

						PVDF 膜 (100 nm)	< 1	抗体	d
263K 株感染ハムスター脳 ミクローソーム画分	+	-	-	-	-	不明 (100 nm)	無効 [#]	抗体	d
CJD 感染マウス脳乳剤	-	-	-	-	-	Planova (75 nm)	> 2.5	感染	e
263K 株感染ハムスター脳 ミクローソーム画分	-	-	-	-	-	Planova (75 nm)	1.8	抗体	d
263K 株感染ハムスター脳 ミクローソーム画分	+	-	-	-	-	Planova75N (75 nm)	無効 [#]	抗体	d
CJD 感染ヒト脳乳剤 (PrP ^{sc} 1 型)	-	-	-	1 % Sarkosyl	-	Planova75N (75 nm)	無効 [#]	抗体	3
CJD 感染ヒト脳乳剤 (PrP ^{sc} 2 型)	-	-	-	1 % Sarkosyl	-	Planova75N	有効 [#]	抗体	3
CJD 感染マウス脳乳剤	-	-	-	-	-	BMM75 (75 nm)	無効 [#]	感染	f
CJD 感染マウス脳乳剤	-	-	-	-	-	BMM60 (60 nm)	やや有効 [#]	感染	f
CJD 感染マウス脳乳剤	-	-	-	-	-	BMM60 × 2	やや有効 [#]	感染	f
CJD 感染マウス脳乳剤	-	-	-	-	-	BMM50 (50 nm)	有効 [#]	感染	f
界面活性剤処理ハムスター 脳乳剤	-	10 mg/mL ウシ血清アルブミン	抽出時の 25 倍希釈	-	-	Ultipor VF DV50 (50 nm)	> 2.8	不明	g
CJD 感染マウス脳乳剤	-	-	-	-	-	BMM40 (40 nm)	やや有効 [#]	感染	f
CJD 感染マウス脳乳剤	-	-	-	1 % Sarkosyl	-	BMM40	無効 [#]	感染	f
263K 株感染ハムスター脳 ミクローソーム画分	-	-	-	-	-	Planova (35 nm)	> 2.5	抗体	d
263K 株感染ハムスター脳 ミクローソーム画分	+	-	-	-	-	Planova (35 nm)	> 3.2	抗体	d
263K 株感染ハムスター脳 ミクローソーム画分	-	+	+	-	-	Planova (35 nm)	> 3.0	抗体	d
263K 株感染ハムスター脳 ミクローソーム画分	-	+	+	1/10 × 0.3 % TNBP**、 1/10 × 1 % Tween 80**	-	Planova (35 nm)	> 3.0	抗体	d
263K 株感染ハムスター脳 ミクローソーム画分	+	+	+	-	-	Planova (35 nm)	1.7 ~ 2.4	抗体	d
CJD 感染マウス脳乳剤	-	-	-	-	-	BMM35 (35 nm)	有効 [#]	感染	f
CJD 感染マウス脳乳剤	-	-	-	-	-	BMM75 → BMM35	有効 [#]	感染	f
CJD 感染マウス脳乳剤	-	-	-	-	-	BMM60 → BMM35	有効 [#]	感染	f

ME7株感染マウス脳乳剤	-	2%人乾燥アルブミン	-	Planova35N (35 nm)	4.93	感染	h				
ME7株感染マウス脳乳剤	-	2%人乾燥アルブミン	1% Sarkosyl	Planova35N	1.61	感染	h				
263K株感染マウス脳乳剤 (孔径0.1µm膜を過)	+	-	< 0.1% リゾレンチン	Planova75 → Planova35N	3.2 ~ 3.7	抗体、 感染	i				
CJD 感染マウス脳乳剤	-	-	-	不明 (25 nm)	有効*	感染	e				
界面活性剤処理ハムスター 脳乳剤	-	10 mg/mL ウシ血清アルブミン	抽出時の 25 倍希釈	Ultipor VF DV20 (20 nm)	> 2.8	不明	g				
界面活性剤処理ハムスター 脳乳剤	-	10 mg/mL ウシ血清アルブミン	抽出時の 25 倍希釈	Ultipor VF DV50 → Ultipor VF DV20 DVD (100 nm)	> 2.8	不明	g				
CJD 感染ヒト精製 PrP ^{Sc} 型	-	2%ウマ抗ヒト胸腺細胞 細胞グロブリン	-	→ DVD50 (50 nm) → DVD20 (20 nm)	3 ~ 3.3	抗体	j				
263K株感染ハムスター脳 ミクロソーム画分	-	-	-	Planova (15 nm)	> 2.5	抗体	d				
263K株感染ハムスター脳 ミクロソーム画分	+	-	-	Planova (15 nm)	> 3.2	抗体	d				
263K株感染ハムスター脳 ミクロソーム画分	-	+	-	Planova (15 nm)	> 2.3	抗体	d				
263K株感染ハムスター脳 ミクロソーム画分	-	+	1/10 × 0.3% TNBP**、 1/10 × 1% Tween 80**	Planova (15 nm)	> 2.3	抗体	d				
263K株感染ハムスター脳 ミクロソーム画分	-	+	1/50 × 0.1% Sarkosyl**	Planova (15 nm)	> 3.1	抗体	d				
263K株感染マウス脳乳剤 (孔径0.1µm膜を過)	+	-	< 0.1% リゾレンチン	Planova15 (15 nm)	> 4.8	抗体	i				
ME7株感染マウス脳乳剤	-	2%人乾燥アルブミン	-	Planova15N (15 nm)	> 5.87	感染	h				
ME7株感染マウス脳乳剤	-	2%人乾燥アルブミン	1% Sarkosyl	Planova15N	> 4.21	感染	h				
ME7株感染マウス脳乳剤	-	2%人乾燥アルブミン	1% Sarkosyl	Planova10N (10 nm)	> 3.80	感染	h				
263K株感染ハムスター脳 精製 PrP ^{Sc}	-	-	-	Nanosep (分画分子量 300 kDa)	1.7	変換 活性	2				
263K株感染ハムスター脳 精製 PrP ^{Sc}	-	-	1% SUS	Nanosep (分画分子量 300 kDa)	< 1	変換 活性	2				
263K株感染ハムスター脳 精製 PrP ^{Sc}	-	-	1% SDS	Nanosep (分画分子量 300 kDa)	< 1 ~ 1.3	変換 活性	2				
263K株感染マウス脳乳剤 (孔径0.1µm膜を過)	+	-	< 0.1% リゾレンチン	Viresolve180 (分画分子量 180 kDa)	> 2.5	抗体	i				

