

200401156A

厚生労働科学研究費補助金
食品の安全性高度化推進研究事業

遺伝子組換え医薬品等の
プリオン除去工程評価の方法に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山口 照 英

平成17 (2005) 年 4月

目 次

I. 総括研究報告

- 遺伝子組換え医薬品等のプリオン除去工程評価の方法に関する研究(総括)…………… 1
山口 照英(国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 部長)

II. 分担研究報告

1. 異常プリオンの除去/不活化工程の評価に関する研究…………… 26
内田 恵理子(国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 第1室長)

<資料>

- ① 平成15年厚生労働大臣告示第210号(平成15年5月20日制定,平成16年3月30日改正(平成16年厚生労働省告示第157号),平成16年7月5日改正(平成16年厚生労働省告示第262号))."反芻動物由来原料基準."(2003-2004)…………… 54
- ② Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), European Medicines Agency (EMA). "Guideline on the investigation of manufacturing processes for plasma-derived medicinal products with regard to vCJD risk." (CPMP/BWP/CPMP/5136/03, 21 Oct. 2004)…………… 56
- ③ Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), European Medicines Agency (EMA). "CHMP position statement on Creutzfeldt-Jakob disease and plasma-derived and urine-derived medicinal Products." (EMA/CPMP/BWP/2879/02/rev 1, 23 Jun. 2004)…………… 66
- ④ 村木一彦."欧州医薬品審査庁(EMA) CJD及び血漿・尿由来医薬品に関する医薬品委員会(CHMP)見解声明を発行."血液製剤調査機構だより 82: 10-18 (2004)…………… 83
- ⑤ 厚生労働省薬事・食品衛生審議会血液事業部会運営委員会資料."血漿分画製剤の製造工程中のプリオン除去等に係る安全性確保について."(21 Jan. 2005)…………… 92
2. プロセスバリデーションに適した PrP^{sc} 分画の調製法に関する研究…………… 99
堀内 基広(北海道大学大学院獣医学研究科 プリオン病学講座 教授)
3. 異常プリオンの処理方法の能力評価に関する試験研究…………… 105
菊池 裕(国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 主任研究官)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表…………… 112

IV. 研究成果の刊行物・別刷…………… 113

1. Chan-Lan Kim, Atsushi Umetani, Toshio Matsui, Naotaka Ishiguro, Morikazu Shinagawa,

- and Motohiro Horiuchi. "Antigenic characterization of an abnormal isoform of prion protein using a new diverse panel of monoclonal antibodies." *Virology* 320(1): 40-51 (2004)
2. Altagerel Gombojav, Naotaka Ishiguro, Motohiro Horiuchi, and Morikazu Shinagawa. "Unique amino acid polymorphisms of PrP genes in Mongolian sheep breeds." *Journal of Veterinary Medical Science* 66(10): 1293-1295 (2004)
 3. Yutaka Kikuchi, Tomoshi Kakeya, Ayako Sakai, Kosuke Takatori, Naoto Nakamura, Haruo Matsuda, Takeshi Yamazaki, Ken-ichi Tanamoto, and Jun-ichi Sawada. "Propagation of a protease-resistant form of prion protein in long-term cultured human glioblastoma cell line T98G." *Journal of General Virology* 85(11): 3449-3457 (2004)
 4. Chan-Lan Kim, Ayako Karino, Naotaka Ishiguro, Morikazu Shinagawa, Motoyoshi Sato, and Motohiro Horiuchi. "Cell-surface retention of PrP^C by anti-PrP antibody prevents protease-resistant PrP formation." *Journal of General Virology* 85(11): 3473-3482 (2004)

遺伝子組換え医薬品等のプリオン 除去工程評価の方法に関する研究

主任研究者 山口 照英 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部長

研究要旨

細胞培養を用いて生産される遺伝子組換え医薬品等の製造では、ほとんどの場合セルバンクの樹立や培養工程などに血清や添加剤等のウシ由来原材料が用いられている。一方で、世界的なウシ海綿状脳症（BSE）発症の広がりを受け、遺伝子組換え医薬品等の BSE 安全性確保のための予防的な対策が求められている。医薬品等の異常プリオン（PrP^{sc}）安全性を担保するためには、製造工程での PrP^{sc} の不活化／除去能の評価が重要である。本研究では、遺伝子組換え医薬品等の原材料から細胞培養・精製工程までを含めた製造工程における PrP^{sc} の除去／不活化工程に関する総合的なリスク評価を行うことを目指す。このようなリスク評価を通じて、科学的見地からこれら医薬品等の品質・安全性を確保するための方策を提示することを最終的な目的とする。

本年度報告する主な研究成果は、以下①～⑤のとおりである。

- ① 生物由来原料基準が 2004 年に 2 回改正され、ウシ等反芻動物由来原材料の原産国の見直し及び使用禁止部位の追加が行われた。当該改正内容及び他の文献等の調査結果を踏まえて、細胞培養技術応用医薬品等について一定の PrP^{sc} 安全性が確保されていると判断されることを確認した。
- ② 英国で輸血による変異型クロイツフェルト・ヤコブ病（vCJD）感染を示唆する事例が 2004 年報告された。血漿分画製剤製造での伝達性海綿状脳症（TSE）病原体に対するクリアランス評価のための指針が欧州医薬品審査庁から最近示されたことから、当該指針に基づきながら、細胞培養技術応用医薬品等の製造工程における PrP^{sc} 除去／不活化能の評価を行う際の要点を明らかにした。
- ③ 現在流通している各種血漿分画製剤について TSE 病原体に対する各製造工程のクリアランス能の情報を収集・整理した結果、類似の製造工程でも個々のクリアランス能には大きな開きがあり、公表文献等のデータも踏まえて、細胞培養技術応用医薬品等においても製造時の種々のパラメータの違いが実際のクリアランス能に大きく影響し得ることを明らかにした。
- ④ 適切なクリアランス評価を実施するためには、スパイク材料として、製造工程中で沈殿や物理的除去が起こりやすいと推測される脳乳剤そ

のものではなく、粒子サイズの小さいプリオン分画を使用する必要があると考えられる。スクレイビー帯広株感染マウスの脳から粒子サイズの小さい PrP^{Sc} を調製する方法について検討した結果、脳乳液の 0.5 ~ 1 % Sarkosyl 抽出液中に超遠心でも沈殿しない小さい PrP^{Sc} が十分量存在することを明らかにした。

- ⑤ ヒトグリオブラストーマ細胞株で発現しているスプライス変異型プリオン蛋白質 mRNA を新たに見出し、これがヒト脳を含む市販の各種臓器でも発現していることを明らかにした。さらに、クリアランス評価の際の検出系を確立すること及びスプライス変異型プリオン蛋白質の機能解明を目的として、プリオン蛋白質の C 末端及びスプライス変異型プリオン蛋白質の C 末端をそれぞれ認識するモノクローナル抗体を作製した。

