

厚生労働科学研究費補助金  
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

# 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 17 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山口 照英

平成 18 (2006) 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(現:生物薬品部 部長))

## II. 分担研究報告

1. 製造工程がもつ異常型プリオンの除去能等の評価に関する研究 ..... 33  
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)
2. プロセスバリデーションに適した PrP<sup>Sc</sup> 分画の調製法及び膜ろ過試験によるプリオン除去効果に関する研究 ..... 57  
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. 異常型プリオンの処理方法の能力評価に関する試験研究 ..... 63  
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 ..... 71

## IV. 研究成果の刊行物・別刷 ..... 73

1. Hidefumi Furuoka, Atushi Yabuzoe, Motohiro Horiuchi, Yuichi Tagawa, Takashi Yokoyama, Yoshio Yamakawa, Morikazu Shinagawa, and Tetsutaro Sata. "Effective antigen-retrieval method for immunohistochemical detection of abnormal isoform of prion proteins in animals." *Acta Neuropathologica* 109(3): 263-271 (2005) ..... 75
2. Osamu Inanami, Shukichi Hashida, Daisuke Iizuka, Motohiro Horiuchi, Wakako Hiraoka, Yuhei Shimoyama, Hideo Nakamura, Fuyuhiko Inagaki, and Mikinori Kuwabara. "Conformational change in full-length mouse prion: A site-directed spin-labeling study." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 335(3): 785-792 (2005) ..... 84
3. Akiko Iwata, Teruhide Yamaguchi, Kouei Sato, Noriko Yoshitake, and Akio Tomoda. "Suppression of proliferation of poliovirus and porcine parvovirus by novel phenoxazine, 2-amino-4,4 $\alpha$ -dihydro-4 $\alpha$ -7-dimethyl-3H-phenoxazine and 3-amino-1,4 $\alpha$ -dihydro-4 $\alpha$ -8-dimethyl-2H-phenoxazine-2-one." *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 28(5): 905-907 (2005) ..... 92
4. Yukio Yamamoto, Yoshiko Akita, Shigeyuki Tai, Susumu Fukasaku, Teruhide Yamaguchi, Tadashi Oshizawa, Kazuko Yamaoka, Mariko Shimamura, and Tadahiko Hazato. "Two-dimensional electrophoresis of disease-associated proteins in human cerebrospinal fluid from patients with rheumatoid arthritis." *Journal of Electrophoresis* 49(1): 23-27 (2005) ..... 95

5. Yasuhisa Kurosaki, Naotaka Ishiguro, Motohiro Horiuchi, and Morikazu Shinagawa. "Polymorphisms of caprine PrP gene detected in Japan." *Journal of Veterinary Medical Science* 67(3): 321-323 (2005) ..... 100
6. Natsumi Kataoka, Masakazu Nishimura, Motohiro Horiuchi, and Naotaka Ishiguro. "Surveillance of chronic wasting disease in sika deer, *Cervus nippon*, from Tokachi district in Hokkaido." *Journal of Veterinary Medical Science* 67(3): 349-351 (2005) ..... 103
7. 堀内 基広. "BSE 診断法の開発と現状." *Virus Report* 2(1): 20-27 (2005) ..... 106
8. 堀内 基広. "人獣共通感染症としてのプリオン病." *ウイルス* 55(1): 45-55 (2005) · ..... 114
9. 水沢 左衛子, 岡田 義昭, 堀内 善信, 田中 建志, 佐藤 功栄, 金子 健二, 佐々木 祐子, 田中 利明, 伴野 丞計, 友水 健雄, 速水 照一, 土方 美奈子, 平子 一郎, 真弓 忠, 三上 貢一, 三代 俊治, 宮本 誠二, 牟田 健吾, Thomas Weimer, Todd Gierman, 小室 勝利, 山口 照英. "C型肝炎ウイルス RNA の遺伝子検査法のための第一次国内標準品の作製." *日本輸血学会雑誌* 51(5): 515-519 (2005) ..... 121
10. 堀内 基広. "動物由来感染症としてのプリオン病." *日本臨牀* 63(12): 2213-2220 (2005) ..... 126
11. 堀内 基広. "異常型プリオン蛋白質の生合成と伝達." *膜* 30(2): 78-83 (2005) · 133

## 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 部長 (現：生物薬品部 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異常型プリオン (PrP<sup>Sc</sup>) 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 PrP<sup>Sc</sup> 安全性を担保するためには、製造工程での PrP<sup>Sc</sup> の不活化/除去能の評価が重要である。本研究では、細胞培養技術を用いて製造される遺伝子組換え医薬品等の原材料から培養・精製工程までを含めた製造工程における PrP<sup>Sc</sup> 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、科学的見地により合理的な医薬品等の品質・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。

本年度は以下のような研究成果が得られた。

- ① プリオン (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 を T98G 細胞が発現し、継代を重ねた後に長期間培養すると発現量が増加することを確認した。スプライス変異型 PrP mRNA の発現量は PrP mRNA の 0.002 ~ 0.004 % であった。また、スプライス変異型 PrP 蛋白質の C 末端部位を認識する抗体を用いた間接免疫染色法によって、スプライス変異型 PrP 蛋白質が核へ移行することが推定された。
- ② ミクロソーム画分から 3 % Sarkosyl (*N*-ラウロイルサルコシナトリウム) を用いて抽出した PrP<sup>Sc</sup> 画分を、プロセスバリデーションのスパイク用病原体試料として用いることの有用性を検証した。

人免疫グロブリン製剤製造工程における孔径 0.22  $\mu\text{m}$  のろ過膜によるろ過工程をモデルとして、ミクロソーム画分、1 % Sarkosyl 処理ミクロソーム画分及び 3 % Sarkosyl 抽出ミクロソーム画分をそれぞれスパイク用病原体試料としてリン酸塩緩衝液 (PBS) に添加し、これらを PrP<sup>Sc</sup> クリアランス試験に用いたところ、ろ過膜による PrP<sup>Sc</sup> の除去効率はいずれも同程度であり (クリアランス指数 (RF) が 0.6 ~ 0.8)、PrP<sup>Sc</sup> はろ過膜を通過した。しかし、ミクロソーム画分及び 1 % Sarkosyl 処理ミクロソーム画分を 5 % 人免疫グロブリン溶液に添加した病原体溶液では、ろ過膜による PrP<sup>Sc</sup> の RF が 2.4 に増大、すなわちろ液中の PrP<sup>Sc</sup> が約 250 分の 1 に減少した。一方、3 % Sarkosyl 抽出ミクロソーム画分を 5 % 人免疫グロブリン溶液に添加した病原体溶液では、PrP<sup>Sc</sup> の RF

は0.7であった。

以上の結果から、粒子サイズの小さい PrP<sup>Sc</sup> 凝集体を使用することによって、より厳密なプロセスバリデーションが可能となることが示唆された。また、スパイク用 PrP<sup>Sc</sup> 試料の種類と添加する試料溶液の組成との組合せによって除去効果の評価結果が変化し得ることを実証した。

③ 本年度発表された Silveira ら及び Kobayashi らの報告を踏まえて、既に発表されているろ過工程での RF に関する報告内容を精査した結果、ろ過による PrP<sup>Sc</sup> の除去効率には概ね次のような傾向が認められた。

(i) 蛋白質濃度が非常に高く、ろ過膜の目詰まりが起こりやすいと考えられる場合を除いては、孔径 100 nm 以上のろ過膜によるろ過では PrP<sup>Sc</sup> の除去は期待できない。

(ii) 孔径 40 ~ 75 nm のろ過膜によるろ過では、若干の PrP<sup>Sc</sup> 除去効果が認められる。但し、ろ過時に界面活性剤 (1 % Sarkosyl) が共存する場合には、ろ過による除去効果は著しく低下する。

(iii) ヒト PrP<sup>Sc</sup>1 型に比べて、ヒト PrP<sup>Sc</sup>2 型では蛋白質の重合度が高く、大きな重合体を形成していることから、ろ過による除去が 1 型より容易である。