株	+	0.5% Rh 免疫グロブリン	< 1/300 × 0.1% リゾレシチン**、20 µg/g Tween 80	Viresolve180	> 2.5	抗体	c
263K 株 感染ハムスター脳乳剤 (孔径 0.22 µm 膜ろ過)	+	-	< 0.1% リゾレシチン	(分画分子量 100 kDa)	3.7	感染	i
263K 株 感染マウス脳乳剤 (孔径 0.1 µm 膜ろ過)	+	-	< 0.1% リゾレシチン	(分画分子量 10 kDa)	> 3.5	抗体 感染	i
263K 株 感染マウス脳乳剤 (孔径 0.1 µm 膜ろ過)	+	-	< 0.1% リゾレシチン	(分画分子量 5 kDa)	> 4.5	抗体	i
263K 株 感染ハムスター脳乳剤	-	AS3 加人赤血球 (白血球非除去)		BPF4 (白血球除去フィルター)	3.7	感染	k
263K 株 感染ハムスター脳ミクログローム画分	-	85 mg/mL Cohn 分画 Fr. V 再懸濁液 (孔径 0.8 µm 膜ろ過)		Delipid-1 mini (脂質除去フィルター)	2.3	抗体	a
263K 株 感染ハムスター脳乳剤	-	人赤血球		Leukotrap (アリオン除去フィルター)	2.75	抗体	l
スグレイビー 感染ハムスター脳乳剤	-	人赤血球濃厚液		Leukotrap	2.9	抗体	m

* Tween80 : ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノオレエート。SDS : ドデシル硫酸ナトリウム。Sarkosyl : N-ラウロイルサルコシナトリウム。TNBP : トリ(n-ブチル)リン酸。
 SUS : ウンデシル硫酸ナトリウム。
 ** 「○×△%」の表記は、「スパイク用病原体試料調製時には△%の濃度。これを用いてスパイク用病原体溶液を調製する際に○倍希釈」の意。
 * RF は求めておらず、ろ液を感染させたマウスが死亡するまでの日数で評価。
 ** RF は求めておらず、ウェスタンブロットの結果から評価。

<引用文献>

- Foster, P. R., et al. "Studies on the Removal of Abnormal Prion Protein by Processes Used in the Manufacture of Human Plasma Products." *Vox Sang.* 78: 86-95 (2000)
- Vey, M., et al. "Purity of Spiking Agent Affects Partitioning of Prions in Plasma Protein Purification." *Biologicals* 30: 187-196 (2002)
- Van Holten, R. W., et al. "Removal of prion challenge from an immune globulin preparation by use of a size-exclusion filter." *Transfusion* 42: 999-1004 (2002)
- ベネシス社 発表資料 "Today's presentation - 1. Design of the spiking agent for prion clearance studies. 2. Removal of Parvovirus B19 by Planova filters."
- Tateishi, J., et al. "Properties of transmissible agent derived from chronic spongiform encephalopathy." *Ann. Neurol.* 7: 390-391 (1980)
- Tateishi, J., et al. "REMOVAL OF CAUSATIVE AGENT OF CREUTZFELD-JAKOB DISEASE (CJD) THROUGH MEMBRANE FILTRATION METHOD." *膜* 18: 357-362 (1983)
- Arenha, H., et al. "Potential Prion Risks & Clearance by Filtration." *Genetic Engineering News* 21 (11) (1 Jun. 2001)
- Tateishi, J., et al. "Scrapie Removal using Planova Virus Removal Filters." *Biologicals* 29: 17-25 (2001)
- BioReliance 社 発表資料 "TSE Clearance."
- Truchot, L., et al. "CJD PrP^{sc} removal by nanofiltration process: Application to a therapeutic immunoglobulin solution (Lymphoglobuline)." *Biologicals (in press)*, 2006)
- Coker, S. S., et al. "Removal of exogenous (spiked) and endogenous prion infectivity from red cells with a new prototype of leukoreduction filter." *Transfusion* 45: 1839-1844 (2005)
- Girolamo, A., et al. Pall 社ホームページ発表資料 "Characterization of the Performance of the Pall Leukotrap Affinity Prion Reduction Filter System for Blood."
- Pall 社. Pall 社ホームページ発表資料 "Leukotrap Affinity Prion Reduction Filter System."

