

図 5 Expression of splice variant of PrP mRNA in T98G cells.

(a) T98G cells were incubated after repeated passages. First strand-cDNA from total RNA (5 µg) were prepared from T98G cells for 24 days after 13 passages (P13D24, lanes 1-2), for 40 days after 13 passages (P13D40, lanes 3-6). (b) T98G cells for 24 days after 18 passages (P18D24) were exposed to hypoxia 5% O₂, lanes 1-2 or normoxia (lanes 3-6) for the last 1 day. First strand-cDNA from total RNA (5 µg) and genomic DNA (2.5 ng) were prepared, followed by PCR using human PrP primer set (odd lanes) and β-actin primer set (even lanes) with KOD Plus polymerase.

4. 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

4.1. スプライス変異型プリオン蛋白質 mRNA の発現

PRNP がコードする mRNA の発現様式を調べるため、各種条件下で培養した T98G 細胞から調製した total RNA を鋳型とし、KOD plus polymerase を用いて RT-PCR を行った。

13 回の継代後に 24 日間培養した T98G 細胞 (P13D24) から調製した total RNA では、PRNP exon 2 の 434 ~ 961 に相当する 528 塩基対 (bp) のバンドを検出した (図 5(a)、レーン 1)。一方、さらに 40 日まで培養した T98G 細胞 (P13D40) から調製した total RNA では、先のものより短い 296 bp のバンドを示した

(図 5(a)、レーン 3)。296 bp のバンドをゲルから切り出してその塩基配列を解析したところ、PrP の C 末端と GPI アンカーシグナル配列を含む 232 bp が 528 bp の内部から欠落していた (図 5(a)、下段)。同時に調製した T98G 細胞 (P13D40) の genomic DNA を鋳型とした PCR では 528 bp のバンドを示し、296 bp と同じ塩基配列は存在しなかった (図 5(b)、レーン 5)。以上の結果から、継代数を重ねた後に長期間培養した T98G 細胞では、PRNP exon 2 のスプライス変異型 RNA を発現することが示唆された。

次に、低酸素濃度下で培養した T98G 細胞が発現する mRNA の解析を行った。18 回の継代後に通常の酸素濃度下 (normoxia) で 24 日間培養した T98G 細胞 (P18D24) から調製した total RNA では、PRNP exon 2 の 434 ~ 961 に相当する 528 bp のバンドを検出した (図 5(b)、レーン 3)。一方、通常の酸素濃度下で 23 日間培養後、低酸素濃度下 (5% O₂; hypoxia) で 1 日間培養した T98G 細胞から調製した total RNA では、P13D40 と同様に 296 bp のバンドを示した (図 5(b)、レーン 1; 図 5、下段)。同時に調製した T98G 細胞 (P18D24) の genomic DNA を鋳型とした PCR では 528 bp のバンドを示し、296 bp と同じ塩基配列は存在しなかった (図 5(b)、レーン 5)。

4.2. エクソン結合部位に特異的なプライマー (exon-exon junction primer) を用いたスプライス変異型プリオン蛋白質 mRNA の検出

スプライス変異型 PrP の mRNA

を検出することを目的とし、エクソン結合部位に特異的に結合するプライマー (exon-exon junction primer) を設計し、Ex taq polymerase を用いて RT-PCR を行った。

PrP の ORF を含む *PRNP* exon 2 の 1 ~ 1,433 に結合するプライマーを用いた PCR では、T98G 細胞 (P18D24) から調製したファーストストランド DNA 及び genomic DNA 中に 1,433 bp のバンドを示し (図 6(a)、レーン 1 及び 4)、ゲルから切り出した 1,433 bp のバンドの塩基配列は *PRNP* exon 2 と一致した。一方、スプライシングで欠落する部位 (232 bp) を挟み、その両端の配列を結合させたプライマーを用いた PCR では、ファーストストランド DNA で 676 及び 555 bp のバンドを示したが (図 6(a)、レーン 2-3)、genomic DNA ではバンドが検出されなかった (図 6(a)、レーン 5-6)。また、ゲルから切り出した 676 及び 555 bp のバンドの塩基配列は、*PRNP* exon 2 のそれぞれ 908 及び 787 bp に相当する部位から 232 bp の配列が欠落したものと一致した。以上の結果から、設計した exon-exon junction primer はエクソン結合部位と結合し、これによりスプライス変異型 PrP の mRNA が特異的に検出できることが示された。

次に、市販のヒト由来 total RNA から調製したファーストストランド DNA を鋳型とし、exon-exon-junction primer を用いた RT-PCR を行った。成人及び胎児の脳から調製したファーストストランド DNA では 1,433 bp のバンド (図 6(b)、レーン 1 及び 4) 並びに 232 bp が欠落した 676

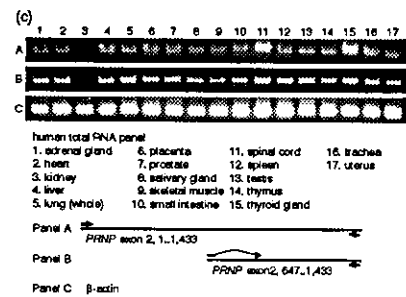


図 6 Detection of splice variant of PrP mRNA using exon-exon junction primers.

(a) T98G cells were incubated for 24 days after 18 passages (P18D24). First strand-cDNA from total RNA (5 µg) and genomic DNA (2.5 ng) were prepared, followed by PCR using *PRNP* exon 2 primer set (1-22 and 1,433-1,411; lanes 1 and 4) and 24-nucleotide exon-exon junction primers (lanes 2-3 and 5-6) with Ex taq polymerase. (b) First strand-cDNA from adult human brain total RNA and human fetal brain total RNA (5 µg each; BD Biosciences, Palo Alto, CA, USA) were prepared, followed by PCR using the *PRNP* exon 2 primer set (lanes 1 and 4) and the exon-exon junction primers (lanes 2-3 and 5-6) with Ex taq polymerase. (c) First strand-cDNA from adult human total RNA panel (5 µg each; BD Biosciences, Palo Alto, CA, USA) were prepared, followed by PCR using the *PRNP* exon 2 primer set (Panel A), the exon-exon junction primers (Panel B), and β-actin (Panel C) with Ex taq polymerase.