(iv) 孔径 35 nm 以下のろ過膜によるろ過は PrP<sup>Sc</sup> の除去に有効である。特に孔径 15 nm 以下のろ過膜を用いたろ過は、1 % Sarkosyl 共存下でも PrP<sup>Sc</sup> を有効に除去することが可能である。

(v) 界面活性剤非共存の条件下、分画分子量 300 kDa のろ過膜を用いたろ過では PrP<sup>Sc</sup> の除去効率は低いが、180 kDa 以下のろ過膜を用いる場合、有効な除去が期待できる。

(vi) 以上より、医薬品等製造工程中のろ過工程で通常用いられる条件下 (界面活性剤非含有、超音波処理なし) では、孔径の小さなろ過膜 (例えば、15 nm) によるろ過が PrP<sup>Sc</sup> 除去に有効である。

④ 欧州医薬品審査庁から平成 16 年 10 月に示された血漿分画製剤の製造における PrP<sup>Sc</sup> クリアランス評価のための指針に基づき、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例として、実生産規模を適切に反映したクリアランス評価用スケールダウン試験系を設計した。

⑤ 現在までに輸血により CJD が感染したと考えられる症例が英国で 3 例報告されているにもかかわらず、血液中に微量存在する PrP<sup>Sc</sup> を直接検出するための試験方法として、これまでの方法は感度・精度や再現性に欠け、輸血用血液製剤や製造工程で使用されるウシ血清の PrP<sup>Sc</sup> 否定試験に実際に応用するには実用性の面で問題があった。しかし、本年度 Castilla ら、Fujita ら及び Orser らにより相次いで報告された新たな試験方法は、詳細なデータが現時点では明らかになっていなかったり実用化の段階にはまだ至っていないものの、医薬品等の PrP<sup>Sc</sup> 安全性を確保する新しい方策の候補として、今後の開発動向に十分注目する必要がある。

分担研究者

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

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

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型プリオン(PrP<sup>Sc</sup>)除去／不活性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<sup>Sc</sup> 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最近 BSE が発生したことなど、医薬品等の製造工程中で PrP<sup>Sc</sup>

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<sup>Sc</sup> 除去／不活性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。細胞培養技術を用いた遺伝子組換え技術応用医薬品等の PrP<sup>Sc</sup> 感染の予防的防御対策として、PrP<sup>Sc</sup> 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<sup>Sc</sup> 除去／不活性化工程についての定量的な評価・検証方法の確立により、医薬品等の PrP<sup>Sc</sup> 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できる。

以上のことから、本研究では、遺伝子組換え技術応用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<sup>Sc</sup> 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ている。

- ① 細胞培養技術応用医薬品の製造用細胞基材における PrP<sup>Sc</sup> 安全性に関する試験研究
- ② 製造工程がもつ PrP<sup>Sc</sup> の除去能等の評価に関する試験研究
- ③ 製造工程がもつ PrP<sup>Sc</sup> の除去能等の評価に関する評価研究

本年度は

1. 上記①に係る研究として、スプライス変異型プリオン (PrP) が TSE に果たす役割を明らかにするために、スプライス変異型 PrP mRNA の発現量が変化する条件を解析し、併せてスプライス変異型 PrP 蛋白質の同定を試みた。(担当：菊池)
2. 上記②に係る研究として、血液製剤製造の最終工程で使用される膜ろ過工程をモデルとして、プロセスバリデーションにおける Sarkosyl (*N*-ラウロイルサルコシナトリウム) 抽出 PrP<sup>Sc</sup> 画分の有用性について検討した。(担当：堀内)
3. 上記③に係る研究として、(i)プロテナーゼ K 抵抗性の異常型プリオン蛋白質 (PrP<sup>Sc</sup>) の重合度と感染性との関係について Silveira らが本年度発表した論文、及び発病までの経過や病状の異なるヒト PrP<sup>Sc</sup> サブタイプ間での重合度の違いに関して Kobayashi らが平成 17 年 1 月に発表した論文等を精査し、特にろ過工程における PrP<sup>Sc</sup> クリアランス評価で使用が推奨されるスパイク用病原体試料の種類について新たに考察を行った。(ii)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例として、平成 16 年度の研究成果を踏まえながら、実生産規模を適切に反映したクリアランス評価用スケールダウン試験系を設計した。(iii)血液中に存在する PrP<sup>Sc</sup> の検出方法に関する報告が本年度相次いだことから、細胞培養に用いるウシ血清、血液製剤等の PrP<sup>Sc</sup> 否定試験として、これら方法が適用可能であるか検証するため、既存の方法との比較検討を行った。(担当：山口、永田)

## B. 研究方法

1. 細胞培養技術応用医薬品の製造用細胞基材における PrP<sup>Sc</sup> 安全性に関する試験研究

### 1-1. 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。

### 1-2. 間接蛍光抗体法

9 cm 組織培養用シャーレ中のカバーグラス上に培養した T98G 細胞をホルマリンで固定後、第 1 抗体として抗 PrP モノクローナル抗体 6H4 及びスプライス変異型 PrP の C 末端に相当するペプチドを認識するモノクローナル抗体を、第 2 抗体として Alexa 594 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体を用いた間接蛍光抗体法を行い、PrP 及びスプライス変異型 PrP の細胞内分布を調べた。

### 1-3. リアルタイム定量 PCR

T98G 細胞を培養後、DNase I で消化した総 RNA を調製し、SuperScript III RNase H<sup>-</sup> 逆転写酵素 (インビトロジェン社) を用いて 1 本鎖 cDNA を合成した。これを PCR での鋳型 DNA として、*PRNP* (GenBank accession No. AL133396) のエキソン 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 を検出するプライマー (図 1 上段) 及びハウスキーピング遺伝子である  $\beta$ -アクチンを検出するプライマー並びにそれぞれに対応した TaqMan プローブとともに FastStart TaqMan Probe Master (ロッシュ・ダイアグノスティックス社) を用いて

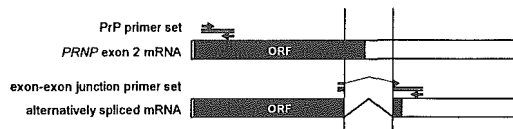


図1 Schematic representation of quantitative RT-PCR primer sets

The arrowed regions represent the primer sets, and the doublets represent the expected products.

マルチプレックス PCR を行った。PCR の結果に基づく定量は、Chromo 4 リアルタイム PCR 解析システム（日本バイオ・ラッド・ラボラトリーズ社）を用いて相対定量法により実施した。

#### 1-4. 蛋白質分解酵素消化

T98G 細胞の全細胞抽出液を PK で消化（10  $\mu\text{g/mL}$ 、37  $^{\circ}\text{C}$ 、30 分間）した後、イムノブロット法（1-5 参照）により PrP の蛋白質分解酵素抵抗性を調べた。

#### 1-5. イムノブロット法

試料を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）で分離後、ポリフッ化ビニリデン（PVDF）膜へ転写し、第 1 抗体と第 2 抗体にそれぞれマウス抗ヒト PrP モノクローナル抗体 6H4（IgG、Kikuchi, Y., *et al. J. Gen. Virol.* 85: 3449-3457 (2004)）及び西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ（HRP）標識ヤギ抗マウス IgG 抗体を用いたイムノブロットを行い、化学発光法で PrP を検出した。

## 2. 製造工程がもつ PrP<sup>Sc</sup> の除去能等の評価に関する試験研究

### 2-1. スクレイピー株

ハムスター順化スクレイピー 263K 株（Kimberlin, R. H., *et al. J.*

*Gen. Virol.* 34: 295-304 (1977)）及びマウス順化スクレイピー Obihiro 株（Shinagawa, M., *et al. Microbiol. Immunol.* 29: 543-551 (1985)）を用いた。263K 株感染シリアンハムスターの 2.5% 脳乳剤 50  $\mu\text{L}$  を、シリアンハムスター（4 週齢、雌）の脳内に接種した。また、Obihiro 株 263K 株感染 Jcl:ICR マウスの 2.5% 脳乳剤 20  $\mu\text{L}$  を、Jcl:ICR マウス（4~6 週齢、雌）に脳内接種した。病末期の動物をジエチルエーテル麻酔下で安楽殺し、脳を採材した。脳は使用時まで -30  $^{\circ}\text{C}$  で保管した。

