

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18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山口 照英

平成19（2007）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 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 …………… 23
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^{Sc} 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 …………… 31
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 …………… 39
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 …………… 47

IV. 研究成果の刊行物・別刷 …………… 51

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 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^{Sc}）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^{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、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^{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 T98G 細胞が発現するプリオン蛋白質（PrP）の C 末端と GPI アンカーシグナル配列を欠損したスプライス変異型 PrP mRNA からベクターを構築し、大腸菌で組換え蛋白質を発現させた。次にイムノブロット法を行い、スプライス変異型 PrP の C 末端部位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 HPSV178 が組換え蛋白質を認識することを確認した。HPSV178 を用いたイムノブロット法で、継代数を重ねた T98G 細胞がスプライス変異型 GPI アンカー欠損 PrP（GPI⁻ PrPSV）を発現し、その産生は低酸素濃度下で誘導されることを見いだした。GPI⁻ PrPSV は糖鎖をもたず、非イオン性界面活性剤に易溶性で、細胞質画分に分布していた。
- ② 医薬品等のプリオン汚染を評価するためのプロセスバリデーションでは、使用するプリオンの性状、すなわちプリオンの構成要素である PrP^{Sc} の物理化学的性状によって除去効率が変わり、結果を過大評価するおそれがある。昨年度の研究で、プリオン感染動物から作製した脳乳剤を陰イオン界面活性剤 Sarkosyl（N-ラウロイルサルコシンナトリウム）で処理することで、粒子サイズが小さく、100,000 × g の遠心でも沈殿しない PrP^{Sc} 凝集体が抽出できること、また、このような PrP^{Sc} 画分が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有用であることを報告した。本年度は、Sarkosyl により抽出したスパイク用試料を用いて、人免疫グロブリン製造工程中のナノフィルトレーション工程のプロセスバリデーションモデル実験を行った。263K 株感染ハムスター

脳から調整したマイクロソーム画分、1.0 % Sarkosyl 処理マイクロソーム画分、および 3.0 % Sarkosyl 抽出マイクロソーム画分を 5 % 人免疫グロブリン溶液等に添加したものを PrP^{Sc} クリアランス試験用の病原体溶液として、プラノバ 35N および 20N 膜を用いたろ過実験を行った。その結果、3.0 % Sarkosyl 抽出マイクロソーム画分を PBS あるいは免疫グロブリン溶液の溶媒である 0.3 mol/L グリシン溶液に添加した病原体溶液を使用した場合、クリアランス指数 (RF) は 1 以上であったが、PrP^{Sc} はプラノバ 35N 膜を通過した。しかし、プラノバ 20N 膜のろ液中には PrP^{Sc} が検出されなかった。一方、5 % 人免疫グロブリン溶液を含む病原体溶液を使用した場合は、PrP^{Sc} はプラノバ 35N 膜のろ液中には検出されなかった。以上の結果から、PrP^{Sc} 凝集体の中には、排除サイズ 35 nm の多孔性膜は通過し得るサイズのものが存在すること、その除去効率は溶液の性状により変化することが明らかとなった。

- ③ 欧州ではプリオン除去フィルターが昨年承認され、英国及びアイルランドの血液センターで実用化のための評価試験が実施中である。今年に入ってから、トランスジェニック技術によりプリオン遺伝子をもたないウシの作製に成功したとの報告もあり、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、これら新技術の開発動向には十分注意しておく必要がある。

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

協力研究者

中島 治

国立医薬品食品衛生研究所
機能生化学部 主任研究官

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いる。例えば、平成 15 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^{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

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

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^{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。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^{Sc} 感染の予防的防御対策として、PrP^{Sc} 除去／不活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^{Sc} 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^{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した。

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 PrP^{Sc} 安全性に関する試験研究
- 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

- ③ 製造工程がもつ PrP^{Sc} 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、継代数を重ねた T98G 細胞が発現するスプライス変異型 GPI アンカー欠損 PrP (GPI PrPSV) の標準品候補となる遺伝子組換え蛋白質等を作製し、その性質を解析した。(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^{Sc} 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、医薬品等の PrP^{Sc} 安全性確保の方策に関して引き続き文献調査を行い、これまでの調査の結果をまとめた。(担当：山口、永田)

B. 研究方法

1. PrP^{Sc} の処理方法の能力評価に関する試験研究

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. 組換え蛋白質の調製

ヒト PrP の cDNA は T98G 細胞のゲノム DNA から調製した。GPI⁻ PrPSV の cDNA は、PrP の cDNA との共通部位に、合成オリゴヌクレオチドをアッセンブリー PCR で結合させて作製した。それぞれの cDNA を pET-22b ベクターに組み込み、大腸菌 *E. coli*