及び 555 bp のバンド (図 6(b)、レーン 2-3 及び 5-6) が検出された。同様に、成人各種臓器から調製したファーストストランド DNA で 1,433 bp のバンド (図 6(c)、パネル A) と 555 bp のバンド (図 6(c)、パネル C) が検出され、T98G 細胞と同様にスプライス変異型 PrP mRNA の存在が示唆された。

4.3. 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

先に確認したスプライス変異型 PrP の ORF は 230 アミノ酸をコード

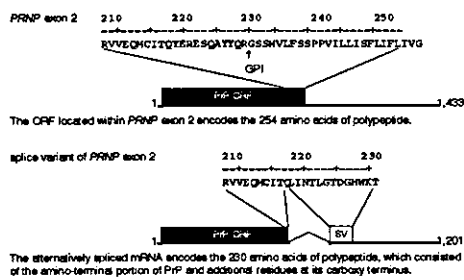


図7 Schematic representation of alternative splicing model of PRNP exon 2 (1-1,433).

し、1～217残基までは PrP と同じ 1 次構造を有している (図 7)。PrP 及びスプライス変異型 PrP の蛋白質発現を確認するため、それぞれの C 末端に相当するペプチドに対するマウスモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの樹立を行った。ヒト PrP の 218～230 残基に相当するペプチド (hPrP(218-230)) でマウスを免疫し、その脾細胞からハイブリドーマ 3 株を樹立した。産生する IgM クラスの抗体は、ELISA で固相抗原のペプチド hPrP(218-230) 及び遺伝子組換えウシ PrP (rBoPrP) を認識した (図 8(a))。同様に、スプライス変異型 PrP の ORF から予想される 214～230 残基に相当するペプチド (hPrPSV(214-230)) でマウスを免疫し、その脾細胞からハイブリドーマ 7 株を樹立した。産生する IgG クラスの抗体は、ELISA でスプライス変異型 PrP のペプチド hPrPSV(214-230) を認識したが、通常のペプチド (214～230 残基; hPrP(214-230)) は認識しなかった (図 8(b))。

D. 考察

1. すでに上市されている細胞培養技

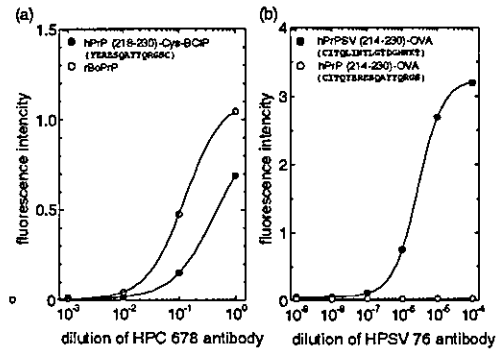


図8 Binding of antibodies to coating antigen in ELISA.

(a) Various concentration of anti-hPrP (218-230) antibody (HPC 678) were incubated with hPrP (218-230)-Cys-BCIP (●) or rBoPrP (○) as coating antigen. (b) Various concentration of anti-hPrPSV(214-230) antibody (HPSV 76) were incubated with hPrPSV(214-230)-OVA (●) or hPrP (214-230)-OVA (○) as coating antigen.

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)

C.1 で述べたように、わが国における医薬品等の PrP^{Sc} 安全性確保のための規制は、BSE 発症国の拡大 (カナダ・米国) 及び最新の科学的知見の蓄積を踏まえて速やかかつ適切に実施されていると考えられる。医薬品等製品全体としては PrP^{Sc} に関して一定の安全性は確保されているとすでに判断されているものの、個々の医薬品等 (例えば、細胞培養技術応用医薬品) についての各製造/輸入業者によるリスク評価においては、表 2 及び資料⑤ (p. 92) にもみられるとおり、個別の製造工程における PrP^{Sc} 除去/不活化について実際に評価を実施したケースは今のところ多くないようであり、また、文献データに依存する割合も高いことから推定総 RF に大きな幅があるのが現状である (例えば、表 2 に示した血漿分画製剤類では、同種の製品間で 10⁹

以上)。さらに、表3に示したとおり、文献によっても類似の除去／不活化条件におけるRFに大きな幅がみられることから、実際の製造工程では、種々のパラメータの違いがそのクリアランス能に大きな影響を与え得ることが推察される。確かに具体的なPrP^{sc}リスク評価の方法や個別の製造工程におけるPrP^{sc}除去／不活化効果の評価・検証方法に関する指針類は現在わが国には存在しないが、例えば、C.2で述べたEMAガイドライン（資料②（p. 56））の内容を十分検討したり、本研究班の研究成果を有効に活用することによって、各医薬品等の個別の製造工程について適切なPrP^{sc}クリアランス評価を行うとともに、必要に応じて自社の各製造工程におけるクリアランス試験の実施を考慮すべきであると考えられる。

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

遺伝子組換え技術応用医薬品等、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／不活化効果に関する評価・検証方法については、国際的にコンセンサスの得られた統一的な基準が存在していないが、2004年10月に欧州医薬品審査庁（EMA）から初めて、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（資料②（p. 56））が示された。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。

当該指針の内容はC.2に示したとお

りであり、大半の点、例えば、①製造工程で得られた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%を超えないこと、②クリアランス試験は実生産工程を適切に反映するようスケールダウンした系で行うこと、③クリアランス試験は、実生産の現場から隔離された実験室内で、よく制御され、かつ文書により管理された方法により、適切な資格をもつ人員が実施すべきであること、④不活化／除去への寄与が期待される工程のみを評価すればよいこと、⑤1未満のクリアランス指数は総クリアランス指数を算出する際には含めないこと、などの点については、ICHガイドラインQ5A「ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウイルス安全性評価」に示されているとおり、ウイルスクリアランス評価における留意点と共通である。一方、TSE病原体特有の問題、すなわち①実際に感染を引き起こす感染体の物理的・化学的性質について依然未解明であること、②クリアランス試験に使用する病原体として、由来動物や調製方法を含めて多種多様の選択肢が存在し、いずれが最適なものであるかコンセンサスが得られていないこと、③生物学的アッセイの実施に長期の時間及び多額の費用を要すること、④ウイルスに比べて物理的・化学的抵抗性が高いこと、などの理由から、PrP^{sc}クリアランス試験から得られるRFに対する信頼性は、現在のところウイルスクリアランス評価におけるRFに比べて低くなることは否めない。しかし、このことが医薬品等のPrP^{sc}リスク評価を実施しないとする理由にはならず、医薬品等の製造／輸入業者は各自の製造工程に