### 2-2. ミクロソーム画分の調製

スクレイピー感染脳を秤量した後、ハサミで細切した。約 10 倍量（w/w）のショ糖緩衝液 [0.32 mol/L ショ糖、5 mmol/L トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（Tris）塩酸緩衝液（pH 7.5）、1 mmol/L エチレンジアミン 4 酢酸 2 ナトリウム（EDTA）、1  $\mu\text{g/mL}$  ロイペプチン、1  $\mu\text{g/mL}$  アプロチニン、1  $\mu\text{g/mL}$  ペスタチン、2  $\mu\text{mol/L}$  トランス-エポキシサクシニル-L-ロイシルアミド-(4-グアニジノ)ブタン（E-64）、2  $\mu\text{mol/L}$  ベスタチン] を加え、ホモジナイザーでホモジナイズした。得られた乳剤を遠心管に移し、4  $^{\circ}\text{C}$  で 6,000  $\times g$  の遠心を 12 分間行い、上清は別の遠心管に回収した。沈殿に少量のショ糖緩衝液を加え、ホモジナイザーで再度ホモジナイズ後、4  $^{\circ}\text{C}$  で 6,000  $\times g$  の遠心を 12 分間行った。この上清を先に行った遠心上清と合わせてから、4  $^{\circ}\text{C}$  で 100,000  $\times g$  の遠心を 1 時間行った。得られた沈殿にショ糖緩衝液を加えて懸濁した後、塊がなくなるまで超音波処



理を行った。得られたマイクロソーム画分は分注して、 $-20^{\circ}\text{C}$ で保存した。

### 2-3. Sarkosyl 抽出、PrP<sup>Sc</sup> 検出用試料の調製及び PrP<sup>Sc</sup> の検出

2-2 で得られたマイクロソーム画分 100  $\mu\text{L}$  に Sarkosyl (最終濃度 0.5 %) を加え、攪拌及び超音波処理を行った後、 $4^{\circ}\text{C}$  で 100,000  $\times g$  の遠心を 10 分間行った。上清は別の遠心管に回収した。沈殿に 1.0 % Sarkosyl を含むリン酸塩緩衝液 (PBS) を 100  $\mu\text{L}$  加え、同様に攪拌、超音波処理及び遠心操作を行った。この操作を Sarkosyl 最終濃度を 0.5 % ずつ上げて 4.0 % まで繰り返して連続抽出を行った。各遠心上清から 40  $\mu\text{L}$  ずつ 2 本にサンプリングし、一方は 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PK で  $37^{\circ}\text{C}$ 、30 分間処理後、PK 阻害剤である 4-(2-アミノエチル)ベンゼンスルホニルフルオリド塩酸塩 (Pefabloc) を最終濃度 5 mmol/L になるように加え、PK による消化を停止した (PK 処理(+))。もう一方は PK 処理を行わなかった (PK 処理(-))。

これらにメタノール-ブタノール混合液 (メタノール : 2-ブタノール = 1 : 5) を 25  $\mu\text{L}$  加えて攪拌し、 $4^{\circ}\text{C}$  で 20,000  $\times g$  の遠心を 10 分間行い、蛋白質を沈殿させた。沈殿に 1  $\times$  試料用緩衝液 [62.5 mmol/L Tris-塩酸緩衝液 (pH 6.8)、5 % グリセロール、3 mmol/L EDTA、5 % ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、4 mol/L 尿素、4 % 2-メルカプトエタノール、0.04 % プロモフェノールブルー] を 20  $\mu\text{L}$  加え、5 分間煮沸した。また、4.0 % Sarkosyl 連続抽出後の遠心で生じた沈殿には 1  $\times$  試料用緩衝液を 100  $\mu\text{L}$  加え、5 分間煮沸した。

PrP<sup>Sc</sup> の検出はウェスタンブロット (WB) により行った。化学発光を LAS-3000 ルミノイメージアナライザー (富士写真フィルム社) で取り込み、定量解析を行った。

### 2-4. スパイク試験

① 263K 株感染脳から得たマイクロソーム画分、②マイクロソーム画分を直接 1.0 % Sarkosyl で処理して得た 1.0 % Sarkosyl 処理マイクロソーム画分、又は③マイクロソーム画分を直接 3.0 % Sarkosyl で抽出して得た 3.0 % Sarkosyl 抽出マイクロソーム画分をスパイク用病原体試料として、PBS 又は抗 HBs 人免疫グロブリン「日赤」(5 % 人免疫グロブリン、0.3 mol/L グリシン) にスパイクした。この病原体溶液の一部はろ過前の試料として遠心管に回収し、残りはプラスチック注射筒を装着した孔径 0.22  $\mu\text{m}$  のポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜 (製品名 Millex-GV、ミリポア社) で加圧ろ過した。

### 3. 製造工程がもつ PrP<sup>Sc</sup> の除去能等の評価に関する調査研究

今回報告する主な研究内容は、学術論文等の公表資料を検討対象として調査を行った結果である。

#### (倫理面への配慮)

本研究の遂行にあたり、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

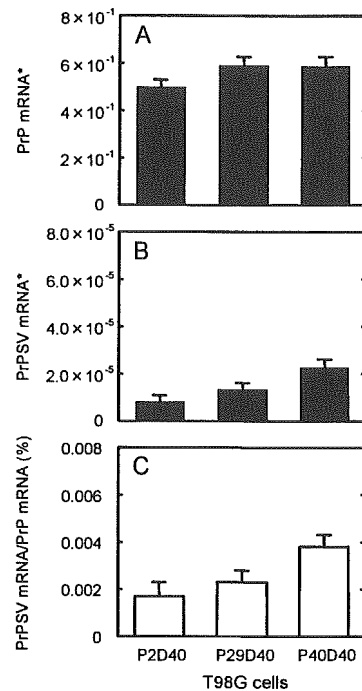
#### 1. 細胞培養技術応用医薬品の製造用細胞基材における PrP<sup>Sc</sup> 安全性に関する試験研究

PRNP がコードする mRNA の発現様式を調べるため、継代数が異なる T98G 細胞をさらに 40 日間培養した細胞から、それぞれ総 RNA を調製した。それらを鋳型として 1 本鎖 cDNA を合成し、PrP mRNA の検出に用いるプライマー (図 1 上段) 及びスプライス変異型 PrP mRNA の検出に用いる exon-exon junction プライマー (図 1 下段) 並びにそれぞれに対応した TaqMan プローブを用いてリアルタイム定量 PCR を行った。

T98G 細胞は PrP mRNA を高発現し、相対発現量が高い  $\beta$ -アクチン mRNA に比較して 50 % 以上の発現量を示している (図 2 A)。継代 2 回後に 40 日間培養した T98G 細胞 (P2D40) に比較して、継代 29 回後に 40 日間培養した細胞 (P29D40) では PrP mRNA の発現量が増加し、継代 40 回後に 40 日間培養した細胞 (P40D40) でもほぼ同じ発現量を示した (図 2 A)。一方、スプライス変異型 PrP mRNA の発現量は低く、P2D40 では PrP mRNA の発現量の約 0.002 % 以下であった (図 2 C)。しかし、その発現量は継代数とともに増加し、P40D40 では P2D40 の 2.8 倍 ( $p < 0.05$ , 2 標本 t 検定) の値を示した (図 2 B)。

次に PrP を認識するマウスモノクローナル抗体 6H4 及びスプライス変異型 PrP の ORF から予想される 214 ~ 230 残基に相当するペプチドを認識するマウスモノクローナル抗体を用い、蛋白質の検出を試みた。

T98G 細胞を播種して 40 日後に全細

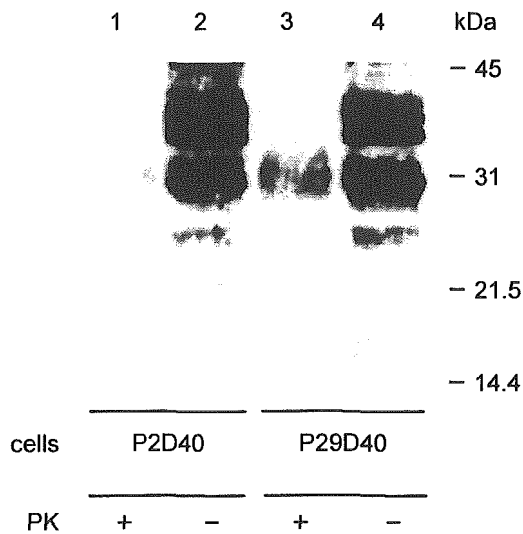


\* Relative expression were normalized to  $\beta$ -actin copy numbers.

