキュロウイルスを利用したタンパク質の受託生産や試薬等の生産が行われており、AcMNPV、BmNPV が主に活用されている。</p> <p>なお、これらの生産に用いられるウイルスは、ポリヒドリン（多核体タンパク質）遺伝子を、目的とするタンパク質をコードする遺伝子に置換した組換えウイルスであるため、封入体を形成しない。</p>	
	(2) 製品等開発・利用状況	<p>①各種キットや試薬に含まれる組換えタンパク質</p> <p>組換えバキュロウイルスを利用して製造した試薬等は、数百品目販売されている（メーカー聞き取り）。</p>	
3	(1) バキュロウイルスの感染性	感染の自然経路は、幼虫によるウイルス封入体の経口摂取である。中腸のアルカリ性環境(pH > 9.5)において、封入体は速やかに溶解し、封入体由来ウイルス(ODVs)が放出され、感染する。	

<p>(2) バキュロウイルスの伝搬経路</p>	<p>①ウイルスの物理的伝播 風または水は、バキュロウイルスの主な伝播経路とはなっていない。</p> <p>②疾病幼虫、捕食動物、寄生虫による媒介分散 ウイルス感染した幼虫は、死亡後であっても感染原となる。また、ウイルス粒子は、感染後期段階に排泄物または吐き戻しのいずれかにより環境中に放出される。感染した幼虫の共食いも、相当頻度で生じる場合は、感染源になる可能性がある。また、捕食動物が疾病幼虫を捕食することによって、または寄生虫が幼虫に産卵し幼虫内で生育することによっても感染する。</p>
<p>(3) 不活化・除去方法</p>	<p>①加熱による不活化 バキュロウイルスは、一般的な微生物学的殺菌条件（温度（55℃～60℃））で不活性化される。</p> <p>②薬品による不活化 バキュロウイルスは、次亜塩素酸ナトリウムとホルムアルデヒドにより不活化ができる。ドデシル硫酸ナトリウムを用いて卵表面を殺菌し、垂直伝染を防止する試験も実施され、不活化には十分に有効であることが報告されている。</p> <p>③製品からのウイルス除去 組換えバキュロウイルスを利用して生成されたタンパク質等からのウイルス除去方法としては、遠心分離、カラムクロマトグラフィー処理、フィルトレーション等がある。しかし、いずれの方法でも完全にウイルスを除去することは出来ない。 試薬メーカーの社内試験では、フィルトレーションにより、ウイルス由来の DNA が PCR でほぼ検出限界以下にまで除去できることが報告されている。</p>
<p>(4) 分離・検査方法</p>	<p>①環境中でのバキュロウイルス検出方法 バキュロウイルスの検出は、罹患または死亡した幼虫を回収し、染色したバキュロウイルスを顕微鏡観察することによって行われる。</p> <p>②製品中のバキュロウイルス検出方法</p>

		<p>製品中のバキュロウイルス検出方法として、以下のような方法がある。</p> <p>a. プラークアッセイ</p> <p>b. 限界希釈ドットプロットハイブリダイゼーション</p> <p>c. PCR</p>
--	--	---

(2) 組換えバキュロウイルスを用いたタンパク質生産の特色

昆虫細胞やカイコと組換えバキュロウイルスを組み合わせたタンパク質生産は、以下の特色がある。

- ①天然の生物学的活性と構造を有したタンパク質を比較的簡単に短時間で大量生産が出来る
- ②植物、脊椎動物に感染しないため、作業者の健康に対する安全性が確保しやすい
- ③複数のウイルスを感染させることにより、異なるタンパク質を同時に生産できる

(3) 国内カルタヘナ法への対応状況

①組換えバキュロウイルスを使用して生産した試薬等の生産形態

組換えバキュロウイルスの利用形態は、昆虫培養細胞やカイコを用いたタンパク質の(i)受託生産と(ii)試薬等の生産が主なものである。

②国内カルタヘナ法への対応状況

試薬等の販売に当たっては、国内カルタヘナ法の第二種利用に相当する旨の注意書きを付けて各社がユーザーに販売している（別添参照）。

III 組換えバキュロウイルスを利用して製造した試薬の生物多様性影響の可能性

試薬製造に用いられているバキュロウイルスは、ポリヒドリン(多核体タンパク質)遺伝子を目的とするタンパク質をコードする遺伝子に組み換えたAcMNPVが主なものである。このため、同ウイルスは封入体を形成せず、宿主昆虫の幼虫に対して経口感染しない。また、同ウイルスは紫外線により環境中で速やかに不活化されることも報告されている。