ついて公表データ等を参考にしながら責任をもって注意深く評価すべきであると考え。実験室レベルでの慎重な PrP^{sc} クリアランス評価の結果が、医薬品等の PrP^{sc} 安全性確保に関する有用な情報を提供することになり、さらに、これらの蓄積により安全対策の向上につながることを期待される。

当該指針においては、スパイクに用いる病原体試料として、未精製の脳破砕液、ミクロソーム画分、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選択肢が多種存在するが、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するよう述べられている。指針では、上記4種の中で、①精製 PrP^{sc} は他の3種に比べて容易に沈殿したとの報告があること、②最も大きい凝集体が除去され、かつ高いレベルの感染性を保持しながら試料が均一となるよう調製されていると推察されるため、ミクロソーム画分が最も適切であるかも知れないこと、が指摘されている。しかし、これはあくまで上記4種の試料間で比較を行った上での指摘であり、①高いレベルの感染性を保持し、かつ②均一な試料であり、かつ③ミクロソーム画分に比べてより粒子サイズの小さいプリオン試料の調製が可能となれば、粒子サイズが小さいほど凝集・沈殿や物理的除去に対する抵抗性が高まると推測されることから、指針においてスパイク用試料としての使用が推奨されている「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」に該当し、クリアランス評価に最適なスパイク用病原体試料の候補となる可能性が高いと考えられる。

3. クリアランス評価に適した PrP^{sc} 分画の調製法

プロセスバリデーションのスパイク材料として精製度の高い PrP^{sc} を使用した方がよいと考え、脳から定法により精製した PrP^{sc} * DLPC 処理することにより粒子サイズの小さい PrP^{sc} を得ようと試みたが、100,000 × g の遠心ではすべて沈殿した。精製過程の分別遠心により強固な凝集体が形成されることが一因と考えられる。一方、脳乳剤から 0.5 ~ 1.0 % Sarkosyl で抽出される分画には、100,000 × g でも沈殿しないが、PK 抵抗性を示す PrP^{sc} が全体の約 30 % 存在した。このことは、この分画が適切なスパイク材料として使用可能であることを示唆している。本研究はマウススクレイピーを使用しているが、これまで BioReliance 社などで実施されたプロセスバリデーションの大部分ではハムスタースクレイピー 263K 株を使用していることから、今後ハムスター 263K 株を用いて同様の解析を行う必要がある。予備的な実験では、マウススクレイピー帯広株とは異なり、263K 株感染脳から Sarkosyl により抽出される PrP^{sc} は 2 % Sarkosyl で最も多かった。従って、使用するプリオンの株により、それぞれ最適な抽出条件を検討する必要がある。

4. 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

ヒトグリオーマ細胞株 T98G は正常プリオン蛋白質 (PrP^c) を産生し (Kikuchi, Y., *et al.* Biol. Pharm. Bull. 25: 728-733 (2002))、継代を重ねた後に長期間培養すると PK 処理抵抗性の

PrP^{sc}を産生する (Kikuchi, Y., *et al.* J. Gen. Virol. 85: 3449-3457 (2004))。この条件下で T98G 細胞は、PrP の C 末端部位と GPI アンカーシグナル配列が欠落したスプライス変異型の mRNA を発現していた。その ORF は 230 アミノ酸をコードし、1 ~ 217 残基までは PrP と同じ 1 次構造で、94 % の相同性を有している (図 7)。スプライス変異型 mRNA の発現は、T98G 細胞だけではなく、市販の各種ヒト臓器由来 total RNA で確認された。

生体由来の医薬品原料に対する添加回収実験等の試料としてヒト PrP のみならずスプライス変異型 PrP も用いた場合の検出系を確立すること及びスプライス変異型 PrP の機能解明を目的として、PrP の C 末端及びスプライス変異型 PrP 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。このうち、ヒト PrP の C 末端 218 ~ 230 残基を認識する抗体は、ELISA で遺伝子組換えウシ PrP も固相抗原として認識した。これらのスプライス変異型 PrP や遺伝子組換えウシ PrP などの蛋白質、及び各蛋白質に対する抗体は、医薬品製造工程等における異常プリオン蛋白質の除去技術の評価への利用が期待できる。

本研究で確認したスプライス変異部位は PRNP exon 2 下流の 3' UTR に存在する。この部位に相当するウシ及びマウス exon 3 の 3' UTR の塩基配列はよく保存されており、これらの動物種でもスプライス変異型 PrP の mRNA を発現している可能性がある。異常プリオン蛋白質の産生へのスプライス変異型 PrP mRNA 発現の関与は今のところ不明であるが、次年度以後は、様々な遺伝子組換え医薬品等の製造に用い

られる細胞培養株におけるスプライス変異型 PrP mRNA の発現の有無を、exon-exon junction primer を用いた RT-PCR により確認する予定である。

E. 結論

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 2003 年のカナダ及び米国での BSE 発生等を受けて、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。医薬品等の製造工程でウシ胎児血清を使用する場合も当該基準に適合する必要があることから、他の文献等の調査結果も踏まえて、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 (③参照)。
- 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。医薬品等の 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。血漿分画製剤製造での 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 (EMA) から 2004 年 10 月に示されたことから、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 (100,000 × g) によっても沈殿しない粒子サイズの小さい PrP^{Sc} が十分量 (約 30 %) 存在することを明らかにした。この結果は、プロセスバリデーションの際の適切なスパイク用 PrP^{Sc} として、この画分が使用可能であることを示唆するものと考えられる。
- ⑤ 継代を重ねた後に長期間培養した T98G 細胞において、PrP の C 末端と GPI アンカーシグナル配列が欠落したスプライス変異型 PrP mRNA が発現していることを新たに見出し、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。この mRNA は 230 残基のアミノ酸をコードする ORF を含み、その 1 ~ 217 残基は PrP と共通であった。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、PrP の C 末端及びスプライス変異型 PrP 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。今回新たに見出したヒトのスプライス変異型 PrP や新たに作製した抗スプライス変異型 PrP モノクローナル抗体等は、医薬品製造工程等における異常プリオン蛋白質の除去技術の評価への利用が期待できる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kim, C-L., Umetani, A., Matsui, T., Ishiguro, N., Shinagawa, M., and Horiuchi, M. "Antigenic characterization of an abnormal isoform of prion protein using a new diverse panel of monoclonal antibodies." *Virology* 320(1): 40-51 (2004)
- 2) Kim, C-L., Karino, A., Ishiguro, N., Shinagawa, M., Sato, M., and Horiuchi, M. "Cell-surface retention of PrP^C by anti-PrP antibody prevents protease-resistant PrP formation." *J. Gen. Virol.* 85(11): 3473-3482 (2004)
- 3) Gombojav, A., Ishiguro, N., Horiuchi, M., and Shinagawa, M. "Unique amino acid polymorphisms of PrP genes in Mongolian sheep breeds." *J. Vet. Med. Sci.* 66(10): 1293-1295 (2004)
- 4) Kikuchi, Y., Takeya, T., Sakai, A., Takatori, K., Nakamura, N., Matsuda, H., Yamazaki, T., Tanamoto, K., and Sawada, J. "Propagation of a protease-resistant form of prion protein in long-term cultured human glioblastoma cell line T98G." *J. Gen. Virol.* 85: 3449-3457 (2004)

