

アフィニティ精製を経ていないバキュロウイルス生産系試薬における
残存遺伝子組換えバキュロウイルスのカルタヘナ法上の取扱い整理に向けた検証作業
(進捗報告)

独立行政法人製品評価技術基盤機構
バイオテクノロジーセンター生物多様性支援課

1. 背景

- 前回の評価 WG において、バキュロウイルス生産系を用いて生産された試薬のうち、適切なアフィニティ精製を経ているものについては生産に使用した遺伝子組換えバキュロウイルスが製品試薬中に残存していないと判断できる旨整理したが、膜タンパクの場合はタンパク質精製時にウイルス粒子を取り除く工程を含めるよう追加の要件を課したところ。
- 他方、遺伝子組換えバキュロウイルスは、自然環境において生残するために必要な、また経口感染に必要と考えられるポリヘドリンタンパク質発現遺伝子を欠失させている。仮に膜タンパクに遺伝子組換えバキュロウイルスが残存していても、カルタヘナ法規制による保護の対象である生物の多様性及び人の健康には影響を及ぼさないことも想定される。
- 現在の法令解釈及び運用上、遺伝子組換えウイルスが残存する場合には法規制の対象となるが、仮に感染性等を喪失している結果、核酸を移転し又は複製する能力を有さないものについては、そもそも法規制の対象である「生物」には該当しないとみなし、法規制の適用除外とするよう見直すことも考えられる。
- 本検討を進めるに当たっては、遺伝子組換えバキュロウイルスの実際の生残性や感染性の有無を確認する必要がある、NITE で検証しているところ。

2. 実験計画の検討と有識者からの指摘

- 上記 1. の検証にあたって、(1) 自然光（紫外線）による遁滅性の確認実験、(2) 宿主昆虫の摂食による感染性の確認実験の 2 種類の実験計画を作成した。また、実験の妥当性について、有識者の意見を伺った。

(1) 自然光（紫外線）による遁滅性の確認実験

①実験の意図等

- ポリヘドリンのない遺伝子組換えウイルスは自然光、特に自然光に含まれる紫外線によって容易に不活化されるとされているが、試薬中に残存する状態での自然条件下で

の生残性（安定性）は不明である。

- そこで、野生型のバキュロウイルスと遺伝子組換えバキュロウイルスを感染させた宿主細胞破碎液（膜タンパク質を含む。以下、ライセート）をモデル試薬として、自然光下におけるウイルスの遁滅実験を行い、両者の比較を含め結果を確認する（自然条件下では遺伝子組換えウイルスがインタクトな状態で長時間残存できないという結果を予想）。

②有識者からの指摘等

- ライセート中だと自然光下で不活化しにくく、光にどのくらいあてると不活化するかなど押さえておいた方がよいとの指摘があった。

（2）宿主昆虫の摂食による感染性の確認実験

①実験の意図等

- ポリヘドリンのない遺伝子組換えウイルスは、宿主昆虫が摂食しても感染しないと考えられるが、実験による確認が必要である。
- 野生型のバキュロウイルスと組換えバキュロウイルスを同じ条件で昆虫に摂食（人工飼料にライセートを混合）させた場合の感染性を実験¹し、両者の比較を含めて結果を確認する（ポリヘドリンを有する野生型では感染するが、ポリヘドリンのない組換えウイルスでは感染しないという結果を予想）。

②有識者からの指摘等

- 組換えウイルスはBV（出芽ウイルス、Budding virus）のみでなくODV（包埋体由来ウイルス、Occlusion derived virus）も存在。ポリヘドリンを欠失した遺伝子組換えバキュロウイルスであっても、ODVの場合は宿主細胞内、ひいては膜タンパク等のライセート試薬中に遺伝子組換えバキュロウイルスが存在することになる（なお、BVは存在しない）。更に、この場合、宿主昆虫がライセートを摂食すると感染力を有する（なお、BVは摂食による感染力を持たない）とのことであった。
- 界面活性剤処理有り・無しでの違い、また、ODVが含まれる可能性のある試薬がどのくらいあるか把握することも必要。
- ただし、経口摂食後の宿主昆虫の死亡数の推移を観察すると、ポリヘドリンが無いために中腸に到達するウイルス粒子が少ないため、野生型より感染が宿主昆虫全身に広がるまでに期間を要し、同期間では野生型に感染した宿主昆虫より死亡数が少ないが、いずれにせよいずれ全頭死亡する結果になることが想定される。

¹ AcMNPV と BmNPV は宿主特異性が高く、BmNPV はカイコにのみ感染し、AcMNPV は我が国においてヨトウガ等の13種のチョウ目昆虫（農業害虫を含むほとんどが植物害虫）に感染すると言われていた。我が国においては、家畜化された昆虫であるカイコを用いた実験が比較的依頼がしやすいと思われることから、BmNPV とカイコを用いた実験から始め、実験系を確立させ、その次に予め AcMNPV の宿主の検討を行った上で宿主昆虫を用いた実験を行う順番が適当であると考え、今年度後半に BmNPV について実験を実施することを計画した。

3. 今後の検討方針及びスケジュール

- BmNPV 及び AcMNPV について、試験受託機関の調査を来年度前半実施し、受託先を先に選定できたウイルスの自然光下での通減実験を後半開始する予定。(BmNPV については、当初 2020 年度後半に試験を実施予定であったが、専門家ヒアリングでの指摘を踏まえ実験計画を見直し、来年度に実施予定としている。)
- また、膜タンパク試薬の利用ニーズや重要性等についても調査を行う。

	2021 年度前半	2021 年度後半
BmNPV	試験受託機関調査 →	(予備試験) → (自然光下での通減実験) →
AcMNPV	試験受託機関調査 →	(予備試験) → (自然光下での通減実験) →
バイオ利用評価 WG	○	○

以上