図 2 Quantification of splice variant of PrP (PrPSV) mRNA in T98G cells

RNA were prepared from T98G cells for 40 days after 2 passages (P2D40), 29 passages (P29D40) and after 40 passages (P40D40). The resulting total RNA (5  $\mu$ g) were analyzed by real-time RT-PCR with PrP primer set and exon-exon junction primer set. The  $\beta$ -actin primer set was used as a control for the amount of RNA used in each reaction (panels A and B). Splice variant of PrP (PrPSV) mRNA (%) were shown as average relative expression values normalized to PrP mRNA (panel C). Values are the mean  $\pm$  standard error (SE) of three experiments.

胞抽出液を調製し、PK で消化後にイムノブロットを行った。PK 未処理の P2D40 及び P29D40 の全細胞抽出液では、抗体 6H4 が認識する PrP に相当するバンドが 35 kDa、31 kDa 及び 25 kDa の位置にみられた (図 3 レーン 2 及び 4)。PK 処理によって、P2D40 では全てのバンドが消失したが (図 3 レ

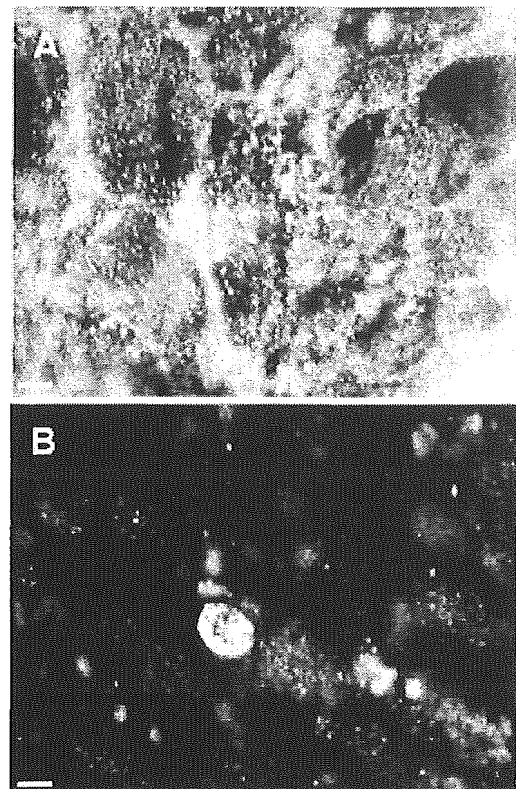


**図 3 Immunoblot analysis for the protease-resistant form of PrP (PrP<sup>res</sup>) in T98G cells**

T98G cells were incubated for 40 days after 2 passages (P2D40) and 40 passages (P29D40). Whole cell lysates (50 µg protein) were treated with PK (10 µg/mL) at 37°C for 30 min (lanes 1 and 3) or left undigested (lanes 2 and 4). The PK-treated lysates were boiled for 10 min and subjected to immunoblot with the 6H4 antibody.

ーン 1)、P29D40 では 31 kDa の位置に PK 処理抵抗性の PrP<sup>res</sup> に相当するバンドがみられた (図 3 レーン 3)。また、図には示していないが、P40D40 も P29D40 と同様な PK 反応性を示した。一方、スプライス変異型 PrP の C 末端に相当するペプチドを認識する 7 種類のモノクローナル抗体を用いて免疫ブロットを行った場合には、PrP に相当するバンドを検出できなかった。

次に、間接蛍光抗体法によりスプライス変異型 PrP の検出を行った。継代 40 回後に 80 日間培養した T98G 細胞 (P40D80) を用い、PrP を認識する抗体 6H4 で間接蛍光抗体法を行ったと



**図 4 Subcellular localization of PrP and splice variant isoform of PrP (PrPSV) in long-term cultured T98G cells**

T98G cells were incubated for 80 days after 40 passages. T98G cells on a 15 mm glass coverslip were subjected to indirect immunofluorescence staining with the 6H4 (A) and HPSV7 (B) antibodies. Scale bars, 10 µm.

ころ、PrP はほとんどの細胞でその細胞膜上に分布し、細胞質及び核内には認められなかった (図 4 A)。一方、スプライス変異型 PrP の C 末端に相当するペプチドを認識する 7 種類のモノクローナル抗体を用いた場合には、このうち 3 種類の抗体において、一部の細胞で核に特異的に局在する蛍光を示した (図 4 B)。図には示していないが、コントロールとして非特異的なマウス IgG 抗体を用いた場合には、そのような蛍光は示さなかった。

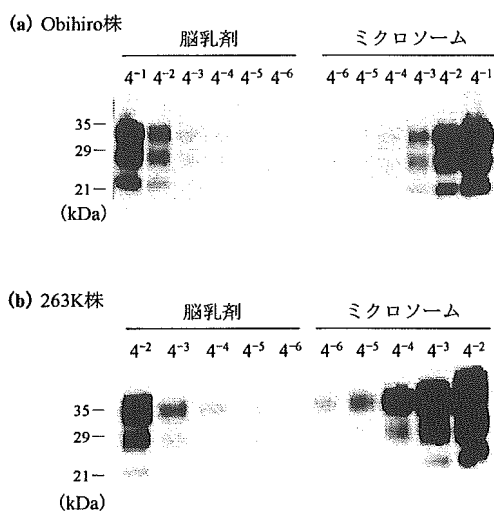


図5 ミクロソーム画分調製による PrP<sup>Sc</sup> の濃縮

(a)・(b)

Obihiro 株感染マウス(a)及び 263K 株感染ハムスター(b)から調製した各脳乳剤及び各ミクロソーム画分を PK 処理した後、1×試料用緩衝液で 4 倍段階希釈して電気泳動した。各々のバンド強度を定量し、脳乳剤中に含まれる PrP<sup>Sc</sup> 量を 1 としたときのミクロソーム画分の PrP<sup>Sc</sup> 量の相対値を算出した結果、ミクロソーム画分を調製することによる PrP<sup>Sc</sup> の濃縮率は Obihiro 株で 2.6 倍、263K 株で 9.8 倍であった。

2. 製造工程がもつ PrP<sup>Sc</sup> の除去能等の評価に関する試験研究

PrP<sup>Sc</sup> のプロセスバリデーションでは、より高濃度の PrP<sup>Sc</sup> を含むスパイク用試料の調製が望まれる。しかし、脳乳剤からの Sarkosyl 抽出により超遠心上清中に回収することが可能な PrP<sup>Sc</sup> は、全体の 20 ~ 30 %であった (平成 16 年度分担研究報告書)。そこで、ミクロソーム画分を調製することによる PrP<sup>Sc</sup> の濃縮及び部分精製の効果について検討した。その結果、Obihiro 株で 2.6 倍、263K 株で 9.8 倍に濃縮されることが判明した (図 5)。さらに、