<ろ過条件> (全量・定流速ろ過の場合)

項目	実生産工程	スケールダウン試験系
ろ過膜面積	1 m ²	0.01 m ²
ろ過液量	10 L	90 mL*
スパイク用 PrP ^{Sc} 試料	—	10 mL
総通液量	10 L	100 mL
流速	200 mL/min	2 mL/min
ろ過圧	1.0 kg/cm ² 以下	1.0 kg/cm ² 以下
ろ過温度	室温	室温

* 実生産工程で得られるろ過前液を使用することが望ましい。

<評価項目の例>

項目	確認内容
ろ過液量	設定した量を問題なくろ過できたか
流速	設定した流速でろ過できたか
ろ過温度	設定した温度管理ができたか
ろ過圧力	ろ過圧力が実生産工程での管理幅内で制御できたか
ろ液の品質	蛋白質の組成・性状等の特性が実生産工程でのものと同等か
ろ過前後の収率	ろ過前後の蛋白質収率、活性収率等が実生産工程でのものと同等か

表3 ろ過工程のスケールダウン試験系における実施条件及び評価項目例

<クロマトグラフィー条件>

項目	実生産工程	スケールダウン試験系
カラム内径	1,000 mm	10 mm
ゲル高	100 mm	100 mm
充填ゲル容量	78.5 L	7.85 mL
アプライ液量	10 L	90 mL
スパイク用 PrP ^{Sc} 試料	—	10 mL
線流速	60 cm/h	60 cm/h
温度	室温	室温
クロマトグラフ用緩衝液組成	同一	

* 実生産工程で得られるアプライ液を使用することが望ましい。

<評価項目の例>

項目	確認内容
線流速	設定した線流速で通液できたか
温度	設定した温度管理ができたか
溶出液の品質	蛋白質の組成・性状等の特性が実生産工程でのものと同等か
クロマトグラフ	クロマトグラフィー前後の蛋白質収率、活性収率等が イー前後の収率 実生産工程でのものと同等か

表 4 クロマトグラフィー工程のスケールダウン試験系における実施条件及び評価項目例

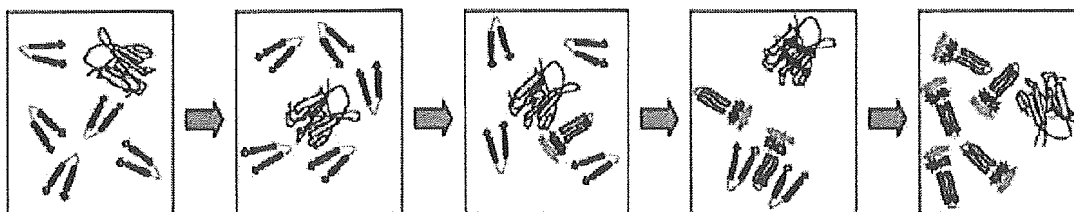





図 11 MPD 法の原理の概略 (Grosset, A., et al. *Peptides* 26: 2193-2200 (2005) 図 1 を改変)

凡例： 試料中の PrP^{Sc}  人工ペプチド (α-ヘリックス構造；非励起状態)  人工ペプチド (β-シート構造；励起状態)

ターの約 31 %しか陽性とならず、実用化するためには感度に問題があった上、試験結果を得るまでに数カ月単位の時間を要すること、試験の実施に費用や手間がかかること等の難点もあった (Brown, P., *et al. J. Lab. Clin. Med.* 137: 5-13 (2001))。また、試験に用いる実験動物において、ヒト血液中の PrP^{Sc} が種間障壁を超えて臨床症状を再現できるかどうか必ずしも確実ではない。

Soto らは、PrP^{Sc} が PrP^{sen} の構造変換を引き起こして PrP^{sen} にする性質を利用して、動物脳組織中の微量の PrP^{Sc} を増幅して生化学的に検出する方法を考案した (Soto, C., *et al. FEBS Lett.* 579: 638-642 (2005))。この方法 (PMCA 法 ; Protein Misfolding Cyclic Amplification 法) の概略は次のとおり。PrP^{Sc} を含む試料に試験管内で大量の正常プリオン (PrP^C) を添加・混合して放置することによって、PrP^C の一部が PrP^{Sc} に構造変換されて PrP^{Sc} の増幅・凝集が起こる。約 30 分後に PrP^{Sc} の凝集体を分離し、超音波処理を行って PrP^{Sc} を解離させた後、再び大量の PrP^C を添加する。このサイクルを繰り返すことにより、最初の試料に含まれていた微量の PrP^{Sc} は指数関数的に増幅し、ウェスタンブロットによる検出が容易となる。263K 株感染ハムスター脳乳剤を用いた検討では、従来のウェスタンブロット (PMCA 法非実施) で陽性となるのは感染 6 週以後であった一方、PMCA 法では感染 2 週後 (臨床症状の発現前) から PrP^{Sc} の検出が可能であった。

今般、Castilla、Soto らは、PMCA

法を自動化した装置を作製し、さらに本法が血液試料にも適用可能であることを示した (Castilla, J., *et al. Nat. Med.* 11: 982-985 (2005))。彼らの報告では、スクレイピー強制感染ハムスター (n = 18) の血液各 20 μ L を試料として、PMCA 法 140 サイクル (所要時間は約 3 日) を 2 回連続実施することによって 50 %の感度で、6 回連続実施することによって 89 %の感度で PrP^{Sc} を検出することが可能であった。一方、健康なハムスター (n = 12) の血液を用いた場合には、陽性の結果は得られなかった。本法による PrP^{Sc} の検出感度は 20 fg/mL (4×10^5 分子/mL) であった。