分担研究者

内田 恵理子

国立医薬品食品衛生研究所
遺伝子細胞医薬部 第1室長

堀内 基広

北海道大学大学院獣医学研究科
プリオン病学講座 教授

菊池 裕

国立医薬品食品衛生研究所
衛生微生物部 主任研究官

研究協力者

永田 龍二

国立医薬品食品衛生研究所
遺伝子細胞医薬部 主任研究官

A. 研究目的

細胞培養を用いて生産される遺伝子組換え技術応用医薬品等の製造では、ほとんどの場合セルバンクの樹立や培養工程などに血清や添加剤等のウシ由来原材料が用いられている。一方で、世界的なウシ海綿状脳症 (BSE) 発症の広がりを受け、遺伝子組換え医薬品等の BSE 安全性確保のための予防的な対策が求められ

ている。伝達性海綿状脳症 (TSE) の中でも BSE に関する安全対策としては、BSE の発症の拡大を受け原産国や採取部位に関する規制の様々な見直しを行ってきている。例えば、2003 年 7 月の厚生労働省医薬食品局審査管理課長・同血液対策課長通知 (薬食審査発第 0725001 号・薬食血発第 0725002 号) では、血漿分画製剤製造業者等に対して自主的に自社の血漿分画製剤の異常プリオン (PrP^{Sc}) 除去/不活化能の評価に基づく安全性を確認するよう求めている。また、医薬品等を介する PrP^{Sc} 感染のリスク評価に関しては従前からウシ等由来原材料の「原産国の地理的リスク」及び「部位のリスク」を基本とした安全対策が図られてきたが、安全とみなされていたカナダ及び米国においても 2003 年 5 月及び 12 月にそれぞれ BSE が発生したことなど、医薬品等の製造工程中で PrP^{Sc} が除去/不活化される程度を定量的に評価することの重要性はますます高まっている。しかし、これら医薬品等の製造工程における PrP^{Sc} 除去/不活化効果に関する評価・検証方法については、いまだ国際的にコンセンサスが得られた基準は存在していない。遺

伝子組換え技術応用医薬品等の TSE 感染の予防的防御対策として、PrP^{Sc} 除去/不活性化工程についての普遍的かつ定量的な評価・検証方法を早急に確立し、製品の品質・安全性を保証するために必要なリスク削減方策を率先して提案する必要がある。

今後 PrP^{Sc} 除去/不活性化工程についての定量的な評価・検証方法が確立することにより、医薬品等の BSE 等の感染リスクに関して一定の基準に基づく科学的な比較が可能になると期待されるとともに、これらの評価・検証結果から明らかとされる具体的な問題点を踏まえて、製品の安全対策を向上させることも可能となる。さらに、ここから得られる知見は、医薬品ばかりでなく食品の安全性確保をはじめさまざまな TSE 安全対策に応用可能と考えられる。

以上のことから、本研究では、遺伝子組換え医薬品等の原材料から培養工程を含めた製造工程における PrP^{Sc} の除去/不活性化工程に関する総合的なリスク評価を行うことを目指す。このようなリスク評価を通じて、科学的見地からこれら医薬品等の品質・安全性を確保するための方策を提示することを最終的な目的とする。本研究は、大きく以下の3研究課題について実施することとした。

① 細胞培養技術応用医薬品の製造用細胞基材における異常プリオン安全性に関する試験研究：

遺伝子組換え技術応用医薬品や一部のワクチン等、培養細胞を利用して製造される医薬品等では、そのセルバンクの作製過程でウシ胎児血清やウシ由来添加剤が用いられているケースが多いことから、セルバンク作製時にウシ胎児血清等が用いられているバイオ医

薬品等の PrP^{Sc} に関するリスクの定量的評価を行うことを目標とする。

② 異常プリオンの処理方法の能力評価に関する試験研究：

ヒト又は反芻動物に由来する原材料を用いて製造される医薬品等の製造工程における PrP^{Sc} の除去/不活性化処理工程の能力評価に関する基盤研究として、種々のタイプの工程がもつ PrP^{Sc} 除去/不活性化処理能力の比較検討を定量的に行い、医薬品等の品質・安全性確保に有用なプリオン処理方法や方法の組み合わせを考案するための基礎となる試験成績を得ることを目標とする。

③ 異常プリオンの処理方法の能力評価に関する調査研究：

ウシ血清等を用いて製造される医薬品等の製造過程で実施される種々の PrP^{Sc} 除去/不活性化工程のリスク低減化能、及び PrP^{Sc} 製造工程のプロセスバルク等への混入リスクについて調査研究を行うとともに、PrP^{Sc} 除去/不活性化に関する未公開情報を可能な限り収集・整理し、これらの結果を総合して、これらの医薬品等の PrP^{Sc} に対するリスク評価の方法や安全性確保のための方策について提示することを目標とする。

本年度は特に、

- 1 上記②及び③に係る研究として、すでに上市されている細胞培養技術応用医薬品、血漿分画製剤等の PrP^{Sc} 安全性に関する調査研究（担当：内田）
- 2 上記③に係る研究として、細胞培養技術応用医薬品等の製造工程における PrP^{Sc} 除去/不活性化能の評価を行う際

に考慮すべき要点に関する調査研究
(担当：内田)

- 3 上記②に係る研究として、クリアランス評価に適した PrP^{Sc} 分画の調製法に関する研究 (担当：堀内)
- 4 上記①及び②に係る研究として、ヒト培養細胞及び組織で発現している新たなスプライズ変異型プリオン蛋白質に関する研究 (担当：菊池)

を実施した。なお、ウイルス除去膜を用いたろ過工程及びクロマトグラフィー工程を対象として、実生産規模を適切に反映するクリアランス試験用のスケールダウン試験系の設計も行ったが (担当：内田)、本件については次年度以後の成果と併せて報告することとしたい。

B. 研究方法

1. 細胞培養技術応用医薬品、血漿分画製剤等の PrP^{Sc} 安全性に関する調査研究、及び細胞培養技術応用医薬品等の製造工程における PrP^{Sc} 除去/不活化能の評価を行う際に考慮すべき要点に関する調査研究

厚生労働省など公的機関から示されている指針、学術論文等の公表資料を検討対象とし、遺伝子組換え技術応用医薬品等の細胞培養を用いて生産される細胞培養技術応用医薬品や血漿分画製剤などの製造工程における PrP^{Sc} 除去/不活化能、及びその評価を行う際に留意すべき点などに関して調査を行った。