2. 学会発表

- 1) 金 チャンラン, 堀内 基広. "抗 PrP 抗体による培養細胞レベルでの PrP^{sc} 産生抑制機構の解析." 第 52 回 日本ウイルス学会 (21-23 Nov. 2004, 横浜)
 - 2) 山口 聡子, 宮澤 孝幸, 堀内 基広. "人工合成硫酸化糖アナログによる PrP^{sc} 産生抑制." 第 52 回日本ウイルス学会 (21-23 Nov. 2004, 横浜)
 - 3) Horiuchi, M. "Inhibition of protease-resistant prion protein (PrP) formation by anti-PrP antibodies." The 7th Joint Symposium between Hokkaido University Graduate School of Veterinary Medicine & Seoul University College of Veterinary Medicine, The 6th COE International Symposium for Zoonosis Control (8 Jul. 2004, Sapporo, Japan)
 - 4) Horiuchi, M., Tamura, Y., and Furuoka, H. "Comparative analyses of three mouse-adapted scrapie strains G1, Obihiro, and I3/I5 and pathogenesis of G1 strain-induced polyuria in ICR mice." International Symposium Prion Disease Food and Drug Safety (31 Oct.- 2 Nov. 2004, Sendai, Japan)
 - 5) Horiuchi, M., Kim, C.-L., Ogino, M., Furuoka, H., and Shinagawa, M. "Cell surface retention of PrP^c by anti-PrP antibody prevents protease-resistant PrP formation." International Symposium Prion Disease Food and Drug Safety (31 Oct.- 2 Nov. 2004, Sendai, Japan)
 - 6) Horiuchi, M. "BSE screening in Japan." The animal prion disease and USE (14-16 Oct. 2004, Ames, USA)
 - 7) 菊池 裕, 掛谷 知志, 酒井 綾子, 松田 治男, 山崎 壮, 棚元 憲一, 池田 喜久子, 山口直人, 澤田純一, 高鳥浩介. "低酸素濃度下で培養したヒトグリオブラストーマ T98G 細胞株のスプライシング変異プリオン蛋白質遺伝子の発現." 第 77 回日本生化学会大会 (13-16 Oct. 2004, 横浜)
 - 8) Kikuchi, Y., Kakeya, T., Sakai, A., Matsuda, H., Yamazaki, T., Tanamoto, K., Ikeda, K., Yamaguchi, N., Sawada, J., and Takatori, K. "Expression of a splice variant of prion protein during hypoxia in human glioblastoma cell line T98G." International Symposium Prion Disease Food and Drug Safety (31 Oct.- 2 Nov. 2004, Sendai, Japan)
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
1. 特許取得
本年度は該当なし。
 2. 実用新案登録
本年度は該当なし。
 3. その他
本年度は該当なし。

異常プリオンの除去／不活化工程の評価に関する研究

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

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

研究要旨

- ① ウシ海綿状脳症（BSE）の国際的な発生動向や最新の科学的知見を踏まえて、生物由来原料基準が 2004 年に 2 回改訂され、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。医薬品等の製造工程でウシ胎児血清を使用する場合も当該基準に適合する必要があることから、他の文献等の調査結果も踏まえて、細胞培養技術応用医薬品等について一定の異常プリオン（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（③参照）。
- 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。医薬品等の 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。2004 年 10 月に欧州医薬品審査庁（EMA）から血漿分画製剤製造での TSE クリアランス評価のための指針が示されたことから、当該指針を基づきながら、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伝達性海綿状脳症（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。

A. 研究目的

遺伝子組換え技術応用医薬品等、細胞培養を用いて生産される細胞培養技術応用医薬品の製造では、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等反芻動物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、これら医薬品等の BSE 安全性確保のた

めの予防的な対策が求められている。

わが国においても、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、医薬品等の原材料が由来する反芻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。本基準については、その後の BSE 発症国の拡大及び

最新の科学的知見の蓄積を踏まえて、これまでも 2004 年 3 月及び 7 月に改正が実施される等、規制当局による適切な対応がとられている (C.1 及び資料①参照)。しかしながら、今後さらに発症国が拡大し得ること等の懸念を考慮すると、BSE に関する安全対策として、これら「動物原産国の地理的リスク」及び「採取部位のリスク」に基づくリスク管理 (BSE の疑いのある動物の混入及びリスクの高い部位の混入の防止も含めて) のみでは不十分であり、これらの管理と併せて、反芻動物由来原材料から混入又は製造中に迷入する可能性のある異常プリオン (PrP^{sc}) が医薬品等の製造工程中で十分に除去/不活化されることをあらかじめ定量的に評価・確認した上で、製造工程を厳重に管理する必要がある。

わが国でもこのような観点から、血漿分画製剤については、2003 年 4 月に「血漿分画製剤の製造工程においては異常プリオンが除去されることを示す文献報告があるところであるが、血漿分画製剤の製造業者等においては、異常プリオンの除去に関して、スパイクテストを行う等の方法により、バリデーションの実施により確認することを検討すること。」(厚生労働省医薬局長通知 医薬発第 0414004 号、2003 年 4 月 14 日)

が求められており、さらに同年 7 月には、より踏み込んだ内容として

「(1) 血漿分画製剤の製造工程における異常プリオン除去に関する評価方法については、国際的にコンセンサスが得られた統一的な基準がないところであるが、製造業者等はその評価に用いることができる情報を最大限収集し、また、必要