Fujita らは、ヒト血漿にスパイクした PrP^{Sc} (263K 株) のウェスタンブロットでの検出に関して、試料の前処理方法を工夫することにより大量に共存する血漿蛋白質由来の非特異的妨害を大幅に減らして高感度化することに成功している (Fujita, R., *et al. Biologicals (in press)*)。それによると、263K 株感染ハムスター脳から超遠心及び超音波処理して調製したスパイク用 PrP^{Sc} ミクロソーム画分をヒト血漿にスパイクしたものをウェスタンブロット検出用試料とする場合、PK 処理の前に熱処理 (80 $^{\circ}$ C、10 分間) を実施することによって PrP^{Sc} が特異的に検出できた。これは、試料中に大量に含まれる血漿蛋白質が熱処理により変性し、PK 感受性が高まるためと考えられている。従来の方法による検出感度は 670 LD₅₀/mL であったが、熱処理を行うことによって感度は約 5 倍向上し、133 LD₅₀/mL でも検出可能とな

った。

Grosset、Orser (米国 Adlyfe 社) らは、Soto らと同様に PrP^{sc} が PrP^{sen} を PrP^{sc} に変換する性質、すなわち蛋白質中の α -ヘリックス構造を β -シート構造に変換する性質を利用して、ハムスター脳乳剤中の微量の PrP^{sen} を増幅して検出する方法を開発した (Grosset, A., *et al. Peptides* 26: 2193-2200 (2005))。この方法 (MPD 法; Misfolded Protein Diagnostic 法) の PMCA 法との相違点は、①試料に添加するものは PrP^c ではなく、 α -ヘリックス構造をもつ人工ペプチド (PrP アミノ酸配列のうち、動物種を超えて共通性が保存されている部分を基に合成) であること、②この人工ペプチドは両端に蛍光色素が結合されており、PrP^{sc} によってこのペプチドの α -ヘリックス構造が β -シート構造に変化すると、両端の蛍光色素が接近して励起 (試験液の色が緑から赤に変化) すること (なお、 β -シート構造をとった人工ペプチドには PrP^{sen} \rightarrow PrP^{sc} 変換活性はない)、③このため、最終的な検出にはウェスタンブロットを用いず、蛍光定量によること、の3点である (図 11)。PMCA 法に対して本法では、①新たに PrP^{sc} が生じることはない、②サイクルごとに PrP^{sc} を分離し解離させる操作が省けること、③このため検査時間も 30 分~3 時間にまで短縮できること、④ウェスタンブロットを実施しないので PK 処理が不要であり、PK 処理による精度低下 (PrP^{sc} が必ずしも完全に消化されないおそれがあること) が生じ得ないこと、のメリットがある。263K 株感染ハムスター脳乳剤を用

いた検討では、従来の ELISA 及びウェスタンブロットで陽性となるのは感染 9 週以後であった一方、MPD 法では感染 3 週後 (臨床症状の発現前) から PrP^{sc} の検出が可能であった。

本法を利用した自動検査装置を開発中の米国 Adlyfe 社によれば、本法を用いて BSE 感染ウシ、スクレイピー感染ヒツジ及び強制感染ハムスター・サル・マウスの血清/血漿/白血球、並びに散発型クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) 患者の血漿からの PrP^{sc} の検出に既に成功しているとのことである (Orser, C., *et al.* 第 12 回日本血液代替物学会年次大会 発表要旨 (2005)、Adlyfe 社ホームページ)。また、同社によると、本法による検出感度は、市販されている従前の EILSA 等の 100 倍以上であり (2005 年 6 月 17 日付け「日経バイオテクオンライン」記事)、BSE ウシ血液由来の試料を用いた検討では、偽陰性は 20 検体中 1 検体であった。

D. 考察

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^{sc} 安全性に関する試験研究

ヒトグリオーマ細胞株 T98G は、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))。さらに 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 PrP の mRNA も発現しており、その発現量は継代数が増えるに従い増加した。スプライス変異型 PrP mRNA

の ORF は 230 アミノ酸をコードしており、1～217 残基までは PrP と同じ 1 次構造をもち、全体として PrP と 94 % の相同性を有している (図 12)。スプライス変異型 PrP mRNA の発現は T98G 細胞だけでなく、市販の各種ヒト臓器由来の総 RNA でも確認しており、この蛋白質を生体由来の医薬品原料に対する添加回収実験等に用いることを目的とし、PrP 及びスプライス変異型 PrP の C 末端を認識するモノクローナル抗体を用いて蛋白質の確認を試みた。PrP を認識する抗体 6H4 は、T98G 細胞が産生する PrP 及び PK 処理抵抗性の PrP^{Sc} をイムノブロットで認識した (図 3)。一方、スプライス変異型 PrP の C 末端を認識する 7 種類のモノクローナル抗体では、予想される分子量の位置にバンドが認められなかった。リアルタイム定量 PCR での測定によると、スプライス変異型 PrP mRNA は PrP mRNA の 0.002～0.004 % 程度しか発現していなかったことから、スプライス変異型 PrP 蛋白質の産生量は今回実施したイムノブロットの検出感度以下であった可能性がある。今後は、スプライス変異型 PrP 蛋白質を免疫沈降法等で濃縮した上でイムノブロット法を実施することにより、イムノブロット法の検出感度を向上させることを試みる予定である。

抗体 6H4 を用いた間接蛍光抗体法では、T98G 細胞の細胞膜上に PrP が大量に発現していることが確認された。一方、スプライス変異型 PrP の C 末端を認識する抗体では、用いた 7 種類中 3 種類で核に局在する蛍光が一部の細胞で観察された (図 4)。非特異的マウス抗体を同一の抗体濃度で用いた比較実験では同様な蛍光が認められ