2. クリアランス評価に適した PrP^{Sc}

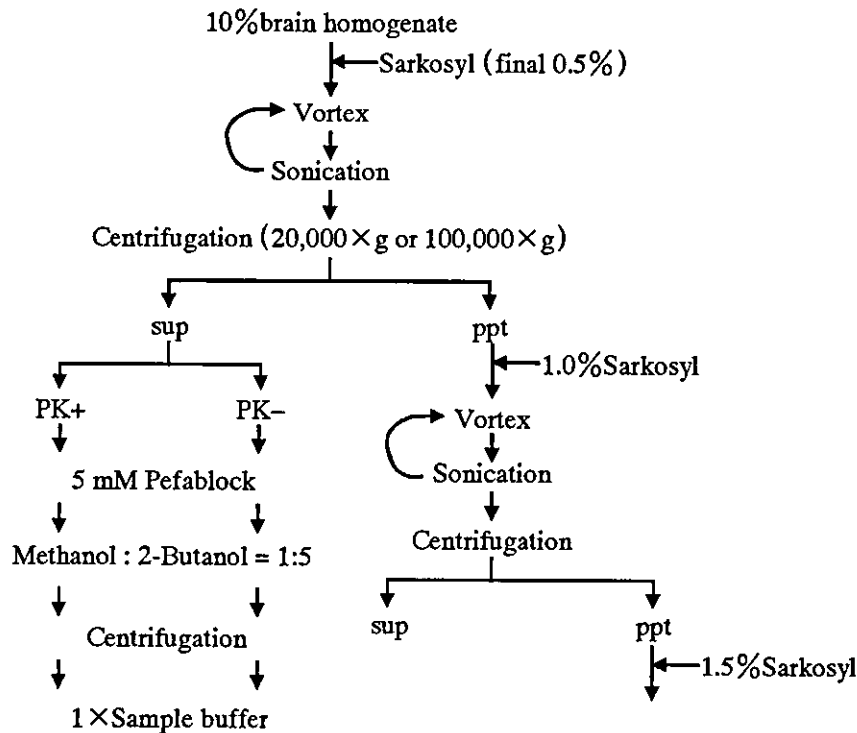


図1 スクレイピー感染マウス脳乳剤からのPrP^{Sc}の抽出

10%脳乳剤にSarkosylを最終濃度0.5%になるように加え、ボルテックス、超音波処理を3サイクル行った後に、20,000×gあるいは100,000×gで遠心した。上清は2等分し、一方はPK処理、他方はPK未処理対照として、SDS-PAGE用のサンプルを作製した。沈殿に1.0% Sarkosyl in PBSを加え、ボルテックス、超音波処理を3サイクル行った後に、20,000×gあるいは100,000×gで遠心した。以下、同様の処理を4.0% Sarkosylまで実施した。

分画の調製法に関する研究

スクレイピー帯広株感染マウスからの PrP^{Sc} の精製は Caughey らの方法 (1991) に従って行った。精製 PrP^{Sc} の detergent-lipid-protein complex (DLPC) の処理は以下のように実施した。すなわち、2 % Sarkosyl、0.4 % phosphatidyl choline、150 mM NaCl、50 mM Tris-HCl (pH 7.5) に精製 PrP^{Sc} を懸濁し、Branson 社の Contamination-Free Ultrasonic Pre-processing System で 2 秒の超音波処理を 5 サイクル行った。

図 1 にスクレイピー感染マウス脳乳剤からの Sarkosyl 抽出のフローチャートを示した。10 % 脳乳剤に Sarkosyl を最終濃度 0.5 % になるように加え、超音波処理後、20,000 × g で 10 分又は 100,000 × g で 15 分遠心した。上清を回収して 2 等分し、一方を proteinase K (PK) (20 µg/mL) 処理した。PK 処理後、ブタノール-メタノール混合物によりプリオン蛋白質 (PrP) を回収した。遠心で得られた沈殿に 1.0 % Sarkosyl を加え、超音波処理後、同様に遠心を行い、上清は PK 処理、沈殿は次の Sarkosyl 抽出を行った。Sarkosyl 抽出は 4 % まで 0.5 % ずつ Sarkosyl の濃度を上げて実施した。

PrP^{Sc} の検出はウエスタンブロット (WB) により行った。化学発光を LAS-3000 lumino-image analyzer で取り込み、定量解析を行った。

感染性を含む試料の使用は北海道大学大学院獣医学研究科 BSL2 実験施設にて行なった。

3. ヒト培養細胞及び組織で発現している新たなスプライス変異型プリオン蛋白質に関する研究

3.1. 細胞培養

ヒトグリオブラストーマ細胞株 T98G は T75 組織培養用フラスコで培養し、1 週間に 1 度の継代を行った。長期間の培養は 9 cm 組織培養用シャーレで行い、4 日ごとに培地を交換した。

3.2. RT-PCR

T98G 細胞を培養後、DNase 消化した total RNA を調製し、スーパー スクリプト II RNase H 逆転写酵素 (インビトロジェン株式会社) を用いてファーストストランド cDNA を合成した。脳を含む各種ヒト臓器由来 total RNA は日本ベクトン・ディ ッキンソン株式会社から購入し、同様にファーストストランド cDNA を合成した。PCR はプリオン蛋白質 遺伝子 (PRNP; GenBank accession No. AL133396) の exon 2 にコード されている PrP オープンリーディング フレーム (ORF) の mRNA を検出する各種プライマーと、KOD plus polymerase (東洋紡績株式会社) 又は Ex taq polymerase (タカラバイオ株式会社) を用いて行った。

3.3. 抗プリオン蛋白質モノクロー ナル抗体産生ハイブリドーマの樹立

ヒト PrP のアミノ酸配列 218 ~ 230 残基の C 末端に Cys を付加したペプチドに *m*-マレイミドベンゾ イル-*N*-ヒドロキシスクシンイ ミド (MBS) を架橋剤としてウシ 血清アルブミン (BSA) に結合させた免疫原 hPrP(218-230)-Cys-BCIP を調製し、BALB/c マウスを免疫した 後、その脾細胞とマウスミエローマ 細胞 PCI とで細胞融合を行い、固相

抗原として hPrP(218-230)-Cys-BCIP 又は組換えウシプリオン蛋白質 (rBoPrP) を用いた ELISA で培養上清をスクリーニングした。また、スプライス変異型 PrP の予想されるアミノ酸配列 214 ~ 230 残基に相当するペプチドに MBS を架橋剤として BSA に結合させた免疫原 hPrPSV(214-230)-BSA を調製し、BALB/c マウスを免疫した後、その脾細胞とマウスミエローマ細胞 NS-1 とで細胞融合を行い、固相抗原として hPrPSV(214-230)-OVA 又は hPrP(214-230)-OVA を用いた ELISA で培養上清をスクリーニングした。

(倫理面への配慮)

本研究の遂行にあたっては、3 省ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針、北海道大学大学院獣医学研究科動物実験委員会にて承認された実験指針、国立医薬品食品衛生研究所研究倫理審査委員会規定、同病原体等安全管理規程及び同動物実験に関する指針を遵守した。

C. 研究結果

1. すでに上市されている細胞培養技術応用医薬品、血漿分画製剤等の PrP^{sc} 安全性 (わが国における安全性確保のための方策)

医薬品等の製造に用いられるウシ等反芻動物由来原材料について、2003 年 5 月に生物由来原料基準の 1 つとして「反芻動物由来原料基準」が制定された (資料① (p. 54))。本基準では、医薬品等 (脂肪酸、グリセリン、脂肪酸エステル、アミノ酸、合成オリゴペプチドその他高温及びアルカリ処理に