このため、同ウイルスが我が国生物多様性に悪影響を与えるリスクは極めて小さいと考える。

また、組換えバキュロウイルスを使用して製造した試薬等が環境中に放出される以下のシナリオを設定し、同試薬の生物多様性影響の可能性も検証した。

1 シナリオの概要

組換えバキュロウイルスを使用して製造した試薬等は、企業の研究所、大学等の研究機関、医薬品開発に関わる病院等で実験用試薬として使用されている。小型の試薬ビン等に入れて販売されることが多く、多品種・少量販売である。1回の実験で用いられる試薬の量も微量である。

シナリオとしては、試薬が実験室内の流しに廃棄され、排水中に混入して下水道に流入する下図のような経路を設定した。



実験室からの流出経路

2 シナリオの各工程におけるバキュロウイルスの濃度

(a) 実験室での廃棄

○試薬中のバキュロウイルスの残存量

組換えバキュロウイルスを利用して製造された試薬には、粗精製（膜分画）の段階で最大 10^7 個/ml 程度のウイルス粒子が含まれるとされている（試薬メーカー等からの聞き取り）。ただし、カラムクロマトグラフィー等により、タンパク質の精製度が上がると、残存するバキュロウイルスの濃度はさらに低下する。

通常使用では、粗精製の試薬を使用する場合でも原液を希釈して用いるため、試料中のウイルス粒子は 10^{3-4} 個/ml 程度と考えられる。しかし、このシナリオでは、試薬の原液がそのまま廃棄されたと仮定し、バキュロウイルス濃度を 10^7 個/ml に設定して、以降のシナリオの検討を進める。

試薬中の残存濃度：バキュロウイルスの濃度 10^7 個/ml

○バキュロウイルスを含む試薬の取り扱い（廃棄）量

実験室で取り扱われる試薬は一般に極少量で、一回の実験では使用量が数 ml 程度のことが多い。シナリオでは、安全を見込んで通常実験の最大取扱量である 1 リットル* の原液がそのまま流しに廃棄されたと仮定する。

*現在市販されている試薬としては、包装単位が 1 ml で、タンパク質の含量が 100 µg/ml 以下のものが最も多い。

(b) 実験施設における実験排水処理

○実験排水処理の工程

実験室の流しに廃棄された排水は、直接下水に放流される前に排水基準に適合させるための前処理が行われる。前処理は、①流しからの実験系排水やその他の排水を集めて除害施設で処理した後、下水に放流する方式や②病院等行われている排水に対して殺菌処理を行う方式など様々である。

一般的には、排水の pH をモニターし、pH が酸性又はアルカリ性の場合、薬剤により中和する方式が多い。

シナリオでは、排水に対して中和処理のみが行われるケースを想定する。この場合、原液中のバキュロウイルスの濃度は変わらないものとする。

実験排水処理後：バキュロウイルスの濃度 10^7 個/ml

(c) 下水処理場への流入工程

○下水処理場の処理方式と施設規模

我が国には約 2,000 箇所（平成 19 年度末）の下水処理場があり、処理方式別にみた処理場数は、表 1 の通りである。下水処理場では、①一次処理として物理的・機械的な方法により下水から固形物（汚泥）の除去が行われ、②二次処理として微生物によって下水中に含まれる有機物と浮遊固形物の除去が行われる。一般的な二次処理法は、活性汚泥法を中心とする好気性生物処理法である。