に応じて実験を重ねながら、自主的に自社製品の安全性を確認する必要があること。

(2) 安全性の確認方法は当面、スパイクテストによるバリデーションに限定するものではないが、入手できる情報及び実験結果に基づき合理的に安全性の検証を行う必要があること。」(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、2003 年 7 月 25 日)

などを求める通知が発出されている。

また、血漿分画製剤以外にも、BSE 発生国等を原産国とするウシ等由来原材料を用い、かつ原材料切替えが困難な医薬品等、「特に、遺伝子組換え品等の細胞培養を用いた製品」については、2003 年 8 月に

「(1) 原材料の切り替えを行うことが困難な場合は、当面、別添の…(中略)…を参考に当該製品の BSE に係る理論的なリスクの点検を行い、点検結果を添付して、当該原材料の使用を継続する旨の一部変更承認申請を行うこと。その場合、別添の考え方は、あくまで現時点での典型的な事例と考え方を示したものであり、今後のリスク評価の進展に応じて変更される可能性があることに留意すべきであること。

(2) (1)において、特に、遺伝子組換え品等の細胞培養を用いた製品については、より慎重に製造工程でのプリオンに関するクリアランス、医療上のリスク・ベネフィットを勘案して、製品個別に当該原材料の使用の適否について評価す

るべきものであること。」(厚生労働省医薬食品局審査管理課長・同安全対策課長通知 薬食審査発第 0801001 号・薬食安発第 0801001 号、2003 年 8 月 1 日)

などを明確に求める旨の通知が発出されている。

しかしながら一方で、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、2003 年 7 月付け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にも明記されているとおり、国際的にコンセンサスが得られた統一的な基準が存在していないのが現状であり、PrP^{sc} 除去/不活化工程についての定量的かつ普遍的な評価・検証方法を早急に確立することが社会的に求められている(世界保健機構(WHO)から、PrP^{sc} に対する標準的ないは推奨される処理方法が示されているが(WHO Laboratory Biosafety Manual 2003)、これらの条件は細胞培養技術応用医薬品に代表される蛋白質性医薬品に対しては苛酷であり、ほとんどの場合、適用できない)。PrP^{sc} 除去/不活化工程に対する評価・検証方法がひとたび確立すれば、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となるとともに、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が期待できる。

本研究では、ウシ等反芻動物由来原材料を用いて製造される医薬品の製造過程で実施される種々の PrP^{sc} 除去/不活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。本年度は、2004 年 10 月に欧州医薬品審査庁(EMEA)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ことから(ヒト用医薬品委員会(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))、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、本研究の目的に直結するものとして当該指針を採り上げ、PrP^{sc} クリアランス評価における要点を明らかにする。さらに、現在わが国で承認されている血漿分画製剤に関して、各製造工程の PrP^{sc} クリアランス能の情報を収集・整理する。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、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

今回報告する研究内容は、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結果である。

(倫理面への配慮)

今回報告する研究内容は学術論文等の公表資料を対象としていることから、倫理面の問題は存在しない。

C. 研究結果

1. 反芻動物由来原料基準（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（2003年厚生労働省告示第210号（2003年5月20日）；資料①）。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年制定当初においては、①反芻動物の下垂体、胸腺、硬膜、松果体、脊髄、胎盤、腸、脳、脳脊髄液、脾臓、副腎、扁桃、眼及びリンパ節の14部位を医薬品等の原材料に用いてはならないこととされ、さらに、②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は、アメリカ合衆国、アルゼンチン、インド、ウルグアイ、エルサルバドル、オーストラリア、カナダ、ケニア、コスタリカ、コロンビア、シンガポール、スワジランド、チリ、ナイジェリア、ナミビア、ニカラグア、ニュージーランド、パキスタン、パナマ、パラグアイ、ブラジル、ボツワナ及びモーリシャスの23カ国でなければならず、また、乳を原材料として用いる場合には、英国及びポルトガル以外の国でなければならないこととされていた。加えて、③反芻動物に由来する原材料について、品質及び安全性の確保上必要な情報が確認できるよう、原産国、原材料を作製した年月日、原

材料の由来となる反芻動物の飼育又はと畜の状況、原材料について伝達性海綿状脳症を防止するための処理及び作業の経過並びに原材料のロットの番号について医薬品等の製造業者に記録の保存が義務付けられた。さらに、医薬品については、治療上の効果が当該原材料を用いることによるリスクを上回る場合など必要な場合にかぎり、①及び②に適合しない原材料をやむを得ず使用することができるの特例措置が設けられた。

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（厚生労働省医薬局長通知 医薬発第0522002号、2003年5月22日）。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（Geographical Risk of Bovine Spongiform Encephalopathy（GBR））の結果公表（Vossen, P., *et al.* "Overview of the BSE risk assessments of the European Commission's Scientific Steering Committee (SSC) and its TSE/BSE ad hoc Group -Adopted between September 1997 and April 2003." (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（2004

年厚生労働省告示第 157 号、2004 年 3 月 30 日)。

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(厚生労働省医薬食品局長通知 薬食発第 1225005 号、2003 年 12 月 25 日)。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

ヤスの 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(2004 年厚生労働省告示第 262 号、2004 年 7 月 5 日；厚生労働省医薬食品局長通知 薬食発第 0705001 号、2004 年 7 月 5 日；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、生物由来原料基準改正前に同内容の通知が発出されている(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))。

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(例えば、カプセル剤や添加剤として汎用されるウシ骨由来ゼラチンの約 30 %、コンドロイチン硫酸ナトリウムの約 90 %、コール酸の約 50 %、胆汁エキス末の 85 ~ 90 %、細胞培養技術応用医薬品等の製造に用いられるウシ胎仔血清の約 45 %が米国产(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))、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。

2. vCJD リスクに関する血漿分画製剤の製造工程の評価に関する EMEA ガイドライン

2004 年 10 月に欧州医薬品審査庁(EMEA)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(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)。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。当該指針の内容を以下に示す。