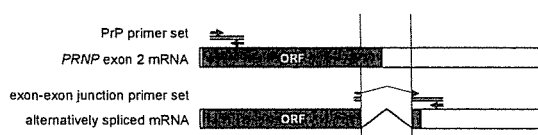


図 1. Schematic representation of quantitative RT-PCR primer sets

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

BL21 (DE3)pLysS で発現させた。

1-3. 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 抗体として抗 PrP 抗体又は抗 GPI⁺ PrPSV マウスモノクローナル抗体 HPSV178 を、第 2 抗体として西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗 IgG 抗体を用いたイムノブロッティングを行い、化学発光法で検出した。

1-4. 細胞分画法

ソニケーターで T98G 細胞を破碎後、遠心分離 (500 × g、4°C、5 分間) で核画分を除いた細胞懸濁液を調製し、遠心分離後 (100,000 × g、4°C、60 分間) に上清として細胞質画分を、沈殿物として膜画分を得た。

1-5. 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⁻ 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、スプライス変異を検出する exon-exon junction プライマー (図 1) 及びハウスキーピング遺伝子である β-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。

1-6. 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 μg/mL、37°C、30 分間) した後、イムノブロット法により PrP の蛋白質分解酵素抵抗性を調べた。

2. プロセスバリデーションに適した PrP^{Sc} 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

2-1. スクレイパー株

ハムスター順化スクレイパー 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パー Obihiro 株 (Shinagawa, M., *et al., Microbiol. Immunol.* 29: 543-551 (1985)) を用いた。

2-2. ミクロソーム画分の調製

スクレイパ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 μg/mL ロ

イペプチン、1 µg/mL アプロチニン、1 µg/mL ペプスタチン、2 µmol/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 µmol/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 °C で 6,000 × 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 °C で 6,000 × 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 °C で 100,000 × 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。得られたミクロソーム画分は分注して、-20 °C で保存した。

2-3. スパイク試験

① 263K 株感染脳から得たミクロソーム画分、②ミクロソーム画分に 1.0 % Sarkosyl を加えた 1.0 % Sarkosyl 処理ミクロソーム画分、又は③ミクロソーム画分を 3.0 % Sarkosyl で抽出して得た 3.0 % Sarkosyl 抽出ミクロソーム画分をスパイク用病原体試料として、PBS、人免疫グロブリン (5 % 人免疫グロブリン、0.3 mol/L グリシン) 又は 0.3 mol/L グリシン溶液に添加した。この病原体溶液を中空糸微多孔膜 (製品名: プラノバ 35N 及び 20N 膜、旭化成) によるナノフィルトレーションに供した。プラノバ膜によるろ過は 78 kPa の一定圧力で行った。

2-4. PrP^{Sc} 検出用試料の調製及び PrP^{Sc} の検出

試料を 10 µg/mL PK で 37 °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。その後、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 µL 加えて攪拌し、4 °C で 20,000 × g の遠心を 10 分間行い、蛋白質を沈殿させた。沈殿に 1 × 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 % ブロモフェノールブルー] を 20 µL 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 × 試料用緩衝液を 100 µL 加え、5 分間煮沸した。

PrP^{Sc} 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 (富士写真フイルム社) で取り込み、定量解析を行った。

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

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. PrP^{Sc} の処理方法の能力評価に関する試験研究

1-1. 組換えヒトプリオン蛋白質及びスプライス変異型プリオン蛋白質の調製

ヒト PrP のアミノ酸配列 23 ～ 230 残基に相当する組換え蛋白質 (rhPrP) 及び T98G 細胞が発現する GPI⁻ PrPSV mRNA の 23 ～ 230 残基に相当する組換え蛋白質 (rhPrPSV) を調製した。T98G 細胞の *PRNP* がコードする PrP はコドン 129 に Met/Val をもっていることから、それぞれの多型を有する組換え蛋白質を大腸菌で発現させ、各種抗体を用いてその産生を確認した。PrP の N 末端を認識するニフトリモノクローナル抗体 HUC2-13 (図 2 (A)) 及び C 末端を広く認識するマウスモノクローナル抗体 17H5 (図 2 (B)) は、T98G 細胞が産生する PrP を認識し、糖鎖がない PrP と同様の位置に組換え蛋白質に相当するバンドを示した。一方、PrP の C 末端側 214 ～ 230 残基を認識するウサギポリクローナル抗体 HPC2 は組換え hPrP を、GPI⁻ PrPSV の C 末端側 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 HPSV178 は組換え hPrPSV をそれぞれ認識した (図 2 (C)・(D))。以上の結果から、HPSV178 は GPI⁻ PrPSV を認識することが確認された。

1-2. T98G 細胞が産生するスプライス変異型 PrPSV の解析

T98G 細胞を長期間培養後に調製した細胞懸濁液を用い、PrPSV 産生の継代数の変化を調べた。継代 40 週間後に 40 日間培養した T98G 細胞 (P40D40) では HPSV178 が認識するバンドは検出されないが (図 2 (D) レーン 5、図 3 (A) レーン 1)、52 週間

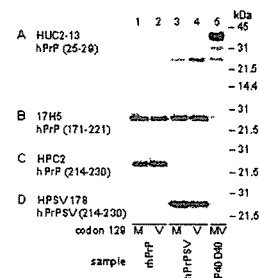


図 2. Immunoblot analysis of recombinant human PrP and splice variant isoform of PrP

Recombinant human PrP [codon 129M (lane 1) and 129V (lane 2)], splice variant isoform of PrP [codon 129M (lane 3) and 129V (lane 4)], and homogenates (lane 5) from T98G cells for 40 days after 40 passages (P40D40) were subjected to immunoblot with the HUC2-13 (A), 17H5 (B), HPC2 (C) or HPSV178 (D) antibodies. Epitope recognition sites located within PrP or PrPSV are shown as amino acid numbers.