なお、一次処理で集められた固形物は焼却処理されるため、このシナリオでは検討しない。

表 1 日本の下水処理施設数（平成 19 年度末現在）

処理方式	計画晴天時日最大処理水量 (千m ³ /日)						計													
	5未満	5~10	10 ~50	50 ~100	100 ~500	500以上														
一次	沈	殿	法	1		1	2													
二次処理	嫌	気	無	酸	素	好	気	法	1	3	6	5	9	1	25					
	循	環	式	硝	化	脱	窒	法	3	3	8		4		18					
	硝	化	内	生	脱	窒	法	1		1					2					
	ス	テ	ッ	プ	流	入	式	多	段	硝	化	脱	窒	法	1	1	6	3	6	17
	嫌	気	好	気	活	性	汚	泥	法	12		6	3	10		31				
	標	準	活	性	汚	泥	法	46	51	331	117	130	12	687						
	長	時	間	エ	ア	レ	ー	シ	ョ	ン	法	37	6	2		45				
	酸	素	活	性	汚	泥	法	1	2	3	2	2		10						
	モ	デ	ィ	フ	ァ	ィ	ド	・	エ	ア	レ	ー	シ	ョ	ン	法				0
	ス	テ	ッ	プ	エ	ア	レ	ー	シ	ョ	ン	法		1	2	2	5			
	回	分	式	活	性	汚	泥	法	61	8	2				71					
	好	気	性	ろ	床	法	22	6						28						
	嫌	気	好	気	ろ	床	法	41	2					43						
	標	準	散	水	ろ	床	法					1		1						
	高	速	散	水	ろ	床	法		1	3				4						
	接	触	酸	化	法	10		1						11						
	回	転	生	物	接	触	法	9	4	3	1			17						
	土	境	被	覆	型	理	間	接	触	法	30				30					
高	度	処	理	オ	キ	シ	テ	ー	シ	ョ	ン	テ	ィ	ウ	チ	法	48	10		58
オ	キ	シ	デ	ー	シ	ョ	ン	デ	ィ	ウ	チ	法	780	96	33		909			
そ	の	他												36	11	18	5	15	85	
計														1,140	204	425	139	178	13	2,099
高	度	処	理	99	28	63	29	84	8	311										

- 注) 1. 複数の処理方式を用いている処理場は、年間処理水量の最も多い処理方式を当該処理場の主な処理方式とした。
 2. 処理方式のうち沈澱法は、二次処理方式を持たず沈澱法のみの場合とした。
 3. 処理方式を「その他」とした処理場のうち、その具体内容から他の処理方式に分類可能なものは、該当する処理方式で処理場数を計上した。
 4. 休止中の処理場（4箇所）を除く。
 5. 高度処理は、処理場の処理方式（複数の処理方式および有機物添加などを含む）を高度処理に位置付けている処理場の数とした。

水処理施設を有する 2,099 処理場の内訳

公共下水道	1,061
特定環境保全公共下水道	854
特定公共下水道	9
流域下水道	175

出典：『平成 22 年度版 下水道年鑑』 水道産業新聞社

○下水道処理場への流入時におけるバキュロウイルスの希釈率

下水処理場は、1日の水処理量が5,000立方メートル未満の小規模の施設から50万立方メートル以上の大規模なものまで様々である。シナリオでは、安全を見込んで比較的小規模の処理場に実験排水が流入したと仮定する。

具体的には、1リットルの原液が1日処理量1,000立方メートルの下水処理施設に流入したとする。この場合、原液は10⁶倍に希釈され、バキュロウイルスの濃度は10個/mlとなる。

下水処理施設流入時：バキュロウイルスの濃度 10 個/ml

(d) 下水処理場での水処理工程

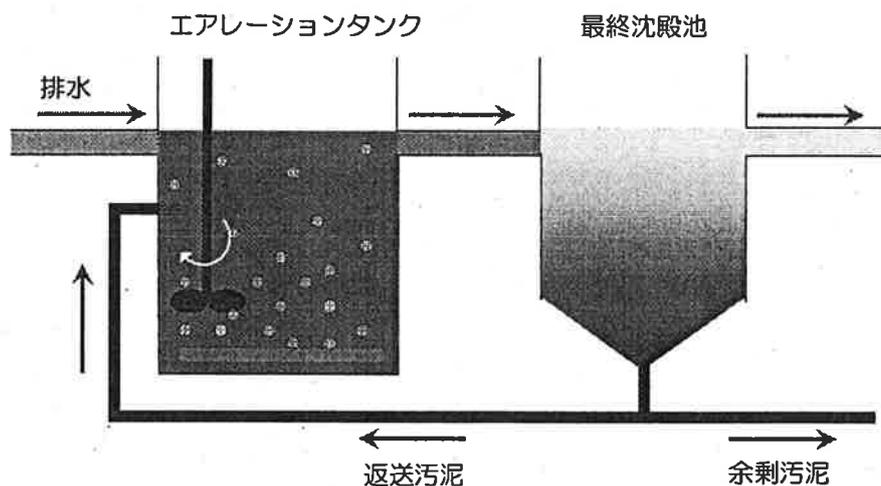
○下水処理場における二次処理は一般的に「活性汚泥法」が採用されており、シナリオでは「活性汚泥法」におけるバキュロウイルスの挙動について検証する。

