

- 現状." *Virus Report* 2: 20-27 (2005)
- 15) 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)
 - 16) 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)
 - 17) 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)
 - 18) 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>
- 19) Kikuchi, Y., Kakeya, 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)
 - 20) 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)
 - 21) 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)
 - 22) 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 19 年>
- 1) Kikuchi, Y., Kakeya, T., Nakajima, O., Sakai, A., Yamazaki, T., Tanamoto, K., Matsuda, H., Sawada, J., and Takatori, K. "Effect of hypoxia on the expression of a splice variant of prion protein mRNA lacking the GPI anchor signal sequence in human glioblastoma cell line T98G." Keystone Symposia: Molecular Mechanisms of Neurodegeneration (16-21 Jan. 2007, New Mexico, USA)
- <平成 18 年>
- 2) Sakai, A., Ozeki, Y., Sasaki, Y., Aihara, M., Kikuchi, Y., and Takatori, K. "Utilization of DNA sequences for identifying *Fusarium* species isolated from rice." International Symposium on Mycotoxicology in Bangkok: New Strategies for Mycotoxin Research in Asia (13-14 Dec. 2006, Bangkok, Thailand)
 - 3) 内田 恵理子, 山口 照英. "バイオ医薬品／生物医薬品のウイルス安全性に関する国際動向." 第 6 回医薬品等ウイルス安全性シンポジウム (1 Dec. 2007, 東京)
 - 4) 中満 智史, 瓜生 匡秀, 堀内 基

- 広. "プリオン感受性・非感受性 Neuro2a サブクローンを用いたプリオン増殖関連宿主因子の探索." 第 54 回日本ウイルス学会 (21-23 Nov. 2006, 名古屋)
- 5) 瓜生 匡秀, 堀内 基広. "マウス神経芽腫細胞 Neuro2a (N2a) サブクローンで検出される異常型プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) の相違." 第 54 回日本ウイルス学会 (21-23 Nov. 2006, 名古屋)
- 6) Karino, A., Furuoka, H., Kimura, K., Shinagawa, M., and Horiuchi, M. "Generation of mAb that distinguishes PrP^{Sc} from PrP^C and neutralizes prion infectivity." NeuroPrion 2006 (4-6 Oct. 2006, Turin, Italy)
- 7) Yamaguchi, S., Nishida, Y., Sasaki, K., Kambara, M., Kim, C.-L., Nagatsuka, T., Uzawa, H., and Horiuchi, M. "Inhibition of PrP^{Sc} formation by synthetic O-sulfated glycopyranoside and their polymers. NeuroPrion 2006 (4-6 Oct. 2006, Turin, Italy)
- 8) Horiuchi, M. "Propagation and inhibition of PrP^{Sc} formation *in vitro* and *in vivo*." The 9th Joint Symposium between Hokkaido University Graduate School of Veterinary Medicine & Seoul University College of Veterinary Medicine (7 Sep. 2006, Sapporo, Japan)
- 9) 菊池 裕, 酒井 綾子, 高鳥 浩介, 大谷 早紀, 笠原 忠, 山口 照英, 鈴木 和博. "ヒトプリオンペプチドの好中球様 HL-60 細胞に対する走化性の評価に関する研究." 2006 年プリオン研究会 (2-3 Sep. 2006, 八幡平市)
- 10) 宋 昌鉉, 古岡 秀文, 金 チャンラン, 鈴木 章夫, 前田 秋彦, 堀内 基広. "抗 PrP 抗体の脳室内投与によるプリオン病治療効果の評価." 2006 年プリオン研究会 (2-3 Sep. 2006, 岩手)
- 11) Kikuchi, Y., Nakajima, O., Sakai, A., Yamazaki, T., Tanamoto, K., Matsuda, H., Sawada, J., and Takatori, K. "Expression of a splice variant of prion protein in human glioblastoma cell line T98G." 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (18-23 Jun. 2006, Kyoto, Japan)
- 12) 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ァージ 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>
- 13) 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)
- 14) 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)
- 15) 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, 高鳥 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)
- 16) 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)
- 17) 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>
- 18) 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)
- 19) 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)
- 20) 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)
- 21) 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)
- 22) 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)
- 23) Horiuchi, M. "BSE screening in Japan." The animal prion disease and USE (14-16 Oct. 2004, Ames, USA)
- 24) 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)
- 25) 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 ウシ等反芻動物由来原材料について、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、原材料として使用可能なウシ等反芻動物の原産国や部位等を規定した生物由来原料基準が平成 15 年に定められている。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や現在流通している各種血漿分画製剤等について、当該基準に適合しているかぎりにおいては一定の異常型プリオン（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。