以降では GPI⁻ PrPSV の産生が確認された (図 3 (A) レーン 2・3)。

PrP は 2 本のアスパラギン酸結合型糖鎖を有する糖蛋白質で、継代 77 週間後に 40 日間培養した T98G 細胞 (P77D40) は糖鎖 2 本、1 本及び糖鎖がないそれぞれ 35、31 及び 25 kDa のバンドを示した (図 3 (B) 上段 レーン 1)。N-グリコシド結合を切断する PNGase F 処理によってマウスモノクローナル抗体 6H4 が認識する高分子量の 2 本のバンドは消失し、25 kDa のバンドが増大した (図 3 (B) 上段 レーン 2)。一方、HPSV178 が認識する PrPSV には糖鎖がなく、PNGase F 処理で 25 kDa のバンドに変化はなかった (図 3 (B) 下段 レーン 1・2)。

PrP^C は GPI アンカー型蛋白質で細胞膜上に存在することから、T98G 細胞が産生する GPI⁻ PrPSV の細胞内での局在を調べた。T98G 細胞 (P77D44)

の細胞懸濁液には 6H4 が認識する PrP は膜画分に局在し (図 3 (C) 上段)、HPSV178 が認識する GPI⁻ PrPSV は細胞質画分に局在していた (図 3 (C) 下段)。

次に、T98G 細胞が産生する PrP の非イオン性界面活性剤に対する溶解性を調べた。T98G 細胞 (P77D40) を破碎し、非イオン性界面活性剤に溶解後に遠心分離 (100,000 × g、4°C、60 分間) し、得られた上清と沈殿物のイムノブロット法を行った。細胞懸濁液 (図 3 (D) レーン 1) と同様に、非イオン性界面活性剤可溶画分には 6H4 及び HPSV178 がそれぞれ認識する PrP 及び PrPSV が存在するが (図 3 (D) レーン 3)、不溶性画分では検出されなかった (図 3 (D) レーン 2)。得られた上清と沈殿物のイムノブロット法を行った。細胞懸濁液 (図 3 (D) レーン 1) と同様に、非イオン性界面活性剤可溶画分には 6H4 及び HPSV178 がそれぞれ認識する PrP 及び GPI⁻ PrPSV が存在するが (図 3 (D) レーン 3)、不溶性画分では検出されなかった (図 3 (D) レーン 2)。

1-3. 低酸素濃度下で培養した T98G 細胞が産生する PrPSV の解析

低酸素濃度下で培養した T98G が発現する mRNA の解析を、リアルタイム定量 PCR で行った。90 回の継代後に 40 日間培養した T98G 細胞 (P90D40) に比較して (図 4 normoxia)、最後の 4 日間を低酸素濃度下 (hypoxia ; 2 % O₂) で培養すると PrP mRNA の発現量は減少し、GPI⁻ PrPSV mRNA は増加した (図 4 hypoxia)。同様に、低酸素濃度下と類似した性状を引き起こすコバルト存在下 (100 μmol/L CoCl₂) で T98G 細胞を 4 日間

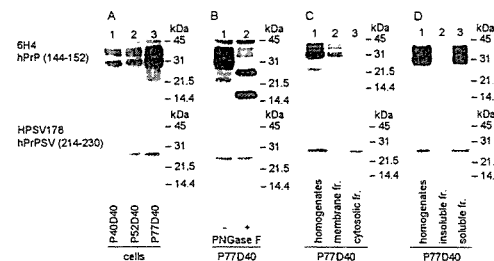


図 3. Characterization of splice variant form of GPI anchorless PrP in T98G cells

(A) Detection of GPI⁻ PrPSV. T98G cells for 40 days after 40 passages (P40D40), 52 passages, and 77 passages were scraped into PBS - 2.5 mM EDTA and sonicated. The postnuclear fractions (50 μg protein each) were subjected to immunoblot with the 6H4 (upper panel) or HPSV178 (lower panel) antibodies.

(B) Analysis of deglycosylated forms of GPI⁻ PrPSV. T98G cells for 40 days after 77 passages (P77D40) were scraped into PBS - 2.5 mM EDTA and sonicated. The postnuclear fractions (50 μg protein each) were incubated with (lane 1) or without (lane 2) PNGase F for 120 min. The digested homogenates were boiled for 10 min and subjected to immunoblot with the 6H4 (upper panel) or HPSV178 (lower panel) antibodies.