(参考)「活性汚泥法」

活性汚泥法の処理施設は、下水中の有機物を活性汚泥により酸化分解するための曝気槽(エアレーションタンク)と、活性汚泥を重力分離するための沈殿池から構成される。

曝気槽では、浮遊固形物の吸着と溶存有機物の微生物体内への吸収により、下水中の有機物が活性汚泥中に取り込まれる。そして、曝気によって供給される溶存酸素を利用して、取り込んだ有機物の酸化と微生物の増殖が起きる。増殖した細菌などは自己酸化するとともに原生動物等によって捕食される。

活性汚泥は、最終沈殿池における重力沈降によって処理水と分離され、処理水は、適切な処理をした後に再利用されるか、塩素などで処理した後に放流される。



活性汚泥法の概念図

○活性汚泥法によるバキュロウイルスの減衰

活性汚泥法におけるバキュロウイルスの除去率についてのデータはない。クリプトスポリジウムについては、活性汚泥法で処理する場合、約 99%の除去率が得られるとの報告がある¹。また、環境で生残率の高いとされるノロウイルスでは、下水処理により 99~99.9%以上の除去率が得られるとの報告がある²。

シナリオでは安全を見込み活性汚泥法による除去率を 90%と仮定する。

¹ 環境中に排出される病原性微生物の制御と管理 鈴木穰、諏訪守、モダンメディア 2006年 11月号

² 下水処理場におけるノロウイルスの制御 諏訪守ほか、資源環境対策 2010年 8月号

この場合、流入した下水のウイルス濃度 (10 個/ml) は、1 個/ml となる。

標準活性汚泥法処理後：バキュロウイルスの濃度 1 個/ml

(e) 塩素消毒、オゾン処理によるウイルスの除去

○塩素消毒、オゾン処理によるウイルスの除去率

活性汚泥法の後工程には塩素消毒工程が行われることが多い。また、近年は塩素消毒処理に代えてオゾン処理も行われるようになってきており、全国で約 60 箇所でおゾン処理工程が導入されている。

研究結果によれば塩素消毒やオゾン処理によりロタウイルスを除き他のウイルスはほぼ 100% 除去される (表 2、表 3)。

表 2 塩素による微生物の不活化

微生物種	実験水	残留塩素 (mg・ℓ)	温度 (°C)	pH	接触時間 (min.)	不活化率 (%)	濃度時間積 (mg・min/ℓ)	参考文献
ウイルス								
Parvo-H-1	PBS	0.2	20	7.0	6	99.9	0.53	Churn et al.(1984)
Parvo-H-1	PBS	0.2	10	7.0	11	99.9	0.85	Berman and Hoff et al.(1984).
SA11,disp-	BDF	ca. 0.5	5	10	1.1-1.65	99	0.63	Raphael et al.(1987)
SA11,cell-ass	BDF	ca. 0.5	5	10	2.4-4.4	99	1.8	Joret.J.C. et al.(1982)
Rota,Wa	Treated	0.75	22	8.3-8.6	60	94.3	ND	Harekar and Butler et al.(1984)
Human rota-	effluent	1.1	15	7.2	15	40	>15	Vaughn et al.(1986)
Human rota-	effluent	2.2	15	7.2	10	60	>15	Grabow et al.(1983)
Rota,SA11	BDF	0.1	4	8.0	0.5	99.9	0.03	Sobsey et al.(1988)
Rota,Wa	BDF	0.1	4	8.0	0.65	99.9	0.03	"
Rota,SA11	BDF	0.4-0.28	25	10.0	1.1	99.99	ca. 4.0	"
Hepatitis A	BDF	0.42-0.06	25	6	0.7	99.99	ca. 3.0	"
Hepatitis A	BDF	0.4-0.28	25	10	2.5	99.99	ca. 5.5	"
Hepatitis A	BDF	0.5	5	6.0	6.5	99.99	ca. 1.8	"
Hepatitis A	BDF	0.5	5	10.0	49.6	99.99	ca. 12.3	"
Coliphage MS2	BDF	0.5	5	6.0	1.2	99.99	ca. 0.25	"
Coliphage MS2	BDF	0.5	5	10.0	26.5	99.99	ca. 6.9	"