しかしながら、PrP^{Sc} 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。

② 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、ろ過工程時の種々の条件と PrP^{Sc} の除去効率との関係を明らかにした。

③ 医薬品等の PrP^{Sc} 安全性を担保するためには、生物由来原料基準で規定される原産国や部位等に基づく安全性確保のみならず、製造工程での PrP^{Sc} の不活化／除去能の評価も重要である。血漿分画製剤製造での TSE クリアランス評価のための欧州医薬品審査庁（EMA）の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。

④ 血液中に微量存在する PrP^{Sc} を直接検出するための新たな試験方法が開発されつつあり、また、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。

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、平成 15 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、これまでも平成 16 年 3 月、同年 7 月及び平成 17 年 3 月に改正が実施される等、規制当局による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。

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. 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。

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、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. 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。

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 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。

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 $^{\circ}$ 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。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^{res} 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^{res} 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^{res} 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、

スクレイパ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。

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. 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。

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. 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 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られる。

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、C-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。

5. その他、最近の動向

C-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} 安全性は十分必要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 ウシ等反芻動物由来原材料について、BSE の国際的な発生動向や最新の科学的知見を踏まえ、原材料として使用可能なウシ等反芻動物の原産国や部位等を規定した生物由来原料基準が平成 15 年に定められている。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や現在流通している各種血漿分画製剤等について、当該基準に適合しているかぎりにおいては一定の 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。

しかしながら、PrP^{Sc} 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。

② 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 RF に関する報告内容を精査し、ろ過工程時の種々の条件と PrP^{Sc} の除去効率との関係を明らかにした。

③ 医薬品等の PrP^{Sc} 安全性を担保するためには、生物由来原料基準で規定される原産国や部位等に基づく安全性確保のみならず、製造工程での PrP^{Sc} の不活化／除去能の評価も重要である。血漿分画製剤製造での TSE クリアランス評価のための EMEA の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（表1）。

- ④ 血液中に微量存在する PrP^{Sc} を直接検出するための新たな試験方法が開発されつつあり、また、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) 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*)

2. 学会発表

本年度は該当なし。

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。

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。
-

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

分担研究者 堀内 基広 北海道大学大学院獣医科学研究科 プリオン病学講座 教授

研究要旨

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異常型プリオン蛋白質 (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} 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。

A. 研究目的

製造工程でのプリオン除去率を求めるプロセスバリデーションにより、医薬品やその原材料のプリオン汚染リスクを理論的に評価することが可能である。脳に蓄積したプリオンは大きな異常型プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) 凝集体を形成するため、

脳乳剤を直接スパイクした場合、PrP^{Sc} が工程中で容易に沈殿したり物理的に排除されることが予想される。一方、Silveira らの報告が示すように、PrP 分子 10 数個の大きさに相当する PrP^{Sc} オリゴマーが最も強力な感染性をもつことが明らかとなったことから (Silveira, J. R., et al.