(C) Subcellular localization of GPI⁻ PrPSV. T98G cells for 40 days after 77 passages (P77D40) were scraped into PBS - 2.5 mM EDTA and sonicated. The homogenates (50 μg protein each) were centrifuged at 100,000 × g for 60 min at 4°C to obtain a membrane fraction and a cytosolic fraction. The resultant fractions were subjected to immunoblot with the 6H4 (upper panel) or HPSV178 (lower panel) antibodies.

(D) Detergent solubility of GPI⁻ PrPSV. T98G cells for 40 days after 77 passages (P77D40) were scraped into PBS - 2.5 mM EDTA and sonicated. Homogenates (H) of 50 μg protein were dissolved in 9 volumes of 0.5 % NP-40 - 0.5 % deoxycholate - PBS and centrifuged at 100,000 × g for 60 min at 4°C to obtain a nonionic detergents-insoluble pellet and a soluble supernatant fraction. The pellet fraction (insoluble fr.) and the methanol-precipitated supernatant fraction (soluble fr.) were resuspended in the same volume of PBS - 2.5 mM EDTA. Homogenates (lane 1), pellet fraction (lane 2), and supernatant fraction (lane 3) (50 μg protein each) were subjected to immunoblot with the 6H4 (upper panel) or HPSV178 (lower panel) antibodies.

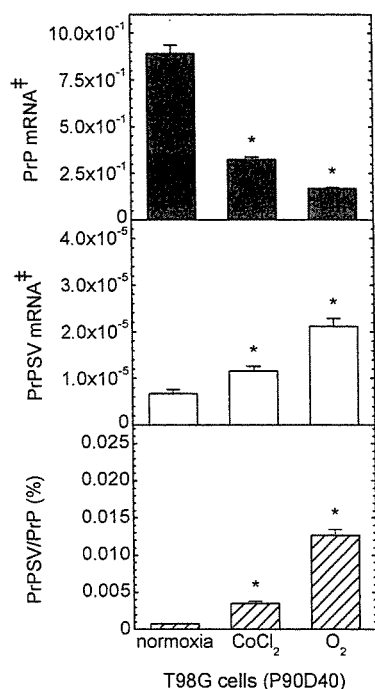


図 4. Quantification of splice variant of PrP mRNA in T98G cells

T98G cells for 40 days after 90 passages (P90D40) were exposed to hypoxia (2 % O₂), CoCl₂ (100 µmol/L), and normoxia for the last 4 days. The resulting total RNA (5 µg) were analyzed by real-time quantitative RT-PCR with PrP primer set (black bars) and exon-exon junction primer set (white bars). Splice variant of PrP mRNA were shown as average relative expression values normalized to PrP mRNA (hatched bars). Values are the mean ± standard error (SE) of three independent cell samples.

‡ The β-actin primer set was used as a control for the amount of RNA used in each reaction (data not shown)

* $p < 0.05$ compared with normoxia (Student t -test).

培養すると、PrP mRNA の発現量は減少し、GPI⁻ PrPSV mRNA は増加した (図 4 CoCl₂)。

次に、T98G 細胞 (P90D40) の細胞懸濁液を用いたイムノプロット法で、PrPSV 産生の変化を調べた。低酸素濃度下 (2 % O₂) 又はコバルト存在下 (100 µmol/L CoCl₂) で 4 日間培養すると、HPSV178 が認識する GPI⁻ PrPSV の産生量が増加した (図 5 下段、レーン 1・3・5)。継代を重ねた T98G 細胞を

長期間培養すると PrP は PK 処理抵抗性を示すが (図 5 上段)、GPI⁻ PrPSV は PK 処理感受性だった (図 5 下段)。

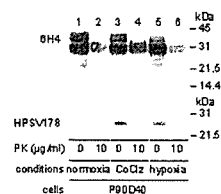
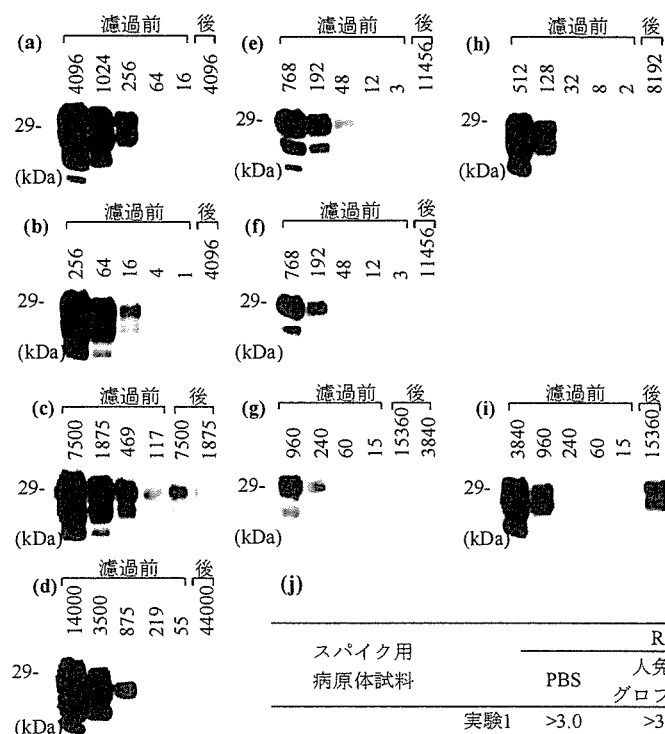