より製するものを除く) の原材料が由来する動物の原産国及び原材料の採取部位に関するリスクを基本とした規制が行われている。

2003 年 5 月 21 日にカナダにおいて BSE 感染ウシが確認されたことに伴い、その翌日には、カナダを原産国 (誕生、飼育又はと殺を行う地域) とするウシ等由来原材料を医薬品等の製造に用いることの禁止、カナダを原産国とするウシ等由来原材料を使用した医薬品等の輸入禁止などを求める通知が厚生労働省から発出された。さらに、2004 年 3 月に生物由来原料基準の一部改正が行われ、乳、羊毛及びラノリン以外の反芻動物に由来する原材料を医薬品等に用いる場合の当該反芻動物の原産国のリストからカナダが削除され、併せて EU 委員会科学運営委員会の地理的 BSE リスク評価の結果公表 (Vossen, P., *et al.* Report of EU (5 Jun. 2003)) を受けて、原産国のリストにニューカレドニア及びバヌアツの 2 カ国が追加された。

2003 年 12 月 24 日に米国においても BSE 感染ウシの存在が確認され、カナダの場合と同様、翌日には米国を原産国とするウシ等由来原材料を医薬品等の製造に用いることの禁止、米国を原産国とするウシ等由来原材料を使用した医薬品等の輸入禁止などを求める通知が厚生労働省から発出された。さらに、2004 年 7 月には生物由来原料基準の一部改正が行われ、医薬品等の原材料として使用することができるウシ等反芻動物由来原材料の当該反芻動物の原産国のリストから米国が削除された。また、この原産国リストは、従前は乳、羊毛及びラノリン以外の医薬品等を対象としたものであったが、

ウシ等の皮の BSE リスクに係る科学的知見や国際的な規制を踏まえて、皮由来のゼラチン及びコラーゲンについても新たに対象に含めないこととされた。さらに、反芻動物の使用禁止部位についても最新の科学的知見を踏まえて見直しが行われ、新たに脊柱骨、頭骨、三叉神経節及び背根神経節の4部位が使用禁止部位に追加された。なお、地理的リスク評価の結果からみて、アルゼンチン、ウルグアイ、エルサルバドル、オーストラリア、シンガポール、スワジランド、チリ、ナミビア、ニカラグア、ニューカレドニア、ニュージーランド、パナマ、バヌアツ、パラグアイ、ブラジル及びボツワナの16カ国については、これら4部位の使用も従前のまま可能とされ、また、インド、ケニア、コスタリカ、コロンビア、ナイジェリア、パキスタン及びモーリシャスの7カ国については、経過措置として2005年9月30日までに製造又は輸入される医薬品等についてのみ、これら4部位の使用が可能とされた（上記の使用禁止部位に関する取扱い並びに皮由来ゼラチン及びコラーゲンの取扱いについては、2004年2月に同内容の通知が厚生労働省から発出されている）。

カナダのケースと異なり、米国を原産国とするウシ等由来原材料を用いた医薬品等は約2,600品目と多数存在していたことから、高リスク部位についてはすでに使用禁止とされていることも考慮して、国内の医薬品等の供給停止・欠品を防ぐ目的で表1のような措置が現在執られている。

現在わが国で承認されている血漿分画製剤に関して、個々の製品の各製造工程における PrP^{sc} クリアランス能に

ついて文献調査及び自社試験成績に基づいて各製造/輸入業者が評価を行った結果（2004年10月20日時点）が、厚生労働省から公表されている（資料⑤（p.92））。それによれば、Aで述べたとおり PrP^{sc} のクリアランス能の評価に際しては現時点でもコンセンサスの得られた方法はなく、例えば、クリアランス試験に用いられた試料の種類や由来、検出方法の不統一などの理由から、製品間の比較を安易に行うことはできないものの、製造工程全体を通じて概ね表2のような総推定クリアランス指数（RF）が各製品について得られている。

この結果を踏まえて、厚生労働省では各製造/輸入業者に対して、①各製品において存在する製造工程に対してすべての工程の評価を引き続き行うこと、②その際、可能なかぎり自社の工程での試験を行い製品に固有の製造工程におけるデータを評価するよう努めること、③ Cohn の冷エタノール分画法における Fraction I から製造される製品（フィブリノゲン、トロンビン、血液凝固第 VIII 因子）については、プリオンの除去に効果があると考えられる精製工程等を追加することにより、さらなる安全性の確保に努めること、を指導することとしたのである（資料⑤（p.92））。

さらに、製品別ではなく、各製造工程ごとの PrP^{sc} クリアランス能について、主要な学術文献等 11 報に示されたデータをまとめたものが表 3 である。この結果から、Cohn の冷エタノール分画工程、ポリエチレングリコール分画工程、グリシン分画工程及びナノフィルトレーション工程では、PrP^{sc} の除去/不活化に一定の効果が期待で

表1 ウシ等反芻動物由来原材料を用いた医薬品等のリスク分類及び米国産ウシ等反芻動物由来原材料の取扱い

<医薬品等の区分>

区分	類別	ウシ原料使用方法	投与経路	品目数	
A	①遺伝子組換え・細胞培養 医薬品	細胞培養工程等	注射	48	
	②遺伝子組換え・細胞培養 医薬品	親和性カラム等の精製工程			
	<内訳> 血栓溶解剤（遺伝子組換え）、抗悪性腫瘍抗体医薬品（同前）、腎性貧血改善剤（同前）、抗リウマチ薬（同前）、G-CSF 製剤（同前）、血液凝固因子製剤、再生不良性貧血治療薬（同前）、インターフェロン（同前）、免疫抑制剤（同前）、インスリン（同前）				
	③成分抽出製剤	抽出成分（有効成分、添加剤）	注射	9	
<内訳> 抗悪性腫瘍剤、血栓溶解剤、コンドロイチン硫酸（注射、点眼）、高カロリー輸液用微量元素製剤、組織接着剤					
	④植込み機器	成分・組織	植込	14	
<内訳> 組織補填等コラーゲン、ウシ心嚢膜					
B ₁	⑤経口製剤（骨由来ゼラチン）	カプセル等	経口	1,749	
	<内訳> 抗生物質、抗菌剤、癌治療薬、HIV 治療薬、免疫抑制剤、抗インフルエンザ薬、血栓溶解剤、不整脈薬、心房細動等治療薬、虚血性心疾患治療薬、狭心症治療薬、心不全治療薬、強心配糖体、循環改善薬、微小循環系賦活剤、抗プラスミン剤、ウイルソン病、抗炎症薬、抗潰瘍薬、代謝異常治療薬、リウマチ薬、子宮内膜症治療薬、神経障害治療薬、パーキンソン病治療薬、精神分裂病治療薬、抗うつ剤、自律神経剤、抗てんかん薬、カルシウム拮抗薬、高脂血症改善薬、降圧剤、抗アレルギー薬、真菌症治療薬、甲状腺機能検査薬、利胆及び鎮痙、ビタミン欠乏症、解熱鎮痛剤、鎮痙薬、骨粗鬆症、肝機能改善薬、止瀉薬、β作動薬、感冒薬、滋養強壮剤				
	⑥注射剤（骨由来ゼラチン）	安定剤	注射	5	
<内訳> 癌昇圧化学療法剤、抗悪性腫瘍剤					
B ₂	⑦成分抽出製剤	抽出成分	経口	249	
	<内訳> ゴオウ、胆汁末、胆汁エキス、コンドロイチン硫酸、肝臓エキス、心臓エキス、精巢エキス				
	⑧低分子製剤（コール酸類）	成分粗原料	注射	9	
	<内訳> G-CSF 製剤、ウルソデソキシコール酸類（急性白血病治療薬、好中球減少治療薬）				
	⑨微生物培養医薬品／ワクチン	培養	注射	48	
<内訳> 肺炎球菌ワクチン、乾燥弱毒生麻しんワクチン、乾燥弱毒生風しんワクチン、乾燥弱毒生おたふくかぜワクチン、日本脳炎ワクチン、抗悪性腫瘍溶連菌製剤、抗悪性腫瘍剤、ステロイド剤（リウマチ、抗炎症）、抗生物質					