注)BDF: O₂要求量のない緩衝液、DW:蒸留水、effluent: 下水処理水

(出典 : Sobsey M. D. 1989 Inactivation of health-related microorganisms in water by disinfection process, Wat. Sci. Tec. Vol.21, No.3, 179-195)

表3 オゾンによる微生物の不活化

微生物種	実験水	残留オゾン (mg/l)	水温 (°C)	pH	接触時間 (min.)	不活化率 (%)	濃度時間積 (mg·min/l)	参考文献
ウイルス								
poliovirus 1	BDF	0.15-0.2	5	7.2	0.4-1.5	99	0.2	Roy et al.(1982)
poliovirus 2	BDF	0.15	25	7.2	4.83	99	0.72	"
poliovirus 1	effl.	0.29-0.36	24	7.4	0.6	99.5	ND	Farooq and Akhlaque(1983)
poliovirus 1	effl.+HCO ₃	0.2	20	7.0	10-15	97		Harakeh and Butler(1985)
poliovirus 1	effl.	0.2	20	7.0	10-15	80		"
rotavirus SA11	BDF	0.1-0.3	4	6.0-8.0	0.12-0.19	99	0.019-0.064	Vaughn et al.(1987)
human rota virus	BDF	0.05-0.3	4	6.0-8.0	0.12-0.19	99	0.006-0.036	"
rotavirus SA11	effl.	0.26	15	7.2	15	96	ND	Harakeh and Butler(1985)
human rota	effl.	0.26	15	7.2	15	40	ND	"
human rota	effl.	0.4	15	7.2	15	99.99	ND	"

注)BDF:O₂要求量のない緩衝液、DW:蒸留水、effl.:下水処理水

(出典: Sobsey M. D. 1989 Inactivation of health-related microorganisms in water by disinfection process, Wat. Sci. Tec. Vol.21, No.3, 179-195)

○塩素消毒によるウイルスの除去

シナリオでは、安全を見込み塩素消毒処理によりウイルスが90%除去されたと仮定する。この場合、バキュロウイルスの濃度は、10⁻¹個/mlとなる。

塩素消毒処理後: バキュロウイルスの濃度 10⁻¹ 個/ml

(f) シナリオにおけるバキュロウイルスの昆虫への感染の可能性

以上のシナリオによれば、実験室から廃液として捨てられた試薬中のバキュロウイルス濃度は、下水処理の過程を経て、10⁻¹個/mlまで減衰した上で、下水施設外に放出されると考えられる。

BmNPV の感染性に関する実験によれば、多核体フリーウイルス原液（約 10^{10} 個/ml 含有）を希釈してポリオキシンとともにカイコに経口投与した時の発病率は表 4 の通りとなっている³。

表 4 BmNPV 多角体フリーウイルスのポリオキシシンを用いた経口摂取による感染性

接種濃度 (個/ml) (ウイルス液の希釈度)	発病率 (%) [*]
	経口接種
1 (10^{-10})	0.0
10 (10^{-9})	0.0
10^2 (10^{-8})	0.0
10^3 (10^{-7})	5.0
10^4 (10^{-6})	10.0
10^5 (10^{-5})	5.0
10^6 (10^{-4})	20.0
10^7 (10^{-3})	40.0
10^8 (10^{-2})	65.0
10^9 (10^{-1})	70.0

※1区10頭2連制とし、4齢期蚕に接種。

(注：この実験では、BmNPV に罹患したカイコの体液から多角体を除去した上清成分を無菌ろ過したものを多角体フリーウイルス液として用いている。この条件では、約 10^{10} 個/ml のウイルスがウイルス液に含まれていると考えられる。)

ポリオキシンはキチン合成阻害剤であり、ポリオキシシンを同時投与することにより中腸の囲食膜に損傷が起こり、ウイルスの体内への侵入が起こりやすくなると考えられる。多核体フリーのウイルスは、通常の条件では経口感染が起こらないことが知られているが、ポリオキシシンを同時投与した条件でもウイルス濃度が 10^2 個/ml 以下では感染が認められなかった。

従って、下水処理を経て放流されるバキュロウイルスの濃度である 10^{-1} 個/ml は、昆虫が経口感染するレベルを十分下回っていると考えられる。

³ 「昆虫工場」プラント内のホルマリンを使用しないウイルス不活化方法 西宮智美ほか
茨城県農業総合センター園芸研究所研究報告 第13号 49-58 2005

IV 組換えバキュロウイルスを用いて製造された試薬等のあり方について

1 組換えバキュロウイルスを用いて製造された試薬等による生物多様性影響の可能性

(1) 試薬製造に用いられているバキュロウイルスは、ポリヒドリン（多核体タンパク質）遺伝子を目的とするタンパク質をコードする遺伝子に組み換えた AcMNPV が主なものである。このため、同ウイルスは封入体を形成せず、宿主昆虫の幼虫に対して経口感染しない。また、同ウイルスは紫外線により環境中で速やかに不活化されることも報告されている。