なかったことから、スプライス変異型 PrP は一部の細胞で核に局在していることが推定された。正常 PrP は C 末端にある GPI アンカーシグナル配列で細胞膜上に結合しているが、その N 末端には核移行シグナルに類似したアミノ酸配列を有している。また、ヒトの遺伝型プリオン病でアルツハイマー病様の痴呆症状を呈した患者でみられたコドン 145 のストップ変異を有する PrP 遺伝子を発現させた培養細胞では、PrP が核内に移行することが報告されている (Zanusso, G., *et al. J. Biol. Chem.* 274: 23396-23404 (1999); Gua, Y., *et al. Neurobiol. Disease* 12: 133-149 (2003))。スプライス変異型 PrP mRNA の ORF から推定されるアミノ酸配列は 1～217 残基が PrP と同一で GPI アンカーシグナル配列をもたないことから、スプライス変異型 PrP は核に移行することが推定される。今回の結果ではスプライス変異型 PrP の核への局在が認められたが、その発現量は低く、かつ一部の細胞で観察されたのみであったことから、現時点ではスプライス変異型 PrP が核に移行するとは断言できない。今後は、他の培養細胞内でのスプライス変異型 PrP の大量発現、及

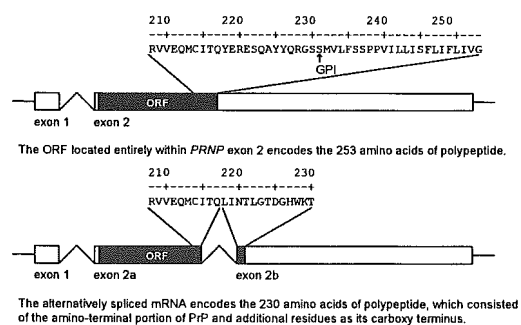


図 12 Schematic representation of the PRNP gene consisting exons 1 and 2

び間接蛍光抗体法と併せて exon-exon junction プライマー (図 1) を用いた *in situ* ハイブリダイゼーションを実施し、スプライス変異型 PrP の核内への移行を確認する予定である。

また、スプライス変異型 PrP mRNA の発現量が正常 PrP mRNA の数万分の 1 程度に過ぎないことを踏まえると、スプライス変異型 PrP が生体内で何らかの生理的機能を担っているかどうか解明が待たれるところである。

2. 製造工程がもつ PrP^{Sc} の除去能等の評価に関する試験研究

一般的にプロセスバリデーションでは 3 以上のクリアランス指数を評価できる実験系が理想とされていることから、より PrP^{Sc} 濃度の高いスパイク用試料を用いる必要がある。PrP^{Sc} の濃縮率を考慮すると、263K 株感染脳からマイクロソーム画分を調製することで、脳乳剤と比較して PrP^{Sc} を 9.8 倍濃縮することが可能であった (図 5)。マイクロソーム画分に含まれる PrP^{Sc} は小胞に付随していると考えられ、実際に 100,000 × g の遠心で沈殿した。マイクロソーム画分を Sarkosyl 抽出することにより 100,000 × g の遠心上清中に PrP^{Sc} が回収できたことから (図 6)、本研究では PrP^{Sc} 濃度の高いスパイク用試料が調製できる 263K 株をスパイク用試料として使用することとした。しかし、他のプリオン株や界面活性剤の使用についても検討する必要がある。

本研究の結果、孔径 0.22 μm のろ過膜を用いたろ過工程における PrP^{Sc} 除去効率の評価では、3 % Sarkosyl 抽出マイクロソーム画分と他の 2 つのマイクロソーム画分の間には大きな違いが認め

られた (図 7)。これら 3 種のスパイク用 PrP^{Sc} 試料を PBS に添加した場合にはいずれも除去効率が同程度であったことから、本来これら 3 種のスパイク用試料中には 0.22 μm の孔径を通過する PrP^{Sc} 凝集体が存在していたと考えられる。しかし、マイクロソーム画分及び 1 % Sarkosyl 処理マイクロソーム画分を人免疫グロブリン溶液にスパイクした場合には、除去効率が增大した。孔径 0.22 μm のろ過膜でのプリオン除去効率がスパイク用病原体試料の種類により異なった原因として、5 % 人免疫グロブリン溶液中での PrP^{Sc} 凝集体の形成促進及び高濃度蛋白質溶液に起因するろ過膜の目詰まりなどが考えられる。しかし、3 % Sarkosyl 抽出マイクロソーム画分を用いた場合には除去効率の増大が認められなかったことは、スパイク用 PrP^{Sc} 試料の性質の把握、及び目的に応じたスパイク用試料の適切な選択の重要性を示している。

3. 製造工程がもつ PrP^{Sc} の除去能等の評価に関する調査研究

3-1. PrP^{Sc} 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^{Sc} の重合度

ろ過による PrP^{Sc} の除去に関して、Silveira らの報告内容も含めて公表文献に示されている除去効率を一覧にまとめて表 2 に示す。これによると、ろ過による PrP^{Sc} の除去効率には概ね次のような傾向が認められる。

- ① 蛋白質濃度が非常に高く、ろ過膜の目詰まりが起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^{Sc} の除去は期待できない。

但し、精製 PrP^{Sc} をスパイク用病原体試料として高エタノール条件下でろ過を実施した場合には、精製 PrP^{Sc} が変性・凝集しやすいためか、他のスパイク用病原体試料を用いた場合と比べて過大な RF が見積もられる。

- ② 孔径 40～75 nm のろ過膜によるろ過では、若干の PrP^{Sc} 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。
- ③ ヒト PrP^{Sc}1 型に比べて、ヒト PrP^{Sc}2 型 (蛋白質の立体構造が 1 型とは異なり、PK 処理による切断部位が異なるもの) 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。
- ④ 孔径 35 nm 以下のろ過膜によるろ過は PrP^{Sc} の除去に有効である。特に孔径 15 nm 以下のろ過膜を用いてのろ過は、1 % Sarkosyl 共存下でも PrP^{Sc} を有効に除去することが可能である。
- ⑤ 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^{Sc} 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。