<医薬品等の区分；続き>

C	⑩細胞培養医薬品	MCB / WCBのみ	注射	15
	<内訳> 抗生物質、眼瞼痙攣治療薬、血栓溶解剤（遺伝子組換え）、ゴーシェ病治療薬（同前）、ファブリー病治療薬（同前）			
	⑪微生物培養医薬品	シードのみ	注射	44
	<内訳> インスリン製剤、成長ホルモン			
	⑫微生物培養医薬品/ワクチン	培養	経口	45
	<内訳> 子宮内膜症治療薬、ステロイド剤（経口、坐剤、点眼）、抗パーキンソン病薬、ヒアルロン酸（手術用）、喘息薬（吸入）、合成ホルモン剤、利尿薬、ポリオワクチン			
⑬低分子製剤（コール酸類）	成分粗原料	経口	167	
<内訳> ウルソデオキシコール酸類				
⑭外用製剤	基材、成分等	経皮	178	
<内訳> ステロイド剤（抗炎症薬、クリーム等）、消炎鎮痛貼付剤、抗リウマチ薬、コンドロイチン硫酸、コラーゲン				

注) 類別①：遺伝子組換え技術等により製造される医薬品等であり、主として、その製造工程中の細胞の培養等の工程においてウシ等由来原材料（例えば血清、インスリン及び血漿蛋白等）を使用しているもの。また、製品の投与経路が注射又はそれに準じる方法によるもの。②：アフィニティークロマトグラフィー等の製品の精製工程において、ウシ等由来原材料から作製される原料を用いるもの。また、製品の投与経路が注射又はそれに準じる方法によるもの。③：ウシ等由来原材料を有効成分又は添加剤として含有する製剤で、投与経路が注射又はそれに準じる方法によるもの。④：ウシ等由来原材料を用いて製造される、組織修復等のために身体中に埋め込まれる医療機器。⑤・⑥：製剤中に骨由来のゼラチンを含み、その投与経路が経口又は注射又はそれに準じる方法によるもの。⑦：製剤の有効成分又は添加剤としてウシ等由来原材料を用いる製剤で、投与経路が経口等によるもの。⑧：ウシ等由来原材料を原材料として用いるが、その原料製造工程において一定のプリオン不活化が認められる低分子成分を含有又は製造工程中で使用する製剤で、投与経路が注射又はそれに準じる方法によるもの。⑨：微生物の培養により製造する製品で、その培養液等の成分としてウシ等由来原材料を用いるもの。また、その投与経路が注射又はそれに準じる方法によるもの。⑩：細胞培養により製造される医薬品等であって、そのマスターセルバンク又はワーキングセルバンクにのみウシ等由来原材料を使用しているもの。また、製品の投与経路が注射又はそれに準じる方法によるもの。⑪：微生物培養により製造される医薬品等であって、種培養工程にのみウシ等由来原材料を使用しているもの。また、製品の投与経路が注射又はそれに準じる方法によるもの。⑫：製品の製造工程中に微生物培養工程があり、その培養液等の成分としてウシ等由来原材料を用いるもの。また、製品の投与経路が経口によるもの。⑬：ウシ等由来原材料を成分として用いるが、その原料製造工程において一定の不活化が認められる成分を含有又は製造工程中で使用する製剤で、投与経路が経口によるもの。⑭：外用に用いられる製剤。

<製品類別リスク分類表>

以下の「リスク合計値」は、厚生労働省薬事・食品衛生審議会伝達性海綿状脳症対策調査会「カナダでの BSE 発生の確認を踏まえた医薬品等の BSE リスク評価の考え方について」(2003 年 7 月 8 日)に基づき、製品中の Log ID₅₀/g の期待値に一定の安全マージン(長期使用を前提として 2Log 分)を見込んで算出した値。原材料の中にプリオンが仮に存在した場合、プリオンが失われずに製品まで至ると仮定したときのもの。感染動物のリスクの高い部位を脳内に投与するときのリスク合計値を「+7」とする。

区分	類別	リスク合計値
A	①	+2
	②	-2
	③	0
	④	-1
B ₁	⑤	0~-4
	⑥	0~-4
B ₂	⑦	-3

区分	類別	リスク合計値
B ₂	⑧	-4
	⑨	-4
C	⑩	-4
	⑪	-6
	⑫	-7
	⑬	-7
	⑭	<-4

<米国産ウシ等反芻動物由来原材料の取扱い> (2004 年 7 月 5 日~)

- 米国での BSE 発生に伴う予防的な品質及び安全性確保の措置として、今後は米国産ウシ等反芻動物由来原材料を医薬品等の製造に原則使用してはならない。
- 1986 年以前に採取された米国産ウシ等反芻動物由来原材料については、従前のおり使用可能。
- それ以後に採取された米国産ウシ等反芻動物由来原材料を使用していた製品については、以下の取扱いとする。
 - ・ 製品区分 A (類別①~④): 2004 年 10 月 1 日以後は、低リスク国(反芻動物由来原料基準(3)に示された 23 カ国)を原産国とするウシ等反芻動物由来原材料に切り替えるか、もしくは米国産ウシ等反芻動物由来原材料を使用せずに、当該製品の製造又は輸入を行うこと。
 - ・ 製品区分 B₁ 及び B₂ (類別⑤~⑨): 2005 年 4 月 1 日以後は、低リスク国を原産国とする原材料に切り替えるか、もしくは米国産ウシ等反芻動物由来原材料を使用せずに、当該製品の製造又は輸入を行うこと。
 - ・ 製品区分 C (類別⑩~⑭): 従前のおり使用可能。
- 代替原材料の入手が困難であること又は新たな原材料の製造に相当の時間を要すること等の合理的理由により、米国産ウシ等反芻動物由来原材料の切り替えが上記の期日までに実施できない場合には、当該期日までに安全性に関する確保措置並びに使用者に対する徹底した情報提供を講じた上で、リスク評価を行うこと。

*: 厚生労働省医薬食品局長通知 薬食発第 0218004 号 (2004 年 2 月 18 日)、同通知 薬食発第 0705001 号 (2004 年 7 月 5 日)、及び厚生労働省薬事・食品衛生審議会伝達性海綿状脳症対策調査会 (2004 年 2 月 13 日開催) 配付資料による。