このため、同ウイルスが我が国生物多様性に悪影響を与えるリスクは極めて小さいと考える。

(2) シナリオに基づく生物多様性影響評価

組換えバキュロウイルスを使用して製造した試薬等の環境放出シナリオに基づけば、試薬中の同ウイルスが実験室から排出されたとしても昆虫への経口感染リスクは小さいと考える。

(3) バキュロウイルスの宿主域

・AcMNPV は、チョウ目（鱗翅目）の約 10 の科に属する 30 以上の種（表 5）に感染することが報告されているが、ヒトやその他の脊椎動物、植物には感染しない。

表 5 日本において AcMNPV に感染するチョウ目の一覧

名称	分類	生息地	寄主植物
ジャガイモキバガ	キバガ亜科		ジャガイモ
コナガ	コナガ科	日本全体	各種アブラナ科植物
ハイマダラノメイガ	ツトガ科	北海道、本州、四国、九州、 沖縄	ダイコン、ハクサ、アラセイトウなど
マイマイガ	ドクガ科	本州、四国、九州（日本亜種）	クヌギ、カシワ、アラカシなど
ミナミツマジロヒメハマキ	ハマキガ科	琉球列島	サザンカ、チャノキ、イジュ
○アメリカシロヒトリ	ヒトリガ科	本州、四国、九州（外来種）	樹木類（プラタナス、ソメイヨシノ、リンゴなど）
スジマダラメイガ	メイガ科	日本全体	貯蔵穀類、乾燥商品
ハチノスツヅリガ	メイガ科	本州、四国、九州、沖縄	ミツバチの巣、毛皮、羊毛
イラクサギンウワバ	ヤガ科	日本全体	キャベツ、チシャ、キクなど

オオタバコガ		日本全体	トウモロコシ、ナス、トマト
シロイチモジヨトウ		日本全体	ネギ、テンサイ、エンドウなど
ハスモンヨトウ		日本全体	ナス、ジャガイモ、トマト
ヨトウガ		北海道、本州、四国、九州、 対馬	トウモロコシ、ジャガイモ、タバコ

注) ○は外来種

(出典：名称、分類、生息地、寄主植物の情報は、「日本の鱗翅類一系統と多様性」駒井古実ほか編、東海大学出版会による)

- ・ BmNPV はカイコにのみに感染する。

遺伝子導入細胞の製造に用いられた非増殖性遺伝子組換えウイルスの残存に関する考え方について

平成 25 年 12 月 16 日

遺伝子治療においては、疾病の治療等を目的として、生体内から細胞や組織を取り出し、それらに体外 (*ex vivo*) で遺伝子組換えウイルスにより遺伝子導入を施して患者に投与する、いわゆる *ex vivo* 遺伝子治療がある。この場合、ヒトの細胞や組織そのものは、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（以下「カルタヘナ法」という。）第2条に規定する生物には該当しないが、遺伝子導入に利用する遺伝子組換えウイルスは、通常、同条に規定される生物に該当する。したがって、治験等の実施に際して、製造された遺伝子導入細胞に当該ウイルスが残存している場合には、カルタヘナ法に基づく第一種使用等に係る主務大臣の承認を受ける必要があるが、残存に関する考え方については明確にされていなかった。

上記を踏まえ、以下に掲げるいずれの要件も満たす場合は、当該遺伝子導入細胞に遺伝子組換えウイルスは残存していないものとする。

1 遺伝子組換えウイルスについて

- ① レトロウイルス科ウイルス（ガンマレトロウイルス属、レンチウイルス属など）であること
- ② 非増殖性のコンストラクトになっており、製造において増殖性ウイルス（以下「RCV」という。）が容易に出現しないようにデザインされた遺伝子改変がなされていること
- ③ 製造された遺伝子組換えウイルスについて、RCV が検出限界以下であること