これらの知見を Silveira らの報告内容 (図 8～9、表 1) と照らし合わせてみる。①に関して、孔径 100 nm のろ過膜により除去され得る PrP^{Sc} 重合体は、繊維構造をとっている FIFFF 画分 22 以後のものが大半とみられ、これを除くだけではろ液中に感染性は 1 % 以上残存する

(ろ過工程における RF が 2 以上を達成するためには、ろ液中の PrP^{Sc} 量が 1/100 以下となる必要がある)。

②及び④に関して、孔径 35 nm のろ過膜によるろ過では FIFFF 画分 16 以後が、孔径 15 nm のろ過膜によるろ過では画分 7 以降がほとんど除去されると考えられる。画分 7 より前 (PrP^{Sc} 単量体～数個程度の重合体) には感染性がほとんどみられないことは、孔径 15 nm のろ過膜によるろ過が PrP^{Sc} の除去に有効であることと矛盾しない。また、孔径 35 nm のろ過膜によるろ過でも高い RF が得られていることは、通常の PrP^{Sc} クリアランス条件下ではろ過前液に Sarkosyl 等の界面活性剤が共存しておらず、1 % SUS を含む条件で FIFFF が実施された引用文献 2 に比べて、画分 16 より前に分画されるような PrP^{Sc} 単量体～数十程度の重合体がろ過前液中に含まれている割合が少ないことを示唆しているものと考えられる。⑤に関して、分画分子量 300 kDa のろ過膜を用いたろ過では FIFFF 画分 9 より前の PrP^{Sc} を除去することができず、ろ液に 2 % 程度の感染性が残存するが、分画分子量 180 kDa のろ過膜を用いた場合には、画分 7 以降の PrP^{Sc} 重合体を除去することが可能となり、PrP^{Sc} 除去に有効である。

以上のとおり、既に発表されているろ過工程での RF に関する報告内容①～⑤は、Silveira らの報告で得られた知見と矛盾しておらず、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^{Sc} 除去に有効である。しかしながら、界面活性剤濃度が高い場合には、界面活性剤の効果により PrP^{Sc} 凝集体のサイズが小さくなることに加えて、ろ過膜の上に集積する蛋白質ケーキが形成されにくくなること、ろ過膜の目詰まりが起こりやすくなること等の理由により、RF が大きく低下する可能性がある（「D. 考察」2 参照）、PrP^{Sc} クリアランス評価を行う際には実生産工程を踏まえた試験条件の設定が重要である。

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

<ろ過工程>

設計したスケールダウン試験系が実生産工程を適切に反映しているかどうかの確認は、PrP^{Sc} クリアランス試験が設計どおり行えたか、得られたろ液が実生産工程と同等の品質のものであるか等を確認することによって行う（表 3）。

<クロマトグラフィー工程>

設計したスケールダウン試験系が実生産工程を適切に反映しているかどうかの確認は、PrP^{Sc} クリアランス試験が設計どおり行えたか、得られた溶出液が実生産工程と同等の品質のものであるか等を確認することによって行う（表 4）。

3-3. 血液中に存在する PrP^{Sc} の検出方法

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^{Sc} 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^{Sc} 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されていないが、医薬品等の PrP^{Sc} 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。但し、強制感染動物モデルの血液を試料とした試験系の評価においては、PrP^{Sc} を脳内に接種する際に PrP^{Sc} が血液中に漏出するおそれがあることに注意しなければならない。

E. 結論

本年度は以下のような研究成果が得られた。

- ① 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、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 蛋白質の核への移行が推定された。
- ② ミクロソーム画分から 3 % Sarkosyl により抽出された PrP^{Sc} 画分について、プロセスバリデーションにおけるスパイク用病原体試料として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 μm 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 処理マイクロソーム画分及び 3 % Sarkosyl 抽出マイ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 PBS に添加し、これらを PrP^{Sc} クリアランス試験用の病原体溶液としたところ、ろ過膜による PrP^{Sc} の除去効率はいずれも同程度であり (RF が 0.6 ~ 0.8)、PrP^{Sc} はろ過膜を通過した。しかし、マイクロソーム画分及び 1 % Sarkosyl 処理マイクロソーム画分を 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^{Sc} の RF が 2.4 に増大、すなわちろ液中の PrP^{Sc} が約 250 分の 1 に減少した。一方、3 % Sarkosyl 抽出マイクロソーム画分を 5 % 人免疫グロブリン溶液に添加した病原体溶液では、PrP^{Sc} 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^{Sc} 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^{Sc} 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^{Sc} 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^{Sc} の除去は期待できない。但し、精製 PrP^{Sc} をスパイク用病原体試料として高エタノール条件下でろ過を実施した場合には、精製 PrP^{Sc} が変性・

凝集しやすいためか、他のスパイク用病原体試料を用いた場合と比べて過大な RF が見積もられる。

(ii) 孔径 40 ~ 75 nm のろ過膜によるろ過では、若干の PrP^{Sc} 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^{Sc}1 型に比べて、ヒト PrP^{Sc}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^{Sc} の除去に有効である。特に孔径 15 nm 以下のろ過膜を用いてのろ過は、1 % Sarkosyl 共存下でも PrP^{Sc} 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^{Sc} 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^{Sc} 除去に有効である。

② EMEA 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^{Sc} 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。

③ 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^{sc} 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^{sc} 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され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^{sc} 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。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