表 2 血漿分画製剤の製造工程における異常プリオン除去効果の評価状況（2004 年 10 月 20 日現在；資料⑤を改変）

Cohn 冷エタノール分画法における	製品数*	総推定 RF
○ Fraction I から製造される製剤 (フィブリノゲン、トロンビン、 血液凝固第 VIII 因子)	16	1.5 ~ 10.7
○ Fraction II+III から製造される製剤 (血液凝固第 IX 因子、同複合体、 迂回活性複合体、血液凝固第 XIII 因子、 人アンチトロンビン III)	13	1.5 ~ 15.0
○ Fraction III から製造される製剤 (人免疫グロブリン G、ポリエチレングリコール 処理人免疫グロブリン、スルホ化/ペプシン処理 人免疫グロブリン、イオン交換樹脂/pH 4 処理 人免疫グロブリン、抗 HB 人免疫グロブリン、 抗破傷風人免疫グロブリン、破傷風抗毒素、 活性化プロテイン C、人 C1 インアクチベーター、 人ハプトグロビン)	29	3.1 ~ 19.8
○ Fraction IV-4 から製造される製剤 (人血清アルブミン、人血漿たん白)	12	5.0 ~ 15.8

*：製造工程が同じ同一販売名・規格違い製剤については 1 つの製品として計算した。

表3 主要な学術文献等における異常プリオンの除去／不活化に関するクリアランス試験成績の概略

< Cohn の冷エタノール分画工程 >

工程 (Fraction)	条件		添加試料		検出方法	RF	文献 番号	
	エタノール濃度	pH	温度	由来				調製方法
I	7.4 %	7.2	-2 °C	263K ハスター-朝日スクレパ-因子	脳破砕液	ウエスタンブロット	0.5	1
	8 %	7.4	-2 °C	Se237 感染シアンハスター	カベオラ様ドメイン	構造依存免疫アッセイ	0.7	2
	7.4 %	7.2	-2 °C	263K ハスター-朝日スクレパ-因子	脳破砕液	バイオアッセイ	0.8	1
	8 %	7.4	-2 °C	Se237 感染シアンハスター	脳破砕液	構造依存免疫アッセイ	0.9	2
	8 %	7.4	-2 °C	Se237 感染シアンハスター	ミクロソーム画分	構造依存免疫アッセイ	0.9	2
	8 %	-	-	vCJD	脳破砕液	ウエスタンブロット	1.0	7
	8 %	7.2	-3 °C	263K ハスター-朝日スクレパ-因子	脳破砕液	ウエスタンブロット	1.1	4
	8 %	-	-	263K ハスター-朝日スクレパ-因子	脳破砕液	バイオアッセイ	1.5	10
	8 %	7.4	-2 °C	Se237 感染シアンハスター	精製スクレイビー-PrP ^{sc}	構造依存免疫アッセイ	3.1	2
	21 %	6.7	-5 °C	263K ハスター-朝日スクレパ-因子	ミクロソーム画分	ウエスタンブロット	1.3	11
II+III	25 %	7.1	-7 °C	Se237 感染シアンハスター	ミクロソーム画分	構造依存免疫アッセイ	3.1	2
	25 %	7.1	-7 °C	Se237 感染シアンハスター	カベオラ様ドメイン	構造依存免疫アッセイ	3.1	2
	25 %	7.1	-7 °C	Se237 感染シアンハスター	脳破砕液	構造依存免疫アッセイ	3.6	2
	21 %	6.8	-6 °C	263K ハスター-朝日スクレパ-因子	脳破砕液	ウエスタンブロット	≥ 3.9	1
	25 %	7.1	-7 °C	Se237 感染シアンハスター	精製スクレイビー-PrP ^{sc}	構造依存免疫アッセイ	4.0	2
	19 %	6.7	-5 °C	263K ハスター-朝日スクレパ-因子	脳破砕液	ウエスタンブロット	≥ 4.7	3
	21 %	6.8	-6 °C	263K ハスター-朝日スクレパ-因子	脳破砕液	バイオアッセイ	5.0	1
	19 %	6.7	-5 °C	263K ハスター-朝日スクレパ-因子	脳破砕液	バイオアッセイ	6.0	3
	12 %	5.3	-3 °C	263K ハスター-朝日スクレパ-因子	脳破砕液	ウエスタンブロット	3.5	9
	17 %	5.3	-6 °C	263K ハスター-朝日スクレパ-因子	脳破砕液	ウエスタンブロット	≥ 4.0	1
III	17 %	5.4	-5 °C	263K ハスター-朝日スクレパ-因子	脳破砕液	ウエスタンブロット	≥ 4.0	4
	16 %	5.5	-5 °C	263K ハスター-朝日スクレパ-因子	脳破砕液	ウエスタンブロット	≥ 4.3	3
	17 %	5.3	-6 °C	263K ハスター-朝日スクレパ-因子	脳破砕液	バイオアッセイ	5.2	1
	16 %	5.5	-5 °C	263K ハスター-朝日スクレパ-因子	脳破砕液	バイオアッセイ	5.3	3

< Cohn の冷エタノール分画工程；続き >

IV	35 %	5.5	-5 °C	263K ハスター-菌用スクレイベ-因子	ミクロソーム画分	ウエスタンブロット	≥ 3.0	11
IV-1	30 %	5.1	-5 °C	263K ハスター-菌用スクレイベ-因子	脳破砕液	バイオアッセイ	3.7	3
IV-1+4	38 %	6.0	-7 °C	Se237 蘇シアンハスター	脳破砕液	構造依存免疫アッセイ	≥ 4.1	2
IV-1+4	38 %	6.0	-7 °C	Se237 蘇シアンハスター	カバオラ様ドメイン	構造依存免疫アッセイ	≥ 4.1	2
IV-1	30 %	5.1	-5 °C	263K ハスター-菌用スクレイベ-因子	脳破砕液	ウエスタンブロット	≥ 4.2	3
IV-4	30 %	5.8	-6 °C	263K ハスター-菌用スクレイベ-因子	脳破砕液	ウエスタンブロット	≥ 4.3	3
IV-4	30 %	5.8	-6 °C	263K ハスター-菌用スクレイベ-因子	脳破砕液	バイオアッセイ	4.5	3
IV-1+4	38 %	6.0	-7 °C	Se237 蘇シアンハスター	ミクロソーム画分	構造依存免疫アッセイ	≥ 4.5	2
IV-1+4	38 %	6.0	-7 °C	Se237 蘇シアンハスター	精製スクレイベイピー PrP ^{Sc}	構造依存免疫アッセイ	≥ 4.6	2

Cohn の冷エタノール分画法		RF
Fr I		0.5 ~ 3.1
Fr II+III		1.3 ~ 6.0
Fr III		3.5 ~ 5.3
Fr IV (IV, IV-1, IV-4, IV-1+4)		≥ 3.0 ~ ≥ 4.6