2.1. 背景

変異型のクロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) に代表されるヒトの伝達性海綿状脳症 (TSE) について、1998年1月、1999年1月、1999年12月、2000年5月、2000年12月、2002年6月及び2004年1月に EMEA の専門家会議/ワークショップで議論され、変異型 CJD (vCJD) と血液由来医薬品に関する CHMP の見解声明の改訂版が 2004年6月に発行された (CHMP, EMEA. "CHMP Position Statement on Creutzfeldt-Jakob Disease and Plasma-derived and Urine-derived Medicinal Products." (EMEA/CPMP/BWP/2879/02/rev 1, 23 Jun. 2004); 資料③、④ (和訳))。

vCJD は 1996 年に同定された。2004年8月1日現在での英国における vCJD 患者数は、vCJD 確定診断例及び疑い例を合わせて 147 例であった (香港での 1 例は、英国の症例として、英国の患者数に含まれる)。英国外では、アイルランドで 1 例、米国で 1 例及びカナダで 1 例が発生しているが、これらはおそらく英国内で感染した症例である。しかし、フランスの 7 例及びイタリアの

1 例は、いずれも英国の滞在経験はなかった。他の国で症例が発生している可能性は除外できない。これまでにジェノタイプ解析が行われたすべての vCJD 臨床症例において、プリオン蛋白質遺伝子の 129 番目のコドンはホモ接合体 (Met-Met) である。しかし、vCJD を発症していないものの明らかに感染している症例が最近報告された。その症例では、129 番目のコドンがヘテロ接合体 (Met-Val) であった (Peden, A. H., *et al.* Lancet 364: 527-529 (2004))。

ウシにおけるウシ海綿状脳症 (BSE) の病原体が vCJD の原因であるとの強い証拠が存在する。最も可能性の高いと思われる仮説は、BSE に汚染された食物を摂取することによって vCJD が引き起こされるといえるものである。

今後発生する vCJD の症例数に関しては、まだ不確実な点が残っている。孤発性 CJD とは対照的に、リンパ網内系に TSE 病原体が多量に含まれるとの証拠から、未発症の感染者の血液又はそこから製造された血液製剤を介して TSE が感染する可能性が懸念されている。

TSE のげっ歯類の実験モデルから得られたデータから、血液成分により感染が起こることが明らかとなった (Brown, P., *et al.* Transfusion 38: 810-816 (1998); Brown, P., *et al.* Transfusion 39: 1169-1178 (1999); Taylor, D. M., *et al.* J. Hosp. Infect. 46: 78 (2000); Cervenakova, L., *et al.* Transfusion 43: 1687-1694 (2003))。また、マカクザルで馴化された BSE の系統を実験的に感染させたハイイロネズミキツネザルのバフィーコー

トに感染性があることも見出されている (Bons, N., *et al.* Transfusion 42: 513-516 (2002))。同種内での輸血実験からは、実験的な BSE 又は天然型のスクレイピーの感染が輸血によってヒツジの間で伝達可能であることが示された (Hunter, N., *et al.* J. Gen. Virol. 83: 2897-2905 (2002))。一方で、野生型マウス (Bruce, M. E., *et al.* Lancet 358: 208-209 (2001))、トランスジェニックマウスや霊長類を用いてヒト血液の vCJD 感染性を検出する試験においては、一部の試験は依然進行中であるものの (Cervenáková, L., *et al.* Haemophilia 8: 63-75 (2002))、ヒト血液によって vCJD が伝達するという結果はこれまでにまだ得られていない。しかし、英国供血者の血液を輸血された例の追跡調査を行ったところ、vCJD の症状を後日発現した供血者からの赤血球を輸血された 2 例において、2 次感染の可能性があることが明らかになっている (Peden, A. H., *et al.* Lancet 364: 527-529 (2004); Llewelyn, C. A., *et al.* Lancet 363: 417-421 (2004))。血友病患者のような血漿分画製剤を高頻度に使用するハイリスク集団を対象にした調査疫学調査では、血漿分画製剤の投与による CJD の発生は現在までに 1 例も確認されていない (Cervenáková, L., *et al.* Haemophilia 8: 63-75 (2002); Ricketts M. N., *et al.* Clin. Lab. Med. 23: 129-137 (2003))。血漿分画製剤を介して vCJD が感染し得るか否かについて結論するためには、疫学的事例があまりに不足している。2004 年 2 月現在、血漿由来製品の投与経験のある vCJD の症

例は確認されていない (Llewelyn, C. A., *et al.* Lancet 363: 417-421 (2004))。

英国は BSE に最も曝露されており、その他の国よりもかなり多くの vCJD 症例が発生していることから、予防の措置として、英国供血者の血漿は現在血漿分画製剤の原料として使用されていない。フランス供血者の血漿は、リスクベネフィットの点でベネフィットがまさるとみなされ、現在血漿分画製剤の原料として使用されている。もし将来ついに他の国で vCJD の症例が一定期間内に数例報告された場合であっても、TSE 感染性を減少させることができるとすでに判明している工程が血漿分画製剤の製造に用いられていれば、過去の血漿分画製剤の安全性を改めて担保することができるであろうし、血漿分画製剤の原料として引き続き利用することを正当化するための助けになる。

2.2. 本指針の適用範囲

仮に原料となるヒト血漿中に vCJD の原因物質が存在しても、血漿由来製品の製造工程において感染性が減少するであろうことは、これまでのデータから示されている。2004 年 6 月の CHMP 見解声明においては「血漿分画製剤の製造者は、自分たちの採用する個々の製造工程について、それにより感染性を減らすことができるかどうかを、段階的アプローチを用いて見積もる必要が現在ある」とされている。

本ガイダンスの目的は、vCJD リスクに関して製造工程を評価する方法についてのガイダンスを提供する

ことである。最終決定的なガイダンスを公表するためには、この領域における現時点での経験の蓄積は十分ではない。したがって、本ガイドラインでは現時点までの経験に基づくアドバイスを提供するが、他のアプローチも受け入れられる可能性がある。本文書は、上に引用した 2004 年 6 月の CHMP 見解声明(改訂版)、特に「9.2.3 血漿由来製品の製造工程」の項と併せて読むことが非常に重要である。当該見解声明に記載されているとおり、関連する管轄官庁と十分に相談することを勧める。そして、CHMP 及び CHMP バイオテクノロジー作業部会 (BWP) も、新たに発生した問題について議論するために利用できるであろう。

