

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16～平成18年度 総合研究報告書

主任研究者 山口 照英

平成19（2007）年4月

目 次

I. 総合研究報告

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 1

山口 照英（国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 部長）

<資料>

「血液製剤の製造工程における vCJD リスクについての検討に関する EMEA ガイド
ライン（仮訳）」 35

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 47

III. 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。

本研究によって、以下のような成果が得られた。

- ① 遺伝子組換え医薬品等の安全性を確保するため、その原材料に混入する恐れがある 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。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} の検出法の開発に資する基礎研究として、蛋白質分解酵素処理抵抗性プリオン蛋白質（PrP^{res}）を産生する継代を重ねた後の長期間培養したヒトグリオブラストーマ細胞株 T98G が発現するプリオン蛋白質（PrP）の解析を行った。

T98G 細胞は 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（PrPSV）の mRNA を発現していた。その ORF の塩基配列から推定される 1 次構造は PrP と共通の 1 ～ 217 残基に新たな 13 残基を付加した 230 残基のアミノ酸からなり、PrP と 94 % の相同性を有していた。

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、T98G 細胞が発現する PrPSV の 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 PrPSV の C 末端を認識するマウスモノクローナル抗体 HPSV178 を作製し、イムノブロット法で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。

次に、スプライス部位を横断したエクソン結合部位に特異的な配列を有するプライマー (exon-exon junction primer) を設計し、スプライス変異型 PrP^{Sc} の mRNA を検出する RT-PCR を確立した。本法を用い、ヒト脳を含む市販の各種臓器由来 total RNA にスプライス変異型 PrP の mRNA を検出した。

- 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。そこで本研究ではプリオン除去効果のプロセスバリデーションに適した PrP^{Sc} 画分の調製法を検討した。さらに、得られた PrP^{Sc} 画分の有用性を免疫グロブリン製造工程の膜ろ過工程のモデル実験で検証した。

プリオン感染動物の脳ミクロソーム画分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} 凝集体が容易に抽出できることが判明した。そこで、ミクロソーム画分から 3.0 % Sarkosyl により抽出された PrP^{Sc} 画分をスパイク用試料として、プロセスバリデーションにおける本画分の有用性を検証した。

まず、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た。3.0 % 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ろ過したところ、PrP^{Sc} はろ液中から検出され、クリアランス指数 (RF) は 0.6 ~ 0.8 であった。しかし、ミクロソーム画分あるいは 1.0 % Sarkosyl 処理ミクロソーム画分を添加した病原体溶液をろ過した場合は、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。以上の結果から、粒子サイズの小さい PrP^{Sc} 凝集体を用いることの重要性が明らかとなった。

次に、プラノバ 35N 及び 20N 中空糸微多孔膜を用いて、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モデル実験を行った。3.0 % 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 35N 膜でろ過した場合は、PrP^{Sc} はろ液中に検出され、RF は 1.1 ~ 1.2 程度であった。しかしプラノバ 20N 膜の濾液からは PrP^{Sc} は検出されなかった。したがって、3.0 % Sarkosyl 抽出ミクロソーム画分に存在する PrP^{Sc} 凝集体の最小のサイズは、排除サイズ 35 nm の多孔膜を通過するが 20 nm の多孔膜を通過しないものであることが示唆された。しかし、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、粒子サイズなどの性状が明らかな PrP^{Sc} 凝集体を使用することで、より正確なプロセスバリデーションの結果の評価が可能となることが明らかとなった。一方、除去効率は溶液の性状により変化することも明らかと

なった。これらの成果は、プリオンのプロセスバリデーションの結果を評価する上で貴重な情報となると考えられる。

- ③ 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。

- ④ 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。

- ⑤ 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。

- ⑥ 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。

分担研究者

内田 恵理子（平成 16 年度）

国立医薬品食品衛生研究所

遺伝子細胞医薬部 室長

永田 龍二（平成 17・18 年度）

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

永田 龍二（平成 16 年度）

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

中島 治（平成 18 年度）

国立医薬品食品衛生研究所

機能生化学部 主任研究官

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

A. 研究目的

細胞培養を用いて生産される遺伝子組換え技術応用医薬品等の製造では、ほとんどの場合、セルバンクの樹立や培養工程などに血清や添加剤等のウシ由来原材料が用いられている。一方で、世界的なウシ海綿状脳症（BSE）発症の広がりを受け、遺伝子組換え医薬品等の BSE 安全性確保のための予防的な対策が求められている。伝達性海綿状脳症（TSE）の中でも BSE に関する安全対策としては、BSE の発症の拡大を受け、原産国や採取部位に関する規制の様々な見直しを行ってきている。例えば、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