図 5. Proteinase K sensitivity of splice variant form of GPI anchorless PrP in T98G cells

T98G cells for 40 days after 90 passages (P90D40) were exposed to hypoxia (2 % O₂, lanes 5 and 6), CoCl₂ (100 µmol/L, lanes 3 and 4), and normoxia (lanes 1 and 2) for the last 4 days. Methanol-precipitated homogenates (50 µg protein) were treated with PK (10 µg/mL) at 37°C for 30 min (lanes 2, 4, and 6) or left undigested (lanes 1, 3, and 5). The resultant homogenates were boiled for 10 min and subjected to immunoblot with the 6H4 (upper panel) or HPSV178 (lower panel) antibodies.

2. プロセスバリデーションに適した PrP^{Sc} 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

図 6 にプラノバ 35N フィルターによるろ過試験の結果の代表例を示した。プラノバ 35N を用いたろ過試験では、ミクロソーム画分 (図 6 (a)、(e) 及び (h)) 及び 1 % Sarkosyl 処理ミクロソーム画分 (図 6 (b) 及び (f)) は、いずれの溶媒にスパイクした場合でもろ液から PrP^{Sc} は検出されなかった。一方、3 % Sarkosyl 抽出ミクロソーム画分を PBS にスパイクした場合は、ろ液からも明瞭に PrP^{Sc} が検出された (図 6 (c))。検出されたバンドの発光



スパイク用 病原体試料		Rf		
		PBS	人免疫 グロブリン	0.3M グリシン
マイクロソーム画分	実験1	>3.0	>3.6	>3.0
	実験2	>3.0	>3.6	NT
	実験3	>3.0	NT	NT
1% Sarkosyl 処理 マイクロソーム画分	実験1	>2.4	>2.4	NT
	実験2	>2.4	>3.0	NT
	実験3	>3.6	NT	NT
3% Sarkosyl 抽出 マイクロソーム画分	実験1	1.2	>2.4	1.1

図 6. 中空糸微多孔膜を用いた PrP のナノフィルトレーション

(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、ブラノバ35N膜で濾過した。ろ過前液及びびろ液からPrP^{Sc}検出用試料を調製し、試料を4倍段階希釈して各レーンにアブライシ、検出限界を確認した。各レーン上の数字はアブライシした脳組織当量 (μg) を示す。

(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、ブラノバ35N膜で濾過した。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、ブラノバ35N膜で濾過した。以下、(a) と同様。

(d) 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、ブラノバ20N膜で濾過した。以下、(a) と同様。

(e) 263K株感染ハムスター脳由来マイクロソーム画分を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ブラノバ35N膜で濾過した。以下、(a) と同様。

(f) 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ブラノバ35N膜で濾過した。以下、(a) と同様。

(g) 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ブラノバ35N膜で濾過した。以下、(a) と同様。

(h) 263K株感染ハムスター脳由来マイクロソーム画分を0.3 Mグリシン溶液に1/100量スパイクした病原体溶液を、ブラノバ35N膜で濾過した。以下、(a) と同様。

(i) 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0.3 Mグリシン溶液に1/4量スパイクした病原体溶液を、ブラノバ35N膜で濾過した。以下、(a) と同様。

(j) ろ過前液及びびろ液に含まれるPrP^{Sc}のバンド強度を定量し、脳組織当量で補正した後、RF (Reduction Factor、RF = log₁₀ [ろ過前液のPrP^{Sc}量/ろ液のPrP^{Sc}量]) を算出した。同様の実験を1~3回行って求めたRF。

強度を定量して、その RF を求めたところ、1.2 であった。つまり、スパイクした PrP^{Sc} の 6 % 程度が、排除サイズ 35 nm のプラノバ 35N 膜を通過した。このように 3 % Sarkosyl 抽出画分は、ナノフィルトレーション工程のプロセスバリデーションに使用可能な粒子サイズの小さな PrP^{Sc} を含むことが確認できた。しかし、同画分を人免疫グロブリン溶液にスパイクした場合は、ろ液からは PrP^{Sc} は検出されなかった（図 6 (g)）。人免疫グロブリンは 0.3 mol/L グリシン溶液であり、溶液の pH は 6.5 である。この条件で PrP^{Sc} が等電点沈殿により沈殿したために、ろ液中に PrP^{Sc} が検出されなかった可能性を考慮して、3 % Sarkosyl 抽出ミクロソーム画分を 0.3 mol/L グリシン溶液にスパイクして同様の実験を行った（図 6 (i)）。その結果、ろ液から PrP^{Sc} が検出され、バンドの定量解析から RF は 1.1 と算出された。したがって、3 % Sarkosyl 抽出ミクロソーム画分を、人免疫グロブリン溶液にスパイクした際に、ろ液に PrP^{Sc} が検出されなかった理由は、グリシン溶液の影響ではなく、高濃度のグロブリンの影響と考えられた。また、3 % Sarkosyl 抽出ミクロソーム画分を PBS に添加した病原体溶液をプラノバ 20N 膜でろ過したところ、ろ液中からは PrP^{Sc} は検出されなかった（図 6 (d)）。