< その他分画工程 >

工程	条件	添加試料		検出方法	RF	文献番号
		由来	調製方法			
ポリエチレングリコール分画	-	-	-	-	> 3.0	6
	11.5 %	vCJD	脳破砕液	ウエスタンブロット	≥ 4.0	7
	11.5 %	263K ハスター-菌用スクレイベ-因子	脳破砕液	ウエスタンブロット	≥ 4.9	3
	11.5 %	263K ハスター-菌用スクレイベ-因子	脳破砕液	バイオアッセイ	≥ 5.4	7
グリシン分画	11.5 %	263K ハスター-菌用スクレイベ-因子	脳破砕液	ウエスタンブロット	≥ 5.8	7
	2 M	Se237 蘇シアンハスター	ミクロソーム画分	構造依存免疫アッセイ	1.7	2
	2 M	Se237 蘇シアンハスター	精製スクレイベイピー PrP ^{Sc}	構造依存免疫アッセイ	3.3	2

精製分画法	RF
ポリエチレングリコール	> 3.0 ~ ≥ 5.8
グリシン	1.7 ~ 3.3

<ナノフィルトレーション工程>

工程	条件	添加試料		検出方法	RF	文献番号	
		由来	調製方法				
ナノフィルトレーション	膜孔径 35 nm	C57Bl/6 マウス 適用スクレイプ-因子	脳破砕液 + Sarkosyl	バイオアッセイ	1.6	5	
	膜孔径 35 nm	263K ハスター 適用スクレイプ-因子	マイクロソーム画分	ウェスタンブロット	2.7	8	
	膜孔径 15 nm	263K ハスター 適用スクレイプ-因子	マイクロソーム画分	ウェスタンブロット	≥ 2.7 ~	8	
	膜孔径 15 nm	C57Bl/6 マウス 適用スクレイプ-因子	脳破砕液 + Sarkosyl	バイオアッセイ	≥ 4.2 > 4.2	5	
	-	263K ハスター 適用スクレイプ-因子	脳破砕液	ウェスタンブロット	4.4	9	
	膜孔径 35 nm	C57Bl/6 マウス 適用スクレイプ-因子	脳破砕液	バイオアッセイ	4.9	5	
	膜孔径 15 nm	C57Bl/6 マウス 適用スクレイプ-因子	脳破砕液	バイオアッセイ	> 5.9	5	
	-	263K ハスター 適用スクレイプ-因子	脳破砕液	ウェスタンブロット	7.2	9	
	デガステーション →ペブシン処理 (pH 4) →デガステーション (2回目)	-	263K ハスター 適用スクレイプ-因子	脳破砕液	ウェスタンブロット	7.2	9

<文献>

- 1) Cai, K., *et al.* Biochim. Biophys. Acta 1597: 28-35 (2002)
- 2) Vey, M., *et al.* Biologicals 30: 187-196 (2002)
- 3) Lee, D. C., *et al.* Transfusion 41: 449-455 (2001)
- 4) Lee, D. C., *et al.* J. Virol. Methods 84: 77-89 (2000)
- 5) Tateushi, J., *et al.* Biologicals 29: 17-25 (2001)
- 6) Baron, H. FDA TSE Advisory Committee (20 Feb. 2003)
- 7) Stenland, C. J., *et al.* Transfusion 42: 1497-1500 (2002)
- 8) Flan, B., *et al.* Cambridge Healthtech. Institute's TSE Conference (12-13 Feb. 2003)
- 9) Gregori, L., *et al.* Biologicals 32: 1-10 (2004)
- 10) Brown, P., *et al.* Transfusion 38: 810-816 (1998)
- 11) Foster, P. R. Vox Sang. 78: 86-95 (2000)

表4 TSE クリアランス評価において考慮すべき要点 (CHMP, EMEA. "Guideline on the Investigation of Manufacturing Processes for Plasma-derived Medicinal Products with Regard to vCJD Risk." (CPMP/BWP/CPMP/5136/03, 21 Oct. 2004) ; 資料②による)

○ 実生産スケールの製造工程からの実験室レベルのクリアランス試験モデル系への適切なスケールダウン

- <留意点> ・ 原則はウイルスバリデーションの場合と共通。
- ・ スケールダウンしたモデルにおける収率、品質及び製品又は製造中間体の組成等が、実生産スケールで製造された製品の典型的なロットにおけるデータと同等であることが必要。

○ クリアランス試験用添加試料にスパイクする病原体試料の適切な選択

- <留意点> ・ 製造工程で得られる添加試料に対してスパイクする病原体試料の容積は、元の試料の 10 % 以下。
- ・ 病原体試料は脳組織が現実的には唯一の調製源。
 - ・ 可能なかぎり力価の高い病原体試料を調製。
 - ・ (不活化工程ではなく) 除去工程の評価に際しては、どの株・系統の病原体でも使用可能。
 - ・ 病原体試料の選択肢として、未精製の脳破砕液、マイクロソーム画分、カベオラ様ドメイン、精製 PrP^{Sc} など、調製方法の違いによる物理的・化学的性質の異なるものが多種存在するが、クリアランス評価には除去/不活化が最も困難であると推測されるものを選択。

○ 病原体定量のための適切なアッセイ法の選択

- <留意点> ・ 適切な動物モデルを用いた感染性アッセイ (生物学的アッセイ) がゴールドスタンダード。
- ・ 生物学的アッセイの代替法として生化学的アッセイ (ウェスタンブロット等の *in vitro* アッセイ) を採用する場合には、生物学的アッセイとの相関関係を確認。
 - ・ 除去 (分配) 工程の評価の際には、目的とする画分以外の画分に病原体が実際に分配されていることを生化学的アッセイにより確認。

○ クリアランス評価の対象とする製造工程の適切な選択

- <留意点> ・ 加熱工程や S/D 処理工程等、従来広く用いられているウイルス不活化工程の多くに対して TSE 病原体は抵抗性をもつことを認識した上で、TSE の除去/不活化に有効であると考えられる製造工程 (例えば、エタノール画分工程、沈殿工程、クロマトグラフィー工程、ろ過工程) を評価対象として選択。
- ・ 医薬品等の製造方法も考慮して、スパイクする病原体試料の適切な調製・前処理方法を選択。
 - ・ 複数工程を併せて評価する際には、個々の工程のクリアランスについても同時に確認。

○ クリアランス試験の結果についての適切な解釈

- <留意点> ・ 個々の工程における各 RF の合計を、複数工程の総 RF とみなしてよいとする妥当性を確認。
- 例えば、1 未満の RF は総 RF 算出の際には加算すべきではないし、同様の機序による不活化/除去工程を組み合わせた場合、及び不均一な病原体試料から特定の病原体画分のみが不活化/除去されるような工程を組み合わせた場合にも注意が必要。
- ・ 製造工程の頑健性に関する評価の実施が現実的には困難。

○ クリアランスの再評価

- <留意点> ・ ウイルスバリデーションの場合同様、製造工程の重大な変更が行われた際には再評価が必要。

○ 設備の消毒

- <留意点> ・ 物理的・化学的抵抗性も高く、金属表面等にも付着しやすいことから、製造設備・装置の病原体汚染除去を徹底。

きることが明らかとなった。

2. 細胞培養技術応用医薬品等の製造工程における PrP^{Sc} 除去/不活化能の評価を行う際に考慮すべき要点

2004年10月に欧州医薬品審査庁(EMA)から血漿分画製剤の製造における PrP^{Sc} クリアランス評価のための指針が示された(資料②(p.56))。当該指針の直接的な対象は血漿分画製剤ではあるが、クリアランス評価における基本的な考え方自体は細胞培養技術応用医薬品でも共通であると考えられる。当該指針の内容の要約は次のとおりである。また、当該指針の要点を表4に示す。