2.3. 実験室レベルでの TSE クリアランス評価

2.3.1. 一般的原則

ウイルスの除去／不活化のバリデーション評価に関するガイダンス (CPMP, EMEA. "CPMP Note for Guidance on Virus Validation Studies: the Design, Contribution and Interpretation of Studies Validating the Inactivation and Removal of Viruses." (CPMP/BWP/268/95, 14 Feb. 1996)) で概説されている一般的原則を、TSE 病原体に関しても可能なかぎり拡張して適用すべきである。

製造工程から得られた試料に対してスパイクする、適切に調製された病原体溶液の容積は、元の試料の 10 % を超えてはならない。また、TSE の除去／不活化に関する評価は、正確にスケールダウンした実験室レベルのモデルで実施しなければならない

い。これらの実験は、実生産の現場から明確に隔離された場所において、よく制御され、かつ文書により管理された方法により、適切な資格のある人員が実施しなければならない。ウイルスバリデーション評価と同様に、スケールダウンしたモデルの妥当性について、関連するプロセスパラメータの値及びそのモデルの性能が適切であると示すことによって、明らかにしなければならない。

除去／不活化への寄与が期待される工程のみを評価すればよい。TSE 病原体は、血漿分画製剤の製造工程中で通常用いられる、ウイルスを不活化する物理化学的条件のほとんどに対して抵抗性を示すと考えられている。したがって、評価の対象として、冷エタノール分画、PEG 沈殿、クロマトグラフィー及びウイルスろ過のような除去／分配工程に焦点があたるであろう。

ウイルスバリデーション評価においては、このような除去工程については、当該病原体が異なる画分に存在することを明らかにすると共に、その工程のもつ当該病原体の除去／不活化能に影響を与えるパラメータについても調査することとされている (CPMP ガイダンス (CPMP/BWP/268/95) 5.5 項参照)。TSE に関する研究は、従来の病原体に関する研究と比べてはるかに困難で、かつはるかに費用もかかる。そのため、実験室レベルでの試験デザインの妥当性を示す根拠の一部として、理論的根拠に基づき工程の頑健性を評価すること、及び適切にバリデートされた *in vitro* でのアッセイの結果を利用することは受け入れら

れる場合がある。製造パラメータの変動によって除去の効率は大きく影響を受ける可能性があるため、注意が必要である。したがって、分配工程についての評価研究のデザインを行う際には、工程内管理試験における限度値が重要である。当該研究においては、異なる画分にプリオンが実際に分配されていることを、*in vitro* のアッセイにより評価する必要がある。1 未満のクリアランス指数は重要でない。

最初にスパイクする力価が十分に高ければ、2（又はそれ以上の）工程を併せて評価できる場合もある。このような複数工程を併せて評価する場合には、それぞれの工程での各クリアランス指数及び複数工程全体のクリアランス指数を求めるために、各中間段階での試料についても分析を行うよう試験を設計すべきである。このような複数工程に対する評価は、各工程のクリアランス指数が小さい又は比較的小さい場合において各クリアランス指数を加え合わせて評価することの妥当性を示すために有用となる可能性がある。さらに加えて、TSE 病原体の物理化学的状態が大きく変化して、次の除去工程における除去効率に影響を与える可能性がある場合（例えば、ろ過工程に先立って実施される界面活性剤による処理）、複数工程を併せて評価することは有用となる可能性がある。一連の全製造工程をまとめて評価することは理想的な到達点であろう。しかし、ウイルスの場合と同様に、最初にスパイクする病原体の力価が、多くの場合、1 ないしは 2 工程以上の複数の工程を評価するには

あまりに低い、という実験上の制約がある。

考慮すべき要点は、以下のとおりである。

- ・ 工程のスケールダウン
- ・ スパイクする病原体の選択
- ・ アッセイ法の選択
- ・ 製造工程の選択
- ・ データの解釈と限界
- ・ TSE クリアランスの再評価
- ・ 設備の消毒

2.3.2. 工程のスケールダウン

実験室レベルでの TSE クリアランス評価において実生産スケールでの製造プロセスをスケールダウンする際の原則は、ウイルスバリデーション評価の場合と同じである。実生産スケールでの製造工程を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に関するデータを、製造者は提出する必要がある。これらのデータは、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なければならない。

2.3.3. スパイクする病原体の選択

TSE 病原体に実験的に感染させた動物でのデータによれば、血液中でも感染性が見出され、そのうちの約半分が血漿に、半分がバフィーコートに存在している (Brown, P., *et al.* *Transfusion* 38: 810-816 (1998))。しかしながら血液中の感染性の程度は低く、脳に見出される感染性の少なくとも 10,000 倍以下である。そのため、スパイクするための病原体試料を調製するためには、脳組織が事実上唯一の材料である (Brown, P., *et*

al. Transfusion 39: 1169-1178 (1999))。スパイクする病原体試料は可能なかぎり力価の高いものを用いるべきではあるが、病原体試料を添加する元の試料溶液の性質を変化させることを回避するため、試料溶液に添加する病原体試料の容積は試料溶液の総容積の 10 %を上回ってはならない。

考慮すべき主な点は以下のものである。

- ・ スパイクする病原体の系統及びその調製に用いられた動物種
- ・ スパイクする病原体の物理化学的性質

2.3.3.1. 種及び系統

スパイクする病原体試料の調製に用いられる原材料は、入手可能性、アッセイ結果、ヒト血漿に存在する可能性のある感染性と類似した性質をもっているかどうか、などの要因を考慮して決定する。vCJD の症例から直接得た生体試料を供給・使用することは、倫理的観点及び他の理由から制限される。vCJD の生物学的アッセイには正常マウスを用い、かつ vCJD の患者から得た病原体試料をスパイク実験に使用した例が少なくとも 1 報以上の文献で報告されてはいるものの (Stenland, C. J., *et al.* Transfusion 42: 1497-1500 (2002))、vCJD そのものの使用は強制ではない。適切な品質の原材料を得ることが実際には困難であるが、原則的には BSE 感染ウシからの大量の脳を利用できる可能性がある。原材料のアッセイも困難な場合がある。これは BSE 感染ヒツジにもあてはまるし、スクレイビー感染ヒツジでは特