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. わが国の安全性確保のための方策等について

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／輸入販売業者によるリスク評価においては、推定総 RF に大きな幅があるのが現状である（例えば、血漿分画製剤類では、同種の製品間で 10⁹ 以上；薬事・食品衛生審議会血液事業部会運営委員会配布資料など）。さらに、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（例えば、最近の総説として、Yunoki, M., *et al.*, *Future Virol.* 1: 659-674 (2006)）、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。

3-2. ろ過による PrP^{Sc} の除去効率

医薬品等製造工程のうち、ろ過工程を例にとり、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。その結果、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。

- ① 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^{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。

3-3. 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

平成 16 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 (CHMP, 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))。当該指針の要点を表 1 に示す。

3-4. 血液中に存在する PrP^{Sc} の検出方法

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おらず、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^{Sc} の構造変換を引き起こして PrP^{Sc} 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 (PMCA 法; Protein Misfolding Cyclic Amplification 法) を考案した (Soto, C., *et al. FEBS Let.* 579: 638-642 (2005))。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。PMCA 法を自動化した装置も開発中であり、さらに本法が血液試料にも適用可能であることも示されている (Castilla, J., *et al. Nat. Med.* 11: 982-985 (2005))。それによると、スクレイパー強制感染ハムスター (n = 18) の血液各 20 µL を試料として、PMCA 法 140 サイクル (所要時間は約 3 日) を 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 × 10⁵ 分子/mL) であった。

一方、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

表1 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) 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、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、エタノール分画工程、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。

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* (Available online 28 Oct. 2005)). 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、プロテナーゼ K (PK) 処理の前に熱処理 (80 °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。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。

また、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^{Sc} 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。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ので、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、②このため検査時間も 30 分～3 時間にまで短縮できること、③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、のメリットがあるとのことである。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} の検出にも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 (6-7 Jun. 2005, 東京))。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。

3-5. その他、最近の動向

プリオン結合親和性樹脂が組み込ま

れた Pathogen Removal and Diagnostic Technologies 社 (PRDT 社) のプリオン除去フィルターが、欧州で昨年認可を取得し、英国及びアイルランドの血液センターで実用化のための評価試験が実施中とのことである (2006 年「血液製剤調査機構 Today's News 海外編」記事)。

また、Richt らは、トランスジェニック技術によりプリオン遺伝子をもたないウシの作製に成功し、20 ヶ月齢以上過ぎた時点でも健康上は何も問題がないと報告している (Richt, J. A., *et al.*, *Nat. Biotech.* 25: 132-138 (2007))。

D. 考察

1. PrP^{Sc} の処理方法の能力評価に関する試験研究

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^{res} を産生する (Kikuchi, Y., *et al.*, *J. Gen. Virol.* 85: 3449-3457 (2004))。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、アスパラギン酸結合型の糖鎖がなく、非イオン性界面活性剤に可溶で、細胞質画分に局在するスプライス変異型 GPI アンカー欠損 PrP (GPI⁻ PrPSV) を産生した。本研究で採用した HPSV178 を用いたイムノブロット法の検出感度では、52 週間以上継代しないと GPI⁻ PrPSV の産生は確認できなかった。図には示していないが、2 週間継代後の T98G 細胞でもスプライス変異型 PrP mRNA が確認できたことから、T98G 細胞は微量ながら恒常的に GPI⁻ PrPSV を発現している可能性がある。

プリオン蛋白質の 231 残基にストッ

プコドン挿入して GPI アンカーシグナルペプチドが欠損した組換え PrP 遺伝子を構築し、マウスニューロblastoma 細胞株 ScN2a で発現させると、糖鎖がない PrP が細胞質中に産生されること (Rogers, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3182-3186 (1993))、ヒトニューロblastoma 細胞株 SH-SY5Y で発現させると糖鎖がない PrP が培養液中に放出されること (Walmsley, *et al.*, *EMBO J.* 20: 703-712 (2001)) が報告されている。スプライシング変異によって生じた T98G 細胞が産生する GPI⁻ PrPSV は、これらの人為的に構築された GPI アンカー欠損型 PrP と同様な性状を示していることから、培養上清へ放出されている可能性がある。