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

1. PrP^{Sc} の処理方法の能力評価に関する試験研究

ヒトのプリオン病には硬膜移植等によって発症した感染性 CJD、プリオン蛋白質遺伝子 (*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* に変異のない散发型 CJD が知られ、約 85 ～ 90% を散发性 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 PrP^{Sc} の生化学的研究及び英国で多発していた BSE に関する疫学研究から、ウシ PrP^{Sc} の人への伝達によって発症すると考えられている。

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、発症以前に行われた輸血によって変異型 CJD が伝達されたと思われる症例が 3 件報告されている。血液及び血液製剤の安全性を確保するため、原材料に混入する恐れがある 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が

ら、未だに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確立されていない。

上記①に係る研究として、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} の検出法の開発に資する基礎研究として、PrP^C を高発現しているヒトグリオブラストーマ細胞株 T98G を対象とし、Proteinase K (PK) 処理抵抗性プリオン蛋白質 (PrP^{res}) を産生する継代を重ねた後の長期間培養した条件下でその産生様式の解析を行った。

平成 16 年度は T98G 細胞がプリオン蛋白質 (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 の発現することを確認し、mRNA から推定されるスプライス変異型 PrP の C 末端部位を認識するモノクローナル抗体 HPSV178 を作製した。平成 17 年度は、スプライス変異型 PrP mRNA を検出する exon-exon junction primer を設計し、リアルタイム定量 PCR を構築した。平成 18 年度は標準品の確保を目的とし、スプライス変異型 PrP の組換え蛋白質を調製した。次に、イムノブロット法で HPSV178 抗体の反応性を確認し、T98G 細胞が産生するスプライス変異型 PrP を同定した。(担当：菊池)

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

医薬品やその原料に混入しているかもしれない微量のプリオンが検出可能ならば、プリオンの汚染を直接評価できることになるが、現在までにそのような方法は確立されていない。しかし、

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。但し、プロセスバリデーションでは、スパイクするプリオンの性状により結果が異なることが予想される。脳に蓄積したプリオンは大きな 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、工程中で容易に沈殿したり、物理的に排除されてしまう可能性が高いと考えられる。しかし、血液中に存在するプリオンは、脳由来のような大きな PrP^{Sc} 凝集体ではなく、小さな PrP^{Sc} オリゴマーを形成していると考えられる。実際に、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報告されている (Silveira, J. R., *et al. Nature* 437: 257-261 (2005))。したがって、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。

プリオン 1 感染価を形成する最小の PrP^{Sc} オリゴマーのサイズはいまだ明らかになっていないが、超遠心後の上清にもプリオン感染性が残存することから、最小単位は決して大きくなく、医薬品などのプロセスバリデーションには、このような粒子サイズの小さい PrP^{Sc} オリゴマーを使用する必要がある。

そこで上記②に係る研究として、まず PrP^{Sc} が多く含まれている脳から、高速遠心及び超遠心で沈殿しない、粒子サイズの小さい PrP^{Sc} 画分を調製する方法について検討した。次に、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、粒子サイズの小さい PrP^{Sc} 画分のプロセスバリデーションにおける有用性について検討した。(担当：堀内)

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

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 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。

上記③に係る研究として、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った。(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. RT-PCR

T98G 細胞を培養後、DNase 消化した total RNA を調製し、スーパースク립ト II RNase H⁻ 逆転写酵素 (インビトロジェン) を用いてファーストストランド cDNA を合成した。脳を含む各種ヒト臓器由来 total RNA は日本ベクトン・ディッキンソン株式会社から購入し、同様にファーストストランド cDNA を合成した。PCR は *PRNP* (GenBank accession no. AL133396) の exon 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 を検出する各種プライマーと、KOD plus polymerase (東洋紡績) 又は Ex taq polymerase (タカラバイオ) を用いて行った。

1-3. リアルタイム定量 PCR

T98G 細胞を培養後、DNase I 消化した total RNA を調製し、スーパースク립ト III RNase H⁻ 逆転写酵素 (インビトロジェン) を用いてファーストストランド cDNA を合成した。リアルタイム定量 PCR は PrP mRNA、スプライス変異型 PrP mRNA を検出するプライマー (図 1) 及びハウスキーピング遺伝子として 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 プローブによる相対定量法を行った。PCR は FastStart TaqMan Probe Master (ロッシュ・ダイアグノスティックス) によるマルチプレックス法で行い、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) で測定した。

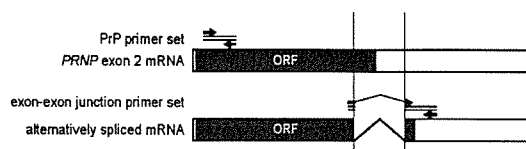


図 1. Schematic representation of quantitative RT-PCR primer sets

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

1-4. 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。スプライス変異型 PrP 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ムブリー 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* BL21 (DE3) pLysS で発現させた。