血漿分画製剤の製造/輸入業者は、公表されているデータと照らし合わせながら、各自の製造工程を注意深く評価しなければならない。各製品に固有のクリアランス評価における段階的アプローチに関しては、2004年6月のCHMP見解声明(資料③(p.66);資料④(和訳;p.83))の9.2.3項にガイダンスが示されている。除去工程の評価に際しては、スパイクする病原体として TSE 病原体のどの系統を選択しても問題がないことから、使用する系統は実務的な要因を踏まえて決定してよい。スパイクする病原体として、異なるものを使用することができる。実験室レベルで製造工程を評価する際には、クリアランスが最小となるケースでの評価が行えるものとして、除去/不活化が最も困難であると推測されるスパイク用試料を選択すべきである。いずれの場合においても、スパイクする病原体の系統、由来する動物種及び調製方法を選択した理論的根拠は示さなければならない。

クリアランス評価においては、モデル系としての性格、及び実生産レベルでの製造工程を実験室レベルで評価ができるよう近似を行っていることから、これにより得られるデータに制限があることはよく認識されている。しかしながら、血漿分画製剤の製造工程における TSE 病原体の除去能について、これら実験室レベルでの評価が有用な情報を提供してくれると期待される。

3. クリアランス評価に適した PrP^{Sc} 分画の調製法

精製 PrP^{Sc} の遠心による沈降を図2に示した。DLPC 未処理では 20,000 × g の遠心によりほぼすべての PrP^{Sc} が沈殿するが、DLPC 処理(2% Sarkosyl)により約 50% の PrP^{Sc} が 20,000 × g の遠心上清に残存した。しかし、100,000 × g の遠心ではほとんどの PrP^{Sc} が沈殿した。

スクレイピー感染マウス脳乳剤から Sarkosyl で抽出した画分の 20,000 × g

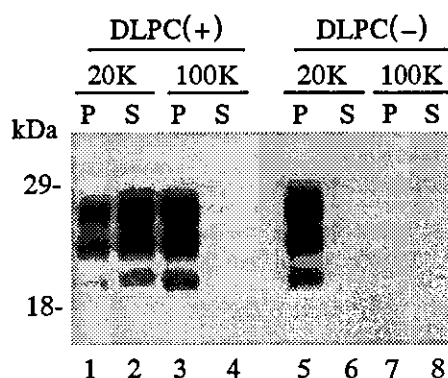


図2 精製 PrP^{Sc} の DLPC 処理による粒子サイズの変化

精製 PrP^{Sc} を DLPC 処理せずに遠心した場合 [DLPC(-)]は、20,000 × g (20K) の遠心上清には検出されなかった(レーン 5-8)。DLPC 処理後 [DLPC(+)]は、20,000 × g (20K) の遠心上清に約 55% の PrP^{Sc} が残存したが(レーン 1, 2)、100,000 × g の遠心では沈殿した(レーン 3, 4)。

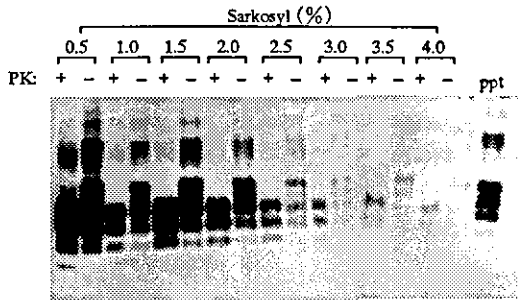


図3 Sarkosyl抽出画分中の20,000 × g 遠心上清に含まれるPrP^{sc}のPK抵抗性

各々の濃度のSarkosyl抽出画分の20,000 × g 遠心上清中に存在する総PrP (PK-) とPrPSc (PK+) を示した。総PrP (あるいはPrP^{sc}) に対する各抽出画分中のPrP (あるいはPrPSc) 相対量の平均値とSD (n = 3) は表5に示した。1.5 ~ 3.0 %の組織当量を1とすると、0.5及び1.0 %は1/5組織当量、3.5及び4.0 %は2組織当量の試料を電気泳動した。

遠心上清に含まれる総PrP (PK未処理) とPrP^{sc} (PK処理) を検出した結果を図3に示した。また、同様の実験を3回実施し、PrP量を定量した結果を表5に示した。0.5 % Sarkosyl抽出画分の20,000 × g 遠心上清に、全体の約70 %のPrPが存在し、0.5及び1.0 % Sarkosyl抽出画分の両方を合わせると、全体の90 %以上が20,000 × gの遠心上清に存在した。遠心上清のPrPはPK処理後も検出されることから、大部分はPrP^{sc}である。PrP^{sc}量で比較しても全体の約90 %が0.5及び1.0 % Sarkosyl抽出画分の20,000 × g 遠心上

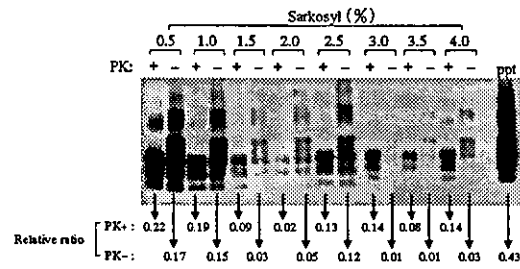


図4 Sarkosyl抽出画分中の100,000 × g 遠心上清に含まれるPrP^{sc}のPK抵抗性

各々の濃度のSarkosyl抽出画分の100,000 × g 遠心上清中に存在する総PrP (PK-) とPrPSc (PK+) を示した。総PrP (あるいはPrP^{sc}) に対する各抽出画分中のPrP (あるいはPrP^{sc}) 相対量を図下に示した。

清に存在した。

遠心条件を100,000 × gに変更した結果を図4に示した。超遠心を用いた場合は、4 % Sarkosyl抽出画分でも沈殿するPrPが全体の50 %を占めた。一方、0.5及び1.0 %抽出画分の遠心上清には各々全体の20 ~ 10 %程度のPrPが残存した。上清中のPrPはPK抵抗性であることからPrP^{sc}が含まれていることが確認できた。PrP^{sc}量で比較しても、0.5及び1.0 %抽出画分の遠心上清には各々全体の15 %程度のPrP^{sc}が存在することが判明した。

表5 20,000g × gの遠心によるSarkosyl抽出PrP^{sc}の沈殿

Sarkosyl (%)	PK(+)PrP/total PK(+)PrP	PK(-)PrP/total PK(-)PrP
0.5	0.62 ± 0.05	0.74 ± 0.11
1.0	0.26 ± 0.04	0.20 ± 0.08
1.5	0.08 ± 0.05	0.04 ± 0.01
2.0	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01
2.5	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00
3.5	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
4.0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00