Nature 437: 257-261 (2005))、より適切な評価を実施するためには、粒子サイズの小さい PrP^{Sc} オリゴマーをスパイク用病原体試料としたプロセスバリデーションを実施する必要がある。昨年、一昨年の本研究班における研究で、プリオン感染動物脳乳剤を Sarkosyl (N-ラウロイルサルコシンナトリウム) で抽出することで、100,000 × g の超遠心の上清中にプロテナーゼ K (PK) 抵抗性の PrP^{Sc} が回収できること、またこの画分を使用することで、粒子サイズの小さい PrP^{Sc} を含む病原体溶液によるプロセスバリデーションが実施可能となることを報告してきた。そこで、本年度は、このような病原体溶液を用いて、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のモデル実験を行った。

B. 研究方法

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。

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 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。

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。

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℃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。

(倫理面への配慮)

プリオン感染マウスは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に従って行った。感染性を含む試料の使用は北海道大学大学院獣医学研究科BSL2実験施設にて行った。

C. 研究結果

図1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1(a)、(e)及び(h))及び1% Sarkosyl 処理ミクロソーム画分(図1(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1(c))。検出されたバンドの発光強度を定量して、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1(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1(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1(d))。

D. 考察

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×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 膜を通過したことから、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、ナノフィルトレ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。

E. 結論

ミクロソーム画分から 3 % Sarkosyl により抽出された PrP^{Sc} 画分を用いて、人免疫グロブリン製剤製造工程における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のモデル実験を行った。

3 % 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、5 % 人免疫グロブリン溶液、および 0.3 mol/L グリシン溶液に添加し、これらを PrP^{Sc} クリアランス試験用の病原体溶液とした。プラノバ 35N 中空糸微多孔膜による PrP^{Sc} の除去効率は、PBS 及びグリシン溶液の場合は RF が 1.1 ~ 1.2 であったが、PrP^{Sc} は排除サイズ 35nm のプラノバ 35N 膜を通過することが判明した。しかし、排除サイズ 20 nm のプラノバ 20N 膜は通過しなかった。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を用いた場合、プラノバ 35N のろ液中には PrP^{Sc} は検出されなかった。

以上の結果から、PrP^{Sc} の最小粒子サイズが明らかな病原体試料を使用することにより、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が可能になることが示唆された。

F. 健康危険情報

実験室内感染、外部への病原体の拡散

などの事故は発生していない。

G. 研究発表

1. 論文発表

<平成 18 年>

- 1) 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)
- 2) 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)
- 3) 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)
- 4) 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)
- 5) 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)
- 6) 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)
- 7) 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)
- 8) 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)
- 9) 堀内 基広. "BSE 診断法の開発と現状." *Virus Report* 2: 20-27 (2005)
- 10) 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)
- 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) 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)

- 14) 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)
- 15) 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) 中満 智史, 瓜生 匡秀, 堀内 基広. "プリオン感受性・非感受性 Neuro2a サブクローンを用いたプリオン増殖関連宿主因子の探索." 第 54 回日本ウイルス学会 (21-23 Nov. 2006, 名古屋)
- 2) 瓜生 匡秀, 堀内 基広. "マウス神経芽腫細胞 Neuro2a (N2a) サブクローンで検出される異常型プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) の相違." 第 54 回日本ウイルス学会 (21-23 Nov. 2006, 名古屋)
- 3) Karino, A., Furuoka, H., Kimura, K., Shinagawa, M., and Horiuchi, M. "Generation of mAb that distinguishes PrP^{Sc} from PrP^C and neutralizes prion infectivity." *NeuroPrion* 2006 (4-6 Oct. 2006, Turin, Italy)
- 4) Yamaguchi, S., Nishida, Y., Sasaki, K., Kambara, M., Kim, C.-L., Nagatsuka, T., Uzawa, H., and Horiuchi, M. "Inhibition of PrP^{Sc} formation by synthetic O-sulfated glycopyranoside and their polymers. *NeuroPrion* 2006 (4-6 Oct. 2006, Turin, Italy)
- 5) Horiuchi, M. "Propagation and inhibition of PrP^{Sc} formation *in vitro* and *in vivo*." The 9th Joint Symposium between Hokkaido University Graduate School of Veterinary Medicine & Seoul University College of Veterinary Medicine (7 Sep. 2006, Sapporo, Japan)
- 6) 宋 昌鉉, 古岡 秀文, 金 チャンラン, 鈴木 章夫, 前田 秋彦, 堀内 基広. "抗 PrP 抗体の脳室内投与によるプリオン病治療効果の評価." 2006 年プリオン研究会 (2-3 Sep. 2006, 岩手)