1-5. 抗プリオン蛋白質モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの樹立 スプライス変異型 PrP の予想される

アミノ酸配列 214 ~ 230 残基に相当するペプチドに MBS を架橋剤として BSA に結合させた免疫原 hPrPSV (214-230)-BSA を調製し、BALB/c マウスを免疫後に脾細胞とマウス・ミエローマ細胞 NS-1 と細胞融合を行い、培養上清を固相抗原として hPrPSV (214-230)-OVA を用いた ELISA でスクリーニングした。

1-6. イムノブロット法

試料を SDS-PAGE で分離後に PVDF 膜へ転写し、第 1 抗体として各種の抗 PrP 抗体又は抗スプライス変異型 PrP マウスモノクローナル抗体 HPSV178 を、第 2 抗体に 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。

1-7. 細胞分画法

ソニケーターで T98G 細胞を破碎後、遠心分離 ($500 \times g$, 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 ($100,000 \times g$, 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。

1-8. 蛋白質分解酵素消化

T98G 細胞の細胞懸濁液を PK で消化し ($10 \mu\text{g/mL}$, 37°C , 30 分間)、イムノブロット法を行い、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。

2-2. ミクロソーム画分の調製

スクレイピー感染脳を秤量した後、ハサミで細切した。約 10 倍量 (w/w) のショ糖緩衝液 [0.32 mol/L ショ糖、 5 mmol/L トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン (Tris) -塩酸緩衝液 (pH 7.5)、 1 mmol/L エチレンジアミン 4 酢酸 2 ナトリウム (EDTA)、 $1 \mu\text{g/mL}$ ロイペプチン、 $1 \mu\text{g/mL}$ アプロチニン、 $1 \mu\text{g/mL}$ ペプスタチン、 $2 \mu\text{mol/L}$ トランス-エポキシサクシニル-L-ロイシルアミド-(4-グアニジノ)ブタン (E-64)、 $2 \mu\text{mol/L}$ ベスタチン] を加え、ホモジナイザーでホモジナイズした。得られた乳剤を遠心管に移し、 4°C で $6,000 \times g$ の遠心を 12 分間行い、上清は別の遠心管に回収した。沈殿に少量のショ糖緩衝液を加え、ホモジナイザーで再度ホモジナイズ後、 4°C で $6,000 \times g$ の遠心を 12 分間行った。この上清を先に行った遠心上清と合わせてから、 4°C で $100,000 \times g$ の遠心を 1 時間行った。得られた沈殿にショ糖緩衝液を加えて懸濁した後、塊がなくなるまで超音波処理を行った。得られたミクロソーム画分は分注して、 -20°C で保存した。

2-3. DLPC 処理

スクレイピー帯広株感染マウスからの PrP^{Sc} の精製は Caughey らの方法 (1991) に従って行った。精製 PrP^{Sc} の detergent-lipid-protein complex (DLPC) 処理は以下のように実施した。すなわち、2 % Sarkosyl、0.4 % フォスファチジルコリン、 150 mmol/L 塩化ナトリウム、 50 mmol/L Tris 緩衝液 (pH 7.5) に精製 PrP^{Sc} を懸濁し、Branson 社の Contamination-Free Ultrasonic Pre-processing System で 2 秒