2 遺伝子導入細胞の製造方法について

以下のような方法により、細胞外液中の遺伝子組換えウイルスが適切に失活／希釈除去されていることが見込まれること。

- ・ 遺伝子導入以降に、当該ウイルスの感染能の半減期に比して十分に長く培養されること
- ・ 遺伝子導入工程以降で複数回の洗浄操作がなされていること

3 遺伝子導入細胞について

適切にバリデートされ、又は試験法の妥当性が広く支持されている検出系に

より、用いた遺伝子組換えウイルス及び RCV が検出限界以下であることを確認していること。なお、遺伝子導入細胞の複数ロット（ロットを形成しないものにおいては、個別に調製した由来の異なる複数の検体）において確認することが望ましい。

4 同一製品又は類似製品での知見について

同一製品又は同種のウイルスを用いて製造された類似製品について、海外臨床試験や国内遺伝子治療臨床研究等で臨床使用実績がある場合には、それらの試験等において遺伝子組換えウイルスの残存や顕在化を疑わせるような知見が得られていないこと。

【補足説明】

本考え方は、増殖性又は制限増殖性の遺伝子組換えウイルスには適用されない。また、レトロウイルス科ウイルス以外の遺伝子組換えウイルスを用いた遺伝子導入細胞について適用すべき要件は、改めて検討が必要である。なお、遺伝子導入細胞の中に移入され、又はその染色体 DNA に組み込まれた遺伝子組換えウイルス由来の核酸は、カルタヘナ法の対象にはならない。

1の①について

基本骨格はレトロウイルス科ウイルスであるが、ヒト細胞に感染可能とするために、エンベロープタンパク質がレトロウイルス等に由来しない遺伝子組換えウイルスが作製されることもある（水疱性口内炎ウイルスエンベロープ（VSV-G）の使用など）。これらについては、天然のレトロウイルス科ウイルスと物理的・化学的処理に対する感受性が同等であれば、レトロウイルス等として本整理の範囲内と考えて差し支えない。

1の②について

「RCV が容易に出現しないようにデザインされた」とは、例えば、遺伝子組換えレンチウイルスの製造においては、*gag-pol*、*env* 等のウイルス遺伝子及び導入遺伝子が4種又はそれ以上（遺伝子組換えマウス白血病レトロウイルスを製造する場合には3種又はそれ以上）の独立したプラスミド等に分割されて導入されたパッケージング細胞を用いることなどが考えられる。また、自己不活性化型（self inactivating; SIN）の構造にすることによって、RCVに関する安全性をより高めることができる。

1の③について

一律に限度値を設定することは困難であるが、当該遺伝子組換えウイルスの元となったウイルスに感受性の高い細胞を用いた感染性試験を実施し、検出されないことを確認することなどが考えられる。また、濃度既知の増殖性ウイルスを用いて検出限界等を確認することができる。

2について

適切な失活／希釈除去の基準を一律に示すことは困難であるものの、使用する遺伝子組換えウイルス量と、培養期間から推測される減衰値及び製造工程から推測される希釈率の積を用いることなどにより、感染能の低減化に係る適切性を説明することが考えられる。また、製造工程において、当該ウイルスを不活化するような効果が知られている試薬等が使われている場合には、その影響も考慮に入れることができる。なお、37℃で培養した場合のレトロウイルスベクター及びレンチウイルスベクターの感染能の半減期については、文献による報告がある（F. Higashikawa and L.J. Chang (2001) *Virology*, **280**, 124-131, S.T. Andreadis, et

al. (1997) *J. Virol.*, **71**, 7541-7548 等)。

3について

非増殖性のウイルスについては、細胞に感染させても増幅は見込めないことに留意する必要がある。

試験法としては、遺伝子導入細胞の培養液上清を用いて、感受性のある指標細胞を用いた感染性試験を行い、指標細胞における逆転写産物、プロウイルス、又は導入遺伝子からの産物が検出されないことを確認することなどが考えられる。この際、濃度既知のウイルス溶液を添加する検討を行うことにより、検出限界等を確認することができる。感度向上を図るため、必要に応じて遺伝子導入補助剤の使用を考慮することなども考えられる。検出法として核酸増幅検査を用いる場合には、適切に精度管理を行う必要がある。

また、感染性試験以外の方法として、ウイルスメノム量を適切なプライマーを用いた核酸増幅検査により直接測定することも考えられるが、遺伝子組換えウイルスの感染性粒子数とウイルスメノム量が必ずしも一致しないこと、プロウイルスの影響等があること等に留意する必要がある。