濃縮効率の高かった 263K 株感染脳ミクロソーム画分から Sarkosyl 抽出を行ったところ、約 30 %の PrP<sup>Sc</sup> が 100,000 × g の遠心上清から回収できることが判明した (図 6)。

次に、ミクロソーム画分を直接 3.0 % Sarkosyl で抽出した後に 100,000 × g の遠心を行って得た遠心上清 (3.0 % Sarkosyl 抽出ミクロソーム画分) のプロセスバリデーションにおける有用性を、人グロブリン製剤製造工程における孔径 0.22 μm ろ過膜によるろ過工程をモデルとして検証した。ミクロソーム画分、1 % Sarkosyl 処理ミクロソーム画分 (ミクロソーム画分を直接 1.0 % Sarkosyl で処理して得た遠心上清) 及び 3 % Sarkosyl 抽出ミクロソーム画分をそれぞれスパイク用 PrP<sup>Sc</sup> 試料としてろ過試験を行い、ろ過前液及びろ液中に存在する PrP<sup>Sc</sup> の定量結果から、膜ろ過工程におけるクリアランス指数 (RF) を算出した。これら 3 種のスパイク用病原体試料を PBS に添加して病原体溶液とした場合には、RF が 0.6 ~ 0.7 となり、PrP<sup>Sc</sup> はろ液中に検出された。しかし、スパイク用試料を添加する試料溶液として 5 % 人免疫グロブリン溶液を使用した場合、ミクロソーム画分及び 1 % Sarkosyl 処理ミクロソーム画分をそれぞれ添加したときの RF は 2.4 に増大したが、3 % Sarkosyl 抽出ミクロソーム画分を添加したときの RF は 0.6 ~ 0.8 であった (図 7)。したがって、スパイク用病原体試料の種類とそれを添加する試料溶液の組成との組合せによってプロセスバリデーションの評価結果が異なることが示された。また、今回使用したスパイク試料の中では 3 % Sarkosyl 抽出ミクロソーム画分を使用した場合

図 6 Obihiro 株感染マウス及び 263K 株感染hamster脳由来マイクロソーム画分からの Sarkosyl による PrP 抽出

(a) Obihiro 株感染マウス及び 263K 株感染hamsterの脳から調製した脳乳剤を  $100,000 \times g$  で 10 分間遠心することにより得られた上清 (PK 処理(+), 非処理(-)) 及び沈殿 (ppt) 中の PrP を、WB により検出した。

(b)・(c)

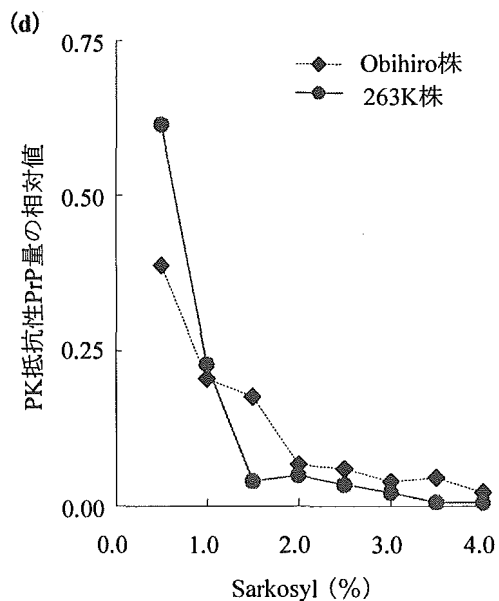
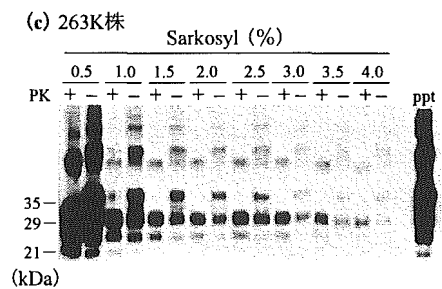
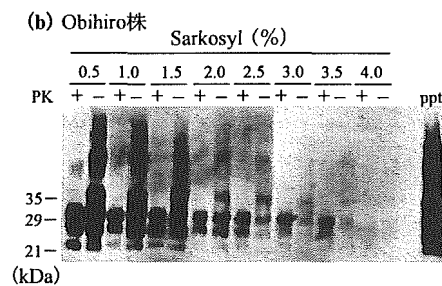
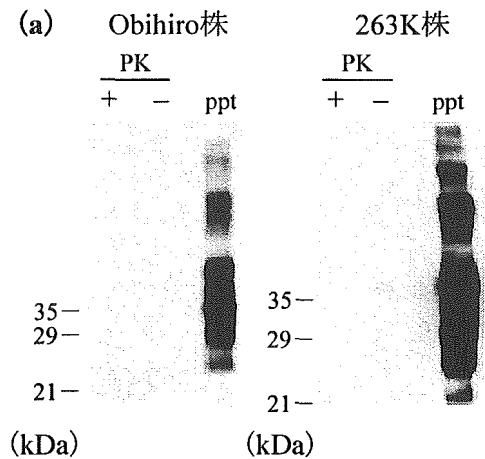
Obihiro 株感染マウス (b) 及び 263K 株感染hamster脳 (c) から調製した各マイクロソーム画分 10  $\mu$ L (脳組織 30 mg 相当) に Sarkosyl を最終濃度 0.5 % となるよう加え、液量が 100  $\mu$ L となるよう PBS を添加し、攪拌及び超音波処理を行った後、 $100,000 \times g$  の遠心を 10 分間行い、その遠心上清を 0.5 % Sarkosyl 処理マイクロソーム画分とした。これを 40  $\mu$ L ずつ 2 本にサンプリングし、一方は PK 処理を実施し (PK 処理(+)), もう一方は PK 処理を行わなかった (PK 処理(-))。

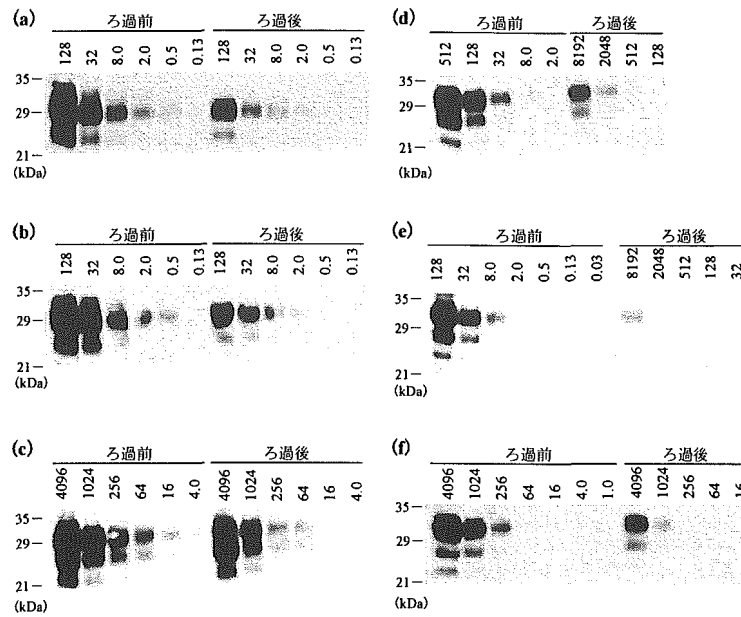
0.5 % Sarkosyl 処理マイクロソーム画分を除いて得られた遠心沈殿に、1.0 % Sarkosyl を含む PBS を 100  $\mu$ L 加え、上と同様に攪拌、超音波処理及び遠心操作を行って、その遠心上清を 1.0 % Sarkosyl 連続処理マイクロソーム画分とした。その後、Sarkosyl 濃度を 0.5 % ずつ段階的に上げながら 4.0 % になるまで、各沈殿からの連続抽出を実施し、1.5 ~ 4.0 % Sarkosyl 連続処理/抽出マイクロソーム画分をそれぞれ得た。