<平成17年>

- 1) Furuoka, H., Yabuzoe, A., Horiuchi, M., Tagawa, Y., Yokoyama, T., Yamakawa, Y., Shinagawa, M., and Sata, T. "Effective antigen-retrieval method for immunohistochemical detection of abnormal isoform of prion proteins in animals." *Acta Neuropathol.* 109: 263-271 (2005)
- 2) Inanami, O., Hashida, S., Iizuka, D., Horiuchi, M., Hiraoka, W., Shimoyama, Y., Nakamura, H., Inagaki, F., and Kuwabara, M. "Conformational change in full-length mouse prion: A site-directed spin-labeling study." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 335: 785-792 (2005)
- 3) Iwata, A., Yamaguchi, T., Sato, K., Yoshitake, N., and Tomoda, A. "Suppression of proliferation of poliovirus and porcine parvovirus by novel phenoxazines, 2-amino-4,4 α -dihydro-4 α -7-dimethyl-3H-phenoxazine-3-one and 3-amino-1,4 α -dihydro-4 α -8-dimethyl-2H-phenoxazine-2-one." *Biol. Pharm. Bull.* 28: 905-907 (2005)
- 4) Yamamoto, Y., Akita, Y., Tai, S., Fukasaku, S., Yamaguchi, T., Oshizawa, T., Yamaoka, K., Shimamura, M., and Hazato, T. "Two-dimensional electrophoretic analysis of disease-associated proteins in human cerebrospinal fluid from patients with rheumatoid arthritis." *J. Electrophoresis* 49: 23-27 (2005)
- 5) Kurosaki, Y., Ishiguro, N., Horiuchi, M., and Shinagawa, M. "Polymorphisms of caprine PrP gene detected in Japan." *J. Vet. Med. Sci.* 67: 321-323 (2005)
- 6) Kataoka, N., Nishimura, M., Horiuchi, M., and Ishiguro, N. "Surveillance of chronic wasting disease in sika deer, *Cervus nippon*, from Tokachi district in Hokkaido." *J. Vet. Med. Sci.* 67: 349-351 (2005)
- 7) Horiuchi, M., Furuoka, H., Kitamura, N., and Shinagawa, M. "Alymphoplasia mice are resistant to prion infection via oral route." *Jpn. J. Vet. Res. (in press)*
- 8) 堀内 基広. "BSE 診断法の開発と現状." *Virus Report* 2: 20-27 (2005)
- 9) 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: 45-55 (2005)
- 10) 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: 515-519 (2005)
- 11) 堀内 基広. "動物由来感染症としてのプリオン病." *日本臨床* 63: 2213-2220 (2005)
- 12) 堀内 基広. "異常型プリオン蛋白質の生合成と伝達." *膜* 30: 78-83 (2005)
- <平成 16 年>
- 13) 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)
- 14) 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: 3473-3482 (2004)
- 15) 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: 1293-1295 (2004)
- 16) 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: 40-51 (2004)
2. 学会発表
- <平成 18 年>
- 1) 蜂須賀 暁子, 児矢野 聡, 菊池 裕, 中島 治, 青笹 正義, 松田 治男, 手島 玲子, 澤田純一. "抗マウスプリオンペプチドフェージ 1 本鎖抗体の作製." 日本薬学会第 126 年会 (28-30 Mar. 2006, 仙台)
- <平成 17 年>
- 2) 堀内 基広, 品川 森一. "蛍光相関分光法による未変性条件下での異常型プリオン蛋白質の検出." 第 53 回日本ウイルス学会 (20-22 Nov. 2005, 横浜)
- 3) 瓜生 匡秀, 堀内 基広. "マウス神経芽腫細胞 Neuro-2a のプリオン感受性は PrP^C 以外の因子により規定される." 第 53 回日本ウイルス学会 (20-22 Nov. 2005, 横浜)
- 4) 菊池 裕, 中島 治, 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, 高島 浩介. "ヒトグリオブラストーマ T98G 細胞株が発現するスプライシング変異プリオン蛋白質遺伝子のヒト組織中での検出." 第 78 回日本生化学会大会 (19-22 Oct. 2005, 神戸)
- 5) 金 チャンラン, 堀内 基広. "培養細胞における正常プリオン蛋白質の新たな細胞内局在." 2005 年プリオン研究会 (25-26 Aug. 2005, 山形)
- 6) Sakai, A., Kikuchi, Y., and Takatori, K. "Differentially expressed genes in BALB/3T3 cells with exposure to non-genotoxic chemicals which promote cell transformation." 5th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences (21-25 Aug. 2005,

Berlin, Germany)

<平成 16 年>

- 7) 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)
 - 8) 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)
 - 9) 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)
 - 10) 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)
 - 11) 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)
 - 12) Horiuchi, M. "BSE screening in Japan." The animal prion disease and USE (14-16 Oct. 2004, Ames, USA)
 - 13) 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)
 - 14) 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)
- 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。

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

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

研究要旨

- ① 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クリアランス指数 (RF) に関する報告内容を精査した結果、ろ過による異常型プリオン (PrP^{Sc}) 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^{Sc} の除去は期待できない。但し、精製 PrP^{Sc} をスパイク用病原体試料として高エタノール条件下でろ過を実施した場合には、精製 PrP^{Sc} が変性・凝集しやすいためか、他のスパイク用病原体試料を用いた場合と比べて過大な RF が見積もられる。
 - (ii) 孔径 40 ~ 75 nm のろ過膜によるろ過では、若干の PrP^{Sc} 除去効果が認められる。但し、ろ過時に界面活性剤 (1 % Sarkosyl (N-ラウロイルサルコシナトリウム)) 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^{Sc}1 型に比べて、ヒト PrP^{Sc}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^{Sc} の除去に有効である。特に孔径 15 nm 以下のろ過膜を用いてのろ過は、1 % Sarkosyl 共存下でも PrP^{Sc} 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^{Sc} 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^{Sc} 除去に有効である。
- ② 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^{Sc} 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。
- ③ 現在までに輸血によりクロイツフェルト・ヤコブ病 (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^{Sc} 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^{Sc} 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され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^{Sc} 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。