また、プリオン蛋白質の 231 基にストップコドン挿入したトランスジェニックマウスでは、発現する PrP の大部分には糖鎖がなく、海馬のニューロンでは細胞内に局在し、スクレイパーの病変を促進することから、PrP の GPI アンカーはプリオン病の発症機構への関与が推定されている (Chesebro, *et al.*, *Science* 308: 1435-1439 (2005))。継代を重ねた T98G 細胞は GPI⁻ PrPSV を発現し、低酸素濃度下でその産生が誘導されることから、HIF1 α 等の hypoxia に関連した因子とプリオン病の発症機構の関連を解明することが望まれる。

2. プロセスバリデーションに適した PrP^{Sc} 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

脳内に蓄積した PrP^{Sc} の大部分は大きな凝集体を形成していると考えられ、100,000 $\times$ g の遠心では 99 % 以上

が沈殿する。このような PrP^{Sc} を使用した場合、膜ろ過工程のように、粒子サイズにより病原体を除去する工程のプロセスバリデーションでは、非常に除去効果が高いという評価結果が得られる。しかし、プリオンの感染性を有する PrP^{Sc} 凝集体のサイズは様々であり、安全性を重視した場合、サイズの小さい PrP^{Sc} を用いて評価することは重要である。

本研究では、3 % Sarkosyl 抽出ミクロソーム画分由来の PrP^{Sc} だけが、排除サイズ 35 nm を有するプラノバ 35N 膜を通過したこと、同画分をプロセスバリデーション用の病原体試料としての有用性が改めて確認できた。一方、排除サイズ 20 nm のプラノバ 20N 膜を通過しなかったことから、PK 抵抗性を有する PrP^{Sc} の最小サイズが 20 ～ 35 nm 程度の大きさであることが示唆された。Tateishi らは、ナノフィльтраーションによるプリオンの除去効果を、マウスによるバイオアッセイで調べ、プリオンの感染性は 35 nm を通過するが、15 nm を通過しなかったことを報告している (Tateishi, J., *et al.*, *Biologicals* 29: 17-25 (2001))。使用したプリオン株は異なるが、本研究の結果と一致する。バイオアッセイによるプリオン感染価の測定は正確な評価ができるが、時間と施設を要する。したがって、本研究で用いたような PrP^{Sc} の最小粒子サイズが明らかな病原体溶液を用いて、PrP^{Sc} 検出によりプロセスバリデーションを実施することは、簡易法として有用と思われる。

本研究で使用した 3 % Sarkosyl 抽出ミクロソーム画分を添加したクリアランス試験用病原体溶液は、今回使用した PrP^{Sc} 検出法では、約 250 倍希釈す

ると PrP^{Sc} が検出限界になることから、クリアランス指数としては、2.4 程度までを評価できる。プロセスバリデーションで必要とされる 3 以上のクリアランス指数には若干足りない。予備的な実験結果ではあるが、今回実施した PrP^{Sc} 検出方法にリタングステン酸沈殿工程を加えることで、PrP^{Sc} の濃縮効果により、検出感度が約 4 倍上昇したことから (結果は示さず)、PrP^{Sc} 検出法を改良することで、今回用いた病原体溶液を使用した場合も、3 以上のクリアランス指数は達成できると考えられる。

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. わが国の安全性確保のための方策等について

現在わが国には、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存在しないが、例えば、上で述べた EMEA ガイドライン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。

3-2. ろ過による PrP^{Sc} の除去効率

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。

3-3. 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

C-3-3 項で紹介し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 EMEA の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える。

3-4. 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するウシ血清の 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、C-3-4 項で紹介し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。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り、見かけ上の検出感度が上がっているおそれもあることに注意しなければならない。

3-5. その他、最近の動向

C-3-5 項で紹介したプリオン除去フィルターについては、PRDT 社以外の企業でも製品開発を精力的に進めているが、いずれの製品であっても、十分なプリオン除去／捕捉能と品質が保証されていれば、日本でも血液製剤製造等、医薬品製造現場に早期に導入する

よう検討すべきと考える。

一方、プリオン遺伝子をもたないトランスジェニックウシについては、現在でも医薬品等の PrP^{Sc} 安全性は十分な程度には確保されていることから、医薬品等の製造原材料として用いているウシをすべてこのトランスジェニック動物に切り替える必要はないと考えられる。さらに、利用にあたっては、特許料等、コスト面の問題も発生すると思われる。しかしながら、ウシを医薬品の動物工場として使用するケース（例えば、乳汁中に蛋白質性医薬品を分泌させるケース）や、ウシ組織（特に危険部位）をそのまま医療機器として用いるようなケースにおいては、一定の需要はあるように思われる。

いずれにしても、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、これら新技術の開発動向には十分注意しておく必要がある。