なお、4.0 % Sarkosyl 連続抽出マイクロソーム画分を除いて得られた遠心沈殿 (ppt) から調製した検出用試料のアプライ量 (脳組織当量) は、他の試料の 1/2 量相当。

(d) (b)・(c)記載の方法により各 Sarkosyl 濃度で連続抽出された PK 抵抗性 PrP (PrP<sup>res</sup>、PK(+)) の総和に対する各画分中の PrP<sup>res</sup> 量の割合。2 回繰り返し実施した平均値。

に、膜ろ過という物理的な工程において、より厳密なプロセスバリデーション評価が可能となることが示唆された。





(g)

スパイク用病原体試料		RF	
		PBS	抗 HBs 人免疫グロブリン
マイクロソーム画分	実験 1	0.6	2.4
1 % Sarkosyl 処理	実験 1	0.6	2.4
マイクロソーム画分	実験 2	0.8	—
3 % Sarkosyl 抽出	実験 1	0.7	0.6
マイクロソーム画分	実験 2	0.7	0.8

図 7 孔径 0.22  $\mu\text{m}$  の PVDF 膜を用いた PrP のろ過

- (a) 263K 株感染ハムスター脳由来マイクロソーム画分を PBS に 1/100 量スパイクした病原体溶液を、孔径 0.22  $\mu\text{m}$  の PVDF 膜でろ過した。ろ過前液及びろ液からの PrP<sup>Sc</sup> 検出用試料の調製は「B. 研究方法」に示した方法に従って行った。試料を 4 倍段階希釈して各レーンにアプライし、検出限界を確認した。各レーン上の数字はアプライした脳組織当量 ( $\mu\text{g}$ ) を示す。免疫染色には西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ (HRP) で標識した抗 PrP 抗体 mAb31C6 を使用し (「G. 研究発表」論文 16)、酵素抗体直接法により PrP を検出した。
- (b) 263K 株感染ハムスター脳由来 1 % Sarkosyl 処理マイクロソーム画分を PBS に 1/100 量スパイクした病原体溶液を、孔径 0.22  $\mu\text{m}$  の PVDF 膜でろ過した。以下、(a) と同様。
- (c) 263K 株感染ハムスター脳由来 3 % Sarkosyl 抽出マイクロソーム画分を PBS に 1/4 量スパイクした病原体溶液を、孔径 0.22  $\mu\text{m}$  の PVDF 膜でろ過した。以下、(a) と同様。
- (d) 263K 株感染ハムスター脳由来マイクロソーム画分を 5 % 抗 HBs 人免疫グロブリン溶液に 1/100 量スパイクした病原体溶液を、孔径 0.22  $\mu\text{m}$  の PVDF 膜でろ過した。以下、(a) と同様。
- (e) 263K 株感染ハムスター脳由来 1 % Sarkosyl 処理マイクロソーム画分を 5 % 抗 HBs 人免疫グロブリン溶液に 1/100 量スパイクした病原体溶液を、孔径 0.22  $\mu\text{m}$  の PVDF 膜でろ過した。以下、(a) と同様。
- (f) 263K 株感染ハムスター脳由来 3 % Sarkosyl 抽出マイクロソーム画分を 5 % 抗 HBs 人免疫グロブリン溶液に 1/4 量スパイクした病原体溶液を、孔径 0.22  $\mu\text{m}$  の PVDF 膜でろ過した。以下、(a) と同様。
- (g) ろ過前液及びろ液に含まれる PrP<sup>Sc</sup> のバンド強度を定量し、脳組織当量で補正した後、RF (Reduction Factor、 $\text{RF} = \log_{10} [\text{ろ過前液の PrP}^{\text{Sc}} \text{量} / \text{ろ液の PrP}^{\text{Sc}} \text{量}]$ ) を算出した。同様の実験を 1 又は 2 回行って求めた RF。

### 3. 製造工程がもつ PrP<sup>Sc</sup> の除去能等の評価に関する調査研究

#### 3-1. PrP<sup>Sc</sup> クリアランス評価で使用するスパイク用病原体試料における PrP<sup>Sc</sup> の重合度

平成 17 年 9 月に米国国立アレルギー感染症研究所（国立衛生研究所内）の Silveira らは PrP<sup>Sc</sup> の重合度と感染性との関係についての論文を発表した。その内容の概略は以下のとおり。

##### <方法>

常法 (Raymond, G. J., *et al.* in "Techniques in Prion Research" 16-26, Birkhauser (2004)) に従い、スクレイパー 263K 株感染ハムスターの脳から PrP<sup>Sc</sup> を精製した (純度 90% 以上)。得られた精製 PrP<sup>Sc</sup> を遠心により沈殿させた後、1% n-ウンデシル硫酸ナトリウム塩 (SUS) を含む Tris 緩衝液 (pH 7.0) に再懸濁し、超音波処理及び凍結-融解処理を行って、PrP<sup>Sc</sup> の重合度を低下させた。

これを孔径 0.2 μm のろ過膜で遠心ろ過した後、光散乱をモニターしながら流動視野流分別法 (FIFFF; Flow Field-Flow Fractionation、溶出液は 0.1% SUS - Tris 緩衝液 (pH 7.0)) により PrP<sup>Sc</sup> 単量体及び各重合体を分画した。

FIFFF 各画分のスクレイパー感染性はハムスターの脳に接種することにより測定した。また、プロテナーゼ K 感受性プリオン蛋白質 (PrP<sup>Sc</sup>) から PrP<sup>Sc</sup> への変換活性は固相法により、プリオン (PrP) 含量は抗 PrP モノクローナル抗体 3F4 を用いて測定した。

##### <結果>

陰イオン性界面活性剤 SUS で PrP<sup>Sc</sup> 凝集塊を一部解離させた試料を、FIFFF 法により粒子の半径に従い分離し、流路の光散乱を測定するとともに、得られた各画分のスクレイパー感染性、PrP<sup>Sc</sup> → PrP<sup>Sc</sup> 変換活性及び PrP 量を測定した。各画分の感染性、変換活性及び PrP 量、並びに光散乱の測定結果から算出された分子量、回転半径及び流体半径を図 8 及び表 1 に示す。感染価の測定結果が具体的に示されている画分 5 ~ 23 の範囲において、画分 1 mL あたりの感染性は画分 9 以降で急激に増大し、最後の画分 23 までほぼ一定の高レベルにあった。一方、PrP<sup>Sc</sup> → PrP<sup>Sc</sup> 変換活性及び PrP 量 (いずれも全画分で測定) については、PrP の存在が認められる画分 5 ~ 9 において変換活性がほとんどみられない点を除けば、ほぼ同様の分画挙動を示した (図 8 a)。各画分の感染性及び変換活性を PrP 量あたりで換算すると、図 8 b のとおりいずれも画分 12 で最大のピークを示した。画分 12 を含む個々の画分に分離される粒子の分子量、回転半径 (Radius of gyration)、流体半径 (Hydrodynamic radius) 及び回転半径/流体半径を一覧にして表 1 に示す。これによると、PrP 量あたりの感染性が最大となる画分 12 に分離される粒子の平均分子量は 620 kDa であり、このうち 47 ~ 100% が PrP 由来の分子量であるとする、画分 12 には PrP<sup>Sc</sup> の 14 ~ 28 量体が含まれていることが判明した。また、感