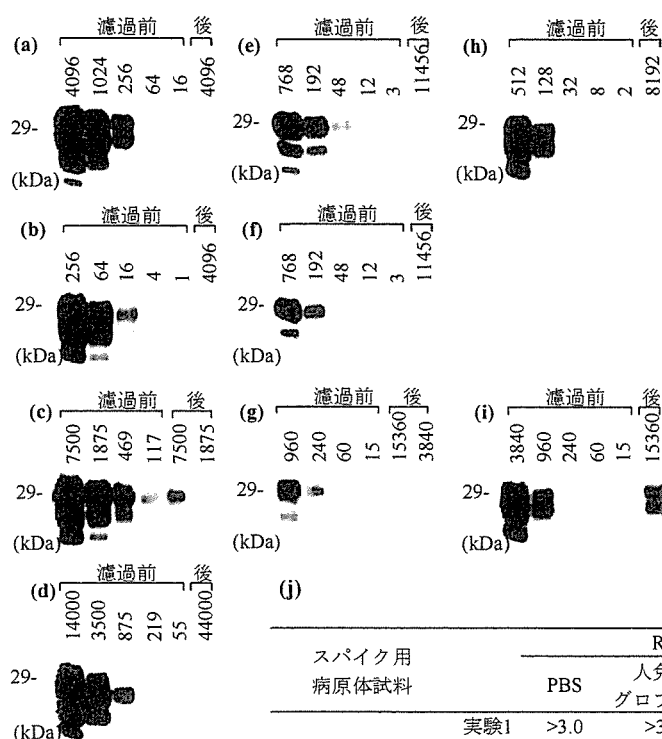
<平成 17 年>

- 7) 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)
- 8) 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)
- 9) 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)

<平成 16 年>

- 10) 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)
- 11) 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)
- 12) 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)
- 13) 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)
- 14) Horiuchi, M. "BSE screening in Japan." The animal prion disease and USE (14-16 Oct. 2004, Ames, USA)
- 15) 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。



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1. 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、プラノバ35N膜で濾過した。ろ過前液及びろ液から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し、検出限界を確認した。各レーン上の数字はアブライした脳組織当量 (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、プラノバ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、プラノバ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、プラノバ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、プラノバ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、プラノバ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、プラノバ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、プラノバ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、プラノバ35N膜で濾過した。以下、(a) と同様。

(j) ろ過前液及びろ液に含まれる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。

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

分担研究者 菊池 裕 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 主任研究官

研究要旨

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。

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

A. 研究目的

ヒトのプリオン病には硬膜移植等によって発症する感染性クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD)、プリオン蛋白質 (PrP) 遺伝子 (PRNP) にコードされた 253 残基のアミノ酸に変異がある遺伝型 CJD 及び PRNP に変異のない散発型 CJD が知られ、約 85 ~ 90 % を散発型 CJD が占めている。また、平成 8 年に英国で発症が確認された変異型 CJD は、従来の CJD とは異なり、患者の異常型プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) の生化学的研究及び英国で多発していたウシ海綿状脳症 (BSE) に関する疫学研究の結果から、ウシ PrP^{Sc} のヒトへの伝達によって発症すると考え

られている。

一方、細胞培養で産生される遺伝子組換え医薬品等には製造工程に血清等のウシ由来原料が用いられているものが多い。また、最近では、CJD 発症以前のドナーに由来する血液の輸血によって変異型 CJD が伝達されたと推測される症例が 3 件報告されている。血清等のウシ由来原料及び血液製剤の安全性を確保するため、原材料に混入するおそれがある PrP^{Sc} の検出法及び製造工程での除去技術の開発が望まれている。

PrP^{Sc} は正常プリオン蛋白質 (PrP^C) と同一のアミノ酸配列を有し、蛋白質分解酵素処理や熱に耐性を示すことから、原材料等への混入を高感度に検出する技術及び製造工程から有効に除去する技術はいまだに確立されていない。

本研究では、製造原材料の品質確保及び種々の製造工程の安全性評価を目的とし、PrP^{Sc} 検出法の開発に資する基礎研