にそうである。デモンストレーション的な場合を除き、例えば、ある工程がモデルとして用いた病原体のみならず vCJD の病原体も除去することを示すためには、げっ歯類で馴化された TSE (例えば、スクレイビー、家族性 CJD、BSE 又は vCJD) の実験株を使うことが最も合理的であるように考えられる。実験株は病原性及び系統の性質が互いに異なっていることから、いくつかの系統について研究が行われている。当該研究で実施されているアッセイの原理は、十分に確立しているものである。これまでに公表された当該研究の結果からは、熱に対する抵抗性は病原体の系統ごとに異なる可能性がみられたが (Taylor, D. M. Veterinary J. 159: 10-17 (2000) ; Somerville, R. A., *et al.* J. Biol. Chem. 277: 11084-11089 (2002))、除去工程の評価においては由来する動物種又は病原体の系統による明白な差異はみられなかった (Stenland, C. J., *et al.* Transfusion 42: 1497-1500 (2002))。除去工程の評価に際しては、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。但し、いずれの場合においても、系統を選択した理論的根拠は示さなければならない。

2.3.3.2. スパイクする病原体の物理化学的性状

動物実験では血中に TSE 感染性が明らかに見出されているものの、血中における TSE 病原体の物理化学的性質はこれまで知られていない。血中にある TSE 病原体が脳以外の組織から由来していると仮定す

るならば、それは脾臓由来である可能性があることが示唆されている。しかしながら、その報告の中で示されているモデル系において、血中の感染性が何に由来するのかは明確ではない。脳が変性するにつれて TSE 病原体が血中に放出されている可能性もあり、その場合にはスパイクする病原体を調製するための材料として脳が適切であろう。他方、PrP^{Sc} の不溶性高度凝集塊を含む脳組織が、血中に存在する感染性プリオンに似ているかどうかは不明である。重要なことは、スパイクする病原体の物理的性質について様々な可能性を慎重に考慮することである。

Vey らはハムスター脳の破碎液に由来する 4 種類の病原体を用いて研究を行った (Vey, M., *et al.* *Biologicals* 30: 187-196 (2002))。

① 未精製の脳破碎液

TSE 感染性に関する公表文献において、未精製の脳破碎液が広く使われている。未精製の脳破碎液は最も高い感染性をもつ。このような試料を用いて研究を実施する場合、試料の均一性と再現性が重要な要因となるであろう。もし試料中の粒子サイズが広い範囲に及ぶのであれば、それに対応するようろ過などの物理的技術により広い範囲の除去を行う必要があるかも知れない。試料調製の再現性も、得られる試験成績の信頼性を判断する際に重要な要因となる可能性がある。

② ミクロソーム画分

ミクロソーム画分は脳破碎液を分画遠心することによって調製さ

れる。このため、大きな凝集体は除去され、膜に結合している感染性のみが反映される。感染性の程度は未精製破碎液に比べて低いものの依然として高度であり、ミクロソーム画分試料は未精製の脳破碎液に比べてより均一であることが期待できる可能性がある。

③ カベオラ様ドメイン (CLD)

カベオラ様ドメインは、脳破碎液を界面活性剤で溶解後、ショ糖密度超遠心分離を行うことによって調製される。感染性の程度はミクロソーム画分より低く、細胞から放出された膜ドメインのようにみえることもある。

④ 精製 PrP^{Sc}

精製 PrP^{Sc} は、脳破碎液から繰り返し界面活性剤で抽出を行い、さらに塩析及び超遠心分離を行うことにより調製される。これは、細胞又は膜と結合していない場合の形状を反映している。このような方法によって調製された精製 PrP^{Sc} が、天然に存在する PrP^{Sc} と類似しているかどうかは明らかでない。

沈殿処理における挙動を調べた結果、3 つの膜結合型のスパイク用病原体試料 (破碎液、ミクロソーム画分、CLD) はいずれも同様の挙動を示し、TSE クリアランス評価に用いる試料としてこれらの 3 つのタイプはいずれも適切である可能性が示された。最も大きい凝集体が除去され、かつ高いレベルの感染性を保持しながら試料が均一となるよう調製されているであろうことから、ミクロソ

ーム画分が最も適切であるかも知れない。これら3種とは対照的に、精製 PrP^{sc} は膜画分の試料3種のどれよりも容易に沈殿した（クリオ沈殿に含まれた）。スパイクする病原体として他のタイプのものを選択することも可能である。

このようなスパイク用試料の挙動が血漿中に存在する可能性のある感染性の形状を反映しているかどうかは明らかでない。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病原体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試料を選択した理論的根拠は示さなければならない。

2.3.4. アッセイ法の選択

感染性アッセイは、TSE 病原体検出のためのゴールドスタンダードとして受け入れられている。組織又は体液中の病原体は、適切な動物モデルにおける感染によって存在が確認される。つまり、動物モデルに投与して潜伏期間の後に神経系疾患の発現がみられれば、病原体が存在することの証拠である。感染性は動物を用いたエンドポイント力価測定法により測定される。感染性を測定するためのエンドポイント力価測定法を対照として十分バリデートされているならば、試料中に存在する感染性を定量するために、潜伏期間の長さを指標として用いることも可能であるかも知れない。感染における種差の存在並びに病原体の由来する動物種及び病原体の系統の影響によっ

て、アッセイに使用可能な試料の種類は限定される。例えば、ヒトから得られた孤発性 CJD 試料は、アッセイ用の動物としてトランスジェニックマウスが作製されているが、野生型マウスに対して感染を起こすことは稀である。上述のスパイクする病原体の選択において、この点は考慮すべき要因の1つである。しかしながら、潜伏期間のために、動物に投与後、最も速いもの（例：ハムスター 263K モデル）でも少なくとも6～9カ月間、非トランスジェニック型のモデルマウスにおいては15～18カ月もの期間中、観察・臨床的モニタリングを行わなければならないことから、動物を用いたアッセイ（生物学的アッセイ）の実施は非常に煩雑である。それに加えて、1つの生物学的アッセイにおいても、感染性病原体ないしは病原体の系統と、それが投与される動物の組み合わせ方は、用いる試料の性質によって限定される。換言すれば、バリデーション評価においては、スパイクする試料として使用可能なすべての種類の感染性物質について、ある特定の動物種又はある特定の病原体の系統のみを用いて確認することは不可能である。この点は、ヒト TSE の分配／不活化能を示す製造工程に対してバリデーション評価のための試験を設計する際に困難をもたらすさらなる制限となる。

生物学的アッセイは、専用の実験室及び動物室内で、使用する病原体の系統に応じて定められた封じ込め条件下（性質が詳しく調べられているスクレイビーの系統であればレベル2、ヒト及び BSE の系統であれば