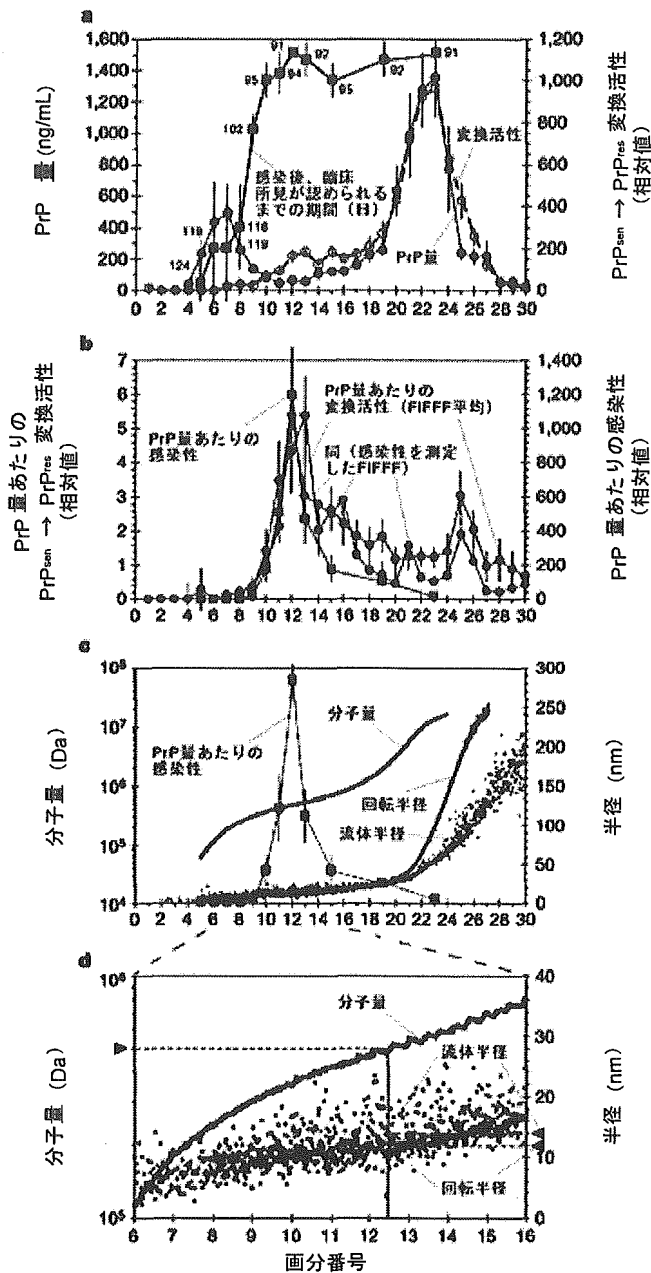


図 8 PrP<sup>sc</sup> 単量体/重合体混合物の FIFFF 分析結果 (Silveira, J. R., et al. Nature 437: 257-261 (2005) 図 1 を改変)

- (a) 抗 PrP モノクローナル抗体 3F4 を用いたドットイムノブロット法により各画分 1 mL あたりの PrP 量を測定した (4 回の FIFFF から  $n = 3 \sim 16$ )。また、固相法により各画分の PrP<sup>scn</sup> → PrP<sup>scs</sup> 変換活性を (4 回の FIFFF から  $n = 9$ )、ハムスターの脳に感染させてから臨床所見が認められるまでの期間を観察することにより各画分の感染性を測定した (1 回の FIFFF から  $n = 4$  (動物数))。
- (b) PrP 量あたりで換算した各画分の PrP<sup>scn</sup> → PrP<sup>scs</sup> 変換活性 (4 回の FIFFF での平均、感染性を測定した 1 回の FIFFF でのデータ) 及び感染性。
- (c) 流路の光散乱をモニターした結果から得られた分子量 ( $n = 3$ )、回転半径 (Radius of gyration,  $n = 4$ ) 及び流体半径 (Hydrodynamic radius,  $n = 4$ )。 (b) で示した PrP 量あたりの感染性を追記した。
- (d) (c) の画分番号 6 ~ 16 の範囲の拡大図。



FIFFF 画分番号	分子量 (kDa) [PrP 数換算] *	回転半径 (z 平均) (nm)	流体半径 (z 平均) (nm)	回転半径/流体半径 $\rho$
6 (単量体～数個程度の PrP の重合体)	155 ± 62 [4 ~ 7 量体]	N.D.	5.0 ± 1.7	N.D.
12 (球状粒子～小さな非晶質構造、 PrP 量あたりの感染性/変換活性が最大の画分)	620 ± 331 [14 ~ 28 量体]	12.1 ± 2.0	13.5 ± 0.9	0.90
21 (短い小繊維構造)	7,770 ± 4,270 [170 ~ 361 量体]	51.9 ± 11.5	37.4 ± 6.7	1.38
26 (長い小繊維構造)	15,220 ± 9,210 [333 ~ 707 量体]	230.1 ± 46.3	90.4 ± 8.1	2.35

表 1 FIFFF で画分した PrP<sup>Sc</sup> 単量体/重合体画分の生物物理学的パラメータ (Silveira, J. R., et al. *Nature* 437: 257-261 (2005) 表 1 を改変)

4 回の FIFFF での平均値 ± 標準偏差を示す。N.D. = not determined.

\* 分子量 (平均値) の 47 ~ 100 % が PrP に由来するという仮定の下、PrP 単量体の分子量を 21.5 kDa として求めた値。

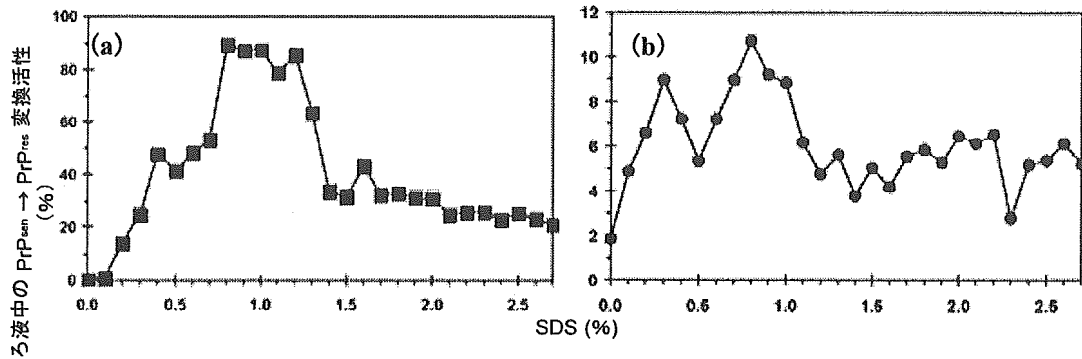


図9 0～2.7% SDS処理を行った精製 PrP<sup>Sc</sup> のろ過 (Silveira, J. R., *et al. Nature* 437: 257-261 (2005) 補遺図1を改変)

(a)・(b)

精製 PrP<sup>Sc</sup> を 0～2.7% SDS で 37℃、1時間処理し (超音波処理は実施せず)、(a)孔径 0.2 μm 又は (b)分画分子量 300 kDa のろ過膜でろ過した。そのろ液について固相法により PrP<sup>Sc</sup> → PrP<sup>Res</sup> 変換活性を測定した。

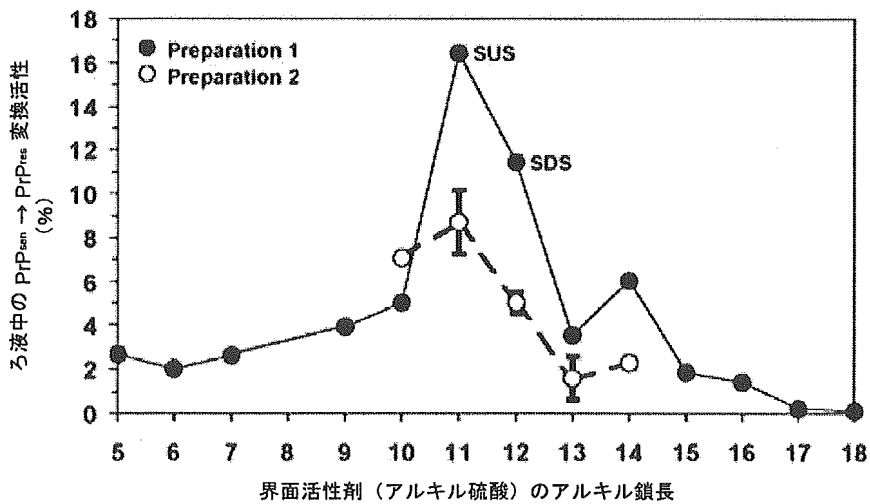


図10 1%アルキル硫酸処理を行った精製 PrP<sup>Sc</sup> のろ過 (Silveira, J. R., *et al. Nature* 437: 257-261 (2005) 補遺図2を改変)