E. 結論

- ① T98G 細胞が発現するプリオン蛋白質 (PrP) の C 末端と GPI アンカリングナル配列を欠損したスプライス変異型 PrP mRNA からベクターを構築し、大腸菌で組換え蛋白質を発現させた。次にイムノブロット法を行い、スプライス変異型 PrP の C 末端部位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 HPSV178 が組換え蛋白質を認識することを確認した。HPSV178 を用いたイムノブロット法で、継代数を重ねた T98G 細胞がスプライス変異型 GPI アンカー欠損 PrP (GPI PrPSV) を発現し、その産生は低酸素濃度下で誘導されることを見いだした。GPI PrPSV は糖鎖をもたず、

非イオン性界面活性剤に易溶性で、細胞質画分に分布していた。

- ② 医薬品等のプリオン汚染を評価するためのプロセスバリデーションでは、使用するプリオンの性状、すなわちプリオンの構成要素である PrP^{Sc} の物理化学的性状によって除去効率が変わり、結果を過大評価するおそれがある。昨年度の研究で、プリオン感染動物から作製した脳乳剤を陰イオン界面活性剤 Sarkosyl (N-ラウロイルサルコシナトリウム) で処理することで、粒子サイズが小さく、100,000 × g の遠心でも沈殿しない PrP^{Sc} 凝集体が抽出できること、また、このような PrP^{Sc} 画分が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有用であることを報告した。本年度は、Sarkosyl により抽出したスパイク用試料を用いて、人免疫グロブリン製造工程中のナノフィルトレーション工程のプロセスバリデーションモデル実験を行った。263K 株感染ハムスター脳から調整したマイクロソーム画分、1.0 % Sarkosyl 処理マイクロソーム画分、および 3.0 % Sarkosyl 抽出マイクロソーム画分を 5 % 人免疫グロブリン溶液等に添加したものを PrP^{Sc} クリアランス試験用の病原体溶液として、プラノバ 35N および 20N 膜を用いたろ過実験を行った。その結果、3.0 % Sarkosyl 抽出マイクロソーム画分を PBS あるいは免疫グロブリン溶液の溶媒である 0.3 mol/L グリシン溶液に添加した病原体溶液を使用した場合、クリアランス指数 (RF) は 1 以上であったが、PrP^{Sc} はプラノバ 35N 膜を通過した。しかし、プラノバ 20N 膜のろ液中

には PrP^{Sc} 検出されなかった。一方、5 % 人免疫グロブリン溶液を含む病原体溶液を使用した場合は、PrP^{Sc} はプラノバ 35N 膜のろ液中には検出されなかった。以上の結果から、PrP^{Sc} 凝集体の中には、排除サイズ 35 nm の多孔性膜は通過し得るサイズのもので存在すること、その除去効率は溶液の性状により変化することが明らかとなった。

- ③ 欧州ではプリオン除去フィルターが昨年承認され、英国及びアイルランドの血液センターで実用化のための評価試験が実施中である。今年に入ってから、トランスジェニック技術によりプリオン遺伝子をもたないウシの作製に成功したとの報告もあり、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、これら新技術の開発動向には十分注意しておく必要がある。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

<平成 19 年>

- 1) Ishii-Watabe, A., Kobayashi, T., Suzuki, T., Yamaguchi, T., and Kawanishi, T. "Influences of the recombinant artificial cell adhesive proteins on the behavior of human umbilical vein endothelial cells in serum-free culture." *Biologicals (in press)*
- 2) 永田 龍二, 早川 堯夫. "非臨床における安全性評価概論." バイオ医薬品の品質・安全性評価<増補改訂版>, 早川 堯夫 監修, エル・ア

イ・シー(東京) (*in press*)

<平成 18 年>

- 3) Yamaguchi, S., Nishida, Y., Sasaki, K., Kambara, M., Kim, C-L., Ishiguro, N., Nagatsuka, T., Uzawa, H., and Horiuchi M. "Inhibition of PrP^{Sc} formation by synthetic O-sulfated glycopyranosides and their polymers." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 349: 485-491 (2006)
- 4) Watanabe, Y., Inanami, O., Horiuchi, M., Hiraoka, W., Shimoyama, Y., Inagaki, F., and Kuwabara, M. "Identification of pH-sensitive regions in the mouse prion by the cysteine-scanning spin-labeling ESR technique." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 350: 549-556 (2006)
- 5) Horiuchi, M., Furuoka, H., Kitamura, N., and Shinagawa, M. "Alymphoplasia mice are resistant to prion infection via oral route." *Jpn. J. Vet. Res.* 53: 150-159 (2006)
- 6) Nakamitsu, S., Miyazawa, T., Horiuchi, M., Onoe, S., Ohoba, Y., Kitagawa, H., and Ishiguro, N. "Sequence variation of bovine prion protein gene in Japanese cattle (Holstein and Japanese Black)." *J. Vet. Med. Sci.* 68: 27-33 (2006)
- 7) 山口 照英. "医薬品各条の改正点 - 生物薬品." *薬局* 57: 89-95 (2006)

<平成 17 年>

- 8) 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)

- 9) 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)
- 10) 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)
- 11) 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)
- 12) 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)
- 13) 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)
- 14) 堀内 基広. "BSE 診断法の開発と