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、同年 7 月及び 2005 年 3 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。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型

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。

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。

平成 16 年度は、欧州医薬品審査庁 (EMA) から同年 10 月に示された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 (引用文献 1) に基づき、PrP^{Sc} クリアランス評価における要点を明らかにした。また、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・整理した。

平成 17 年度は、①プロテナーゼ K 抵抗性の異常型プリオン蛋白質 (PrP^{Res}) の重合度と感染性との関係について Silveira らが同年 9 月に発表した論文 (引用文献 2)、及び発病までの経過や病状の異なるヒト PrP^{Sc} サブタイプ間での重合度の違いに関して Kobayashi らが同年 1 月に発表した論文 (引用文献 3) 等を精査し、特にろ過工程における PrP^{Sc} 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。②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。③血液中に存在する PrP^{Sc} の検出方法に関する報告（引用文献 4～6）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^{Sc} 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。

<引用文献>

- 1) 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)
- 2) Silveira, J. R., *et al.* "The most infectious prion protein particles." *Nature* 437: 257-261 (2005)
- 3) Kobayashi, A., *et al.* "Type 1 and type 2 human PrP^{Sc} have different aggregation sizes in methionine homozygotes with sporadic, iatrogenic and variant Creutzfeldt-Jakob disease." *J. Gen. Virol.* 86: 237-240 (2005)
- 4) Castilla, J., *et al.* "Detection of prions in blood." *Nat. Med.* 11: 982-985 (2005)
- 5) Fujita, R., *et al.* "Efficient detection of PrP^{Sc} (263K) in human plasma." *Biologicals (in press: Available online 28 Oct. 2005)*
- 6) Orser, C., *et al.* "A New Assay For The Detection Of Misfolded Prion Protein (PrP^{Sc}) In Blood." 第 12 回日本血液代替物学会年次大会 発表要旨 (6-7 Jun. 2005, 東京)

B. 研究方法

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)

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. PrP^{Sc} 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^{Sc} 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^{Sc} の重合度と感染性との関係についての論文を発表した（引用文献 2）。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、スクレイピー 263K 株感染ハムスターの脳からプロテナーゼ K 抵抗性の PrP^{Sc} を精製した（純度 90%以上）。得られた精製 PrP^{Sc} 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^{Sc} 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^{Sc} 単量体及び各重合体を分画した。

FIFFF 各画分のスクレイピ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^{Sc}) から PrP^{Res} 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^{Res} 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ピー感染性、PrP^{Res} → PrP^{Sc} 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 1 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^{Res} → PrP^{Sc} 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 1 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 1 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^{Res} の 14 ~ 28 量体が含まれていることが判明した。また、感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 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^{Res} 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^{Res} → PrP^{Sc} 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 2 a)。また、同様に調製した精製 PrP^{Res} 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 2 b、図 3、表 2)。

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

EMEA 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^{Sc} クリアランス評価のための指針 (引用文献 1) 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 mm のろ過膜 (膜面積 1 m²) 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 m² 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^{Sc} 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^{Sc} 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. 血液中に存在する PrP^{Sc} の検出方法

血液中に存在する PrP^{Sc} の検出方法に関する報告 (引用文献 4 ~ 6) 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^{Sc} 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^{Sc} 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^{Sc} 感染ハムスターの約 31% しか陽性とならず、実用化するためには感度に問題があった上、試験結果を得るまでに数カ月単位の時間を要すること、試験の実施に費用や手間がかかること等の難点もあった (Brown, P., *et al. J. Lab. Clin. Med.* 137: 5-13 (2001))。また、試験に用いる実験動物において、ヒト血液中の PrP^{Sc} が種間障壁を超えて臨床症状を再現できるかどうか必ずしも確実ではない。

Soto らは、PrP^{Sc} が PrP^{Pr} の構造変換を引き起こして PrP^{Pr} にする性質を利用して、動物脳組織中の微量の PrP^{Sc} を増幅して生化学的に検出する方法を考案した (Soto, C., *et al. "Pre-symptomatic detection of prions by cyclic amplification of protein misfolding." FEBS Let.* 579: 638-642 (2005))。この方法 (PMCA 法; Protein Misfolding Cyclic Amplification 法) の概略は次のとおり。PrP^{Sc} を含む試料に試験管内で大量の正常プリオン (PrP^C) を添加・混合して放置することによって、PrP^C の一部が PrP^{Sc} に構造変換されて PrP^{Sc} の増幅・凝集が起こる。約 30 分後に PrP^{Sc} の凝集体を分離し、超音波処理を行って PrP^{Sc} を解離させた後、再び大量の PrP^C を添加する。このサイクルを繰り返すことにより、最初の試料に含まれていた微量の PrP^{Sc} は指数関数的に増幅し、ウェスタンブロットによる検出が容易となる。263K 株感染ハムスター脳乳剤を用いた検討では、従来のウェスタンブロット (PMCA 法非実施) で陽性となるのは感染 6 週以後であった一方、PMCA 法では感染 2 週後 (臨床症状の発現前) から PrP^{Sc} の検出が可能であった。

今般、Castilla、Soto らは、PMCA 法