精製 PrP<sup>Sc</sup> を 1%アルキル硫酸で 37℃、1時間処理し (超音波処理は実施せず)、分画分子量 300 kDa のろ過膜でろ過した。そのろ液について固相法により PrP<sup>Sc</sup> → PrP<sup>Res</sup> 変換活性を測定した。

染性が測定されている画分のうち、画分 5～9 の低分子量領域及び画分 23 の高分子量領域では、PrP<sup>Sc</sup> あたりの感染性はほとんどみられなかった。

同様に調製した精製 PrP<sup>Sc</sup> を 0～2.7% の陰イオン界面活性剤ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) で処理後、超音波処理をしないまま孔径 0.2 μm のろ過膜でろ過した場合には、SDS を一定濃度以上含む条件ではろ液中に PrP<sup>Sc</sup> → PrP<sup>Sc</sup> 変換活性が検出されたが、試料に SDS を含まない条件ではろ液中に変換活性がほとんどみられなかった (図 9 a)。また、同様に調製した精製 PrP<sup>Sc</sup> を 0 又は 1% の SUS 又は SDS で処理後、超音波処理をしないまま分画分子量 300 kDa のろ過膜でろ過した場合、ろ液中には約 2% (SUS・SDS 無処理)、約 9～16% (1% SUS 処理)、約 5～11.5% (1% SDS 処理) の変換活性が残存した (図 9 b、図 10、表 2)。

### 3-2. 実生産規模を適切に反映したクリアランス評価用スケールダウン試験系の設計

EMA から平成 16 年 10 月に示された血漿分画製剤の製造における PrP<sup>Sc</sup> クリアランス評価のための指針に基づき、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例として、実生産規模を適切に反映したクリアランス評価用スケールダウン試験系を設計した。

#### <ろ過工程>

孔径 35 nm のろ過膜 (膜面積 1 m<sup>2</sup>) を用いて液量 10 L をろ過する実生産工程を想定して、スケー

ルダウン試験系を設計した。

スケールダウン試験系で膜面積が 0.01 m<sup>2</sup> のろ過膜を選択した場合、膜面積比からスケールダウン率は 1/100 となり、ろ過前液の液量は 100 mL となる。ろ過前液にスパイクする PrP<sup>Sc</sup> 試料の液量をろ過前液の 10% とした場合、必要なスパイク用 PrP<sup>Sc</sup> 試料の液量は 10 mL となる。

スケールダウン試験系でのろ過条件は表 3 のとおり。

#### <クロマトグラフィー工程>

ゲル高 100 mm、内径 1,000 mm の液体クロマトグラフ用カラム (充填ゲル容量 78.5 L) に液量 10 L をアプライする実生産工程を想定して、スケールダウン試験系を設計した。

内径 10 mm のカラムを選択した場合、充填ゲル容量比からスケールダウン率は 1/100 となり、アプライする液量は 100 mL となる。

スケールダウン試験系でのクロマトグラフィー条件は表 4 のとおり。

### 3-3. 血液中に存在する PrP<sup>Sc</sup> の検出方法

血液中に存在する PrP<sup>Sc</sup> の検出方法に関する報告が本年度相次いだ。そこで、細胞培養に用いるウシ血清、血液製剤等の PrP<sup>Sc</sup> 否定試験として、これら方法が適用可能であるか検証するため、既存の方法との比較検討を行った。

血液中の PrP<sup>Sc</sup> の検出に適用できる試験方法は、動物を用いた感染性試験以外に確立されていなかったが、この方法では PrP<sup>Sc</sup> 感染ハムス

表2 ろ過によるPrP<sup>Sc</sup>の除去効率（公表文献に基づく）

スパイク用病原体試料の種類	超音波処理	スパイク用病原体溶液中の蛋白質	スパイク用病原体溶液中の可溶性剤*	ろ過膜の種類（概略の孔径）	クリアランス指数RF	アッセイ方法	引用文献番号
263K株感染ハムスター脳 ミクロソーム画分	-	Cohn 分画 Sup. I + III (12%エタノール) 60 mg/mL Cohn 分画 Fr. II 再懸濁液	-	AP20 (8.0 ~ 0.8 μm)	< 1	抗体	a
263K株感染ハムスター脳 ミクロソーム画分	-	Fr. II 再懸濁液	-	K200P (2 μm)	> 2.8	抗体	a
Sc237K株感染ハムスター 脳乳剤	-	Cohn 分画 Sup. I (8%エタノール)	-	Supra P80 (3.0 ~ 1.0 μm)	0.1	抗体	b
Sc237K株感染ハムスター 脳乳剤	-	Cohn 分画 Sup. V (38%エタノール)	-	Supra P80 (3.0 ~ 1.0 μm)	0.9	抗体	b
Sc237K株感染ハムスター脳	-	Cohn 分画 Sup. I (8%エタノール)	-	Supra P80 (3.0 ~ 1.0 μm)	0	抗体	b
Sc237K株感染ハムスター脳	-	Cohn 分画 Sup. V (38%エタノール)	-	Supra P80 (3.0 ~ 1.0 μm)	1.1	抗体	b
Sc237K株感染ハムスター脳	-	Cohn 分画 Sup. I (8%エタノール)	-	Supra P80 (3.0 ~ 1.0 μm)	0	抗体	b
Sc237K株感染ハムスター脳	-	Cohn 分画 Sup. I (8%エタノール)	-	Supra P80 (3.0 ~ 1.0 μm)	0	抗体	b
Sc237K株感染ハムスター脳	-	Cohn 分画 Sup. V (38%エタノール)	-	Supra P80 (3.0 ~ 1.0 μm)	0.9	抗体	b
Sc237K株感染ハムスター脳	-	Cohn 分画 Sup. I (8%エタノール)	-	Supra P80 (3.0 ~ 1.0 μm)	0	抗体	b
Sc237K株感染ハムスター脳	-	Cohn 分画 Sup. V (38%エタノール)	-	Supra P80 (3.0 ~ 1.0 μm)	2.4	抗体	b
263K株感染ハムスター脳 精製 PrP <sup>Sc</sup>	-	85 mg/mL Cohn 分画 Fr. V 再懸濁液	-	KS80P (0.8 μm)	> 4.9	抗体	a
263K株感染ハムスター脳 ミクロソーム画分	+	0.5 % Rh 免疫グロブリン	< 1/300 × 0.1 % リゾレン チン <sup>†</sup> 、20 μg/g Tween 80	Millex (0.22 μm)	0	抗体	c
263K株感染ハムスター脳 ミクロソーム画分	-	45 mg/mL 人血清アルブミン	-	Sterivex (0.22 μm)	< 1	抗体	a
263K株感染ハムスター脳 ミクロソーム画分	-	-	-	PVDF 膜 (0.22 μm)	< 1	抗体	d
263K株感染ハムスター脳 ミクロソーム画分	+	-	-	PVDF 膜 (0.22 μm)	< 1	抗体	d
263K株感染ハムスター脳 ミクロソーム画分	-	0.43 mg/mL 血液凝固第 VIII 因子	-	Durapore (0.45 μm) → Durapore (0.22 μm)	1.0	抗体	a
263K株感染ハムスター脳 精製 PrP <sup>Sc</sup>	-	-	-	Nanosep (0.2 μm)	> 1	変換 活性	2
263K株感染ハムスター脳 精製 PrP <sup>Sc</sup>	-	-	1 % SDS	Nanosep 膜 (0.2 μm)	< 1	変換 活性	2
263K株感染ハムスター脳 ミクロソーム画分	-	-	-	PVDF 膜 (100 nm)	1.1	抗体	d