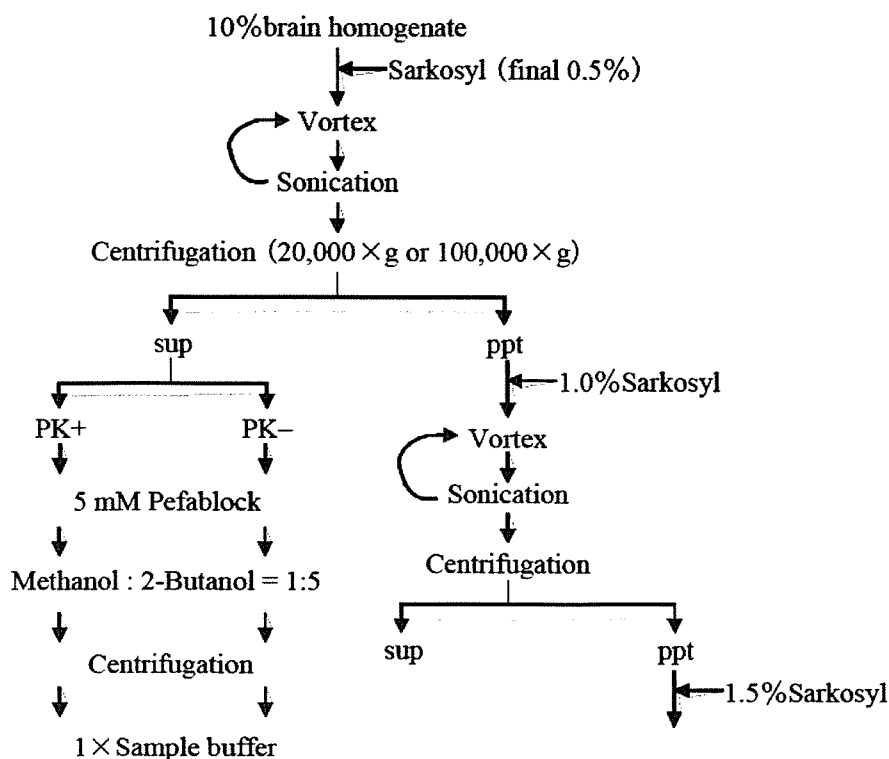


図2 スクレイピー感染マウス脳乳剤からの PrP^{Sc} の抽出

10 %脳乳剤に Sarkosyl を最終濃度 0.5 %になるように加え、ボルテックス、超音波処理を 3 サイクル行った後に、20,000 × g あるいは 100,000 × g で遠心した。上清は 2 等分し、一方は PK 処理、他方は PK 未処理対照として、SDS-PAGE 用のサンプルを作製した。沈殿に 1.0 % Sarkosyl in PBS を加え、ボルテックス、超音波処理を 3 サイクル行った後に、20,000 × g あるいは 100,000 × g で遠心した。以下、同様の処理を 4.0 % Sarkosyl まで実施した。

の超音波処理を 5 サイクル行った。

2-4. Sarkosyl 抽出

図 2 にスクレイピー感染マウス脳乳剤からの Sarkosyl 抽出のフローチャートを示した。10 %脳乳剤に Sarkosyl を最終濃度 0.5 %になるように加え、超音波処理後、20,000 × g で 10 分又は 100,000 × g で 15 分遠心した。上清を回収して 2 等分し、一方を proteinase K (PK) (20 µg/mL) 処理した。PK 処理後、ブタノール-メタノール混合物により PrP^{Sc} を回収した。遠心で得られた沈殿に 1.0 % Sarkosyl を加え、超音波処理後、同様に遠心を行い、上清は PK 処理、沈殿は次の

Sarkosyl 抽出を行った。Sarkosyl 抽出は 4 %まで 0.5 %ずつ Sarkosyl の濃度を上げて実施した。

2-5. スパイク試験

① 263K 株感染脳から得たマイクロソーム画分、②マイクロソーム画分に 1.0 % Sarkosyl を加えた 1.0 % Sarkosyl 処理マイクロソーム画分、又は③マイクロソーム画分を 3.0 % Sarkosyl で抽出して得た 3.0 % Sarkosyl 抽出マイクロソーム画分をスパイク用病原体試料として、PBS、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、血液製剤製造の最

終工程で使用される、①孔径 0.22 μm のろ過膜を用いる工程のモデル系、及び②ナノフィルトレーション工程のモデル系、に添加し、プロセスバリデーションのモデル実験を行った。孔径 0.22 μm のろ過膜としてポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜 (製品名 Millex-GV、ミリポア社) を用い、加圧ろ過を行った。また、ナノフィルトレーションには中空糸微多孔膜 (製品名 プラノバ 35N 及び 20N 膜、旭化成) を用いた。プラノバ膜によるろ過は 78 kPa の一定圧力で実施した。

2-6. PrP^{Sc} 検出用試料の調製及び PrP^{Sc} の検出

試料を 10 $\mu\text{g/mL}$ PK で 37 $^{\circ}\text{C}$ 、30 分間処理後、PK 阻害剤である 4-(2-アミノエチル)ベンゼンスルホニルフルオリド塩酸塩 (Pefabloc) を最終濃度 5 mmol/L になるように加え、PK による消化を停止した。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 $^{\circ}\text{C}$ で 20,000 $\times g$ の遠心を 10 分間行い、蛋白質を沈殿させた。沈殿に 1 $\times$ 試料用緩衝液 [62.5 mmol/L Tris-塩酸緩衝液 (pH 6.8)、5 % グリセロール、3 mmol/L EDTA、5 % ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、4 mol/L 尿素、4 % 2-メルカプトエタノール、0.04 % 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 $\times$ 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. スプライス変異型プリオン蛋白質 mRNA の発現

PRNP がコードする mRNA の発現様式を調べるため、低酸素濃度条件下で培養した T98G 細胞から調製した total RNA を鋳型とし、KOD plus polymerase を用いて RT-PCR を行った。2 回又は 18 回の継代後に通常酸素濃度下 (normoxia) で 24 日間培養した T98G 細胞 (P2D24 又は P18D24) から調製した total RNA では、PRNP exon 2 の 434 ~ 961 に相当する 528 bp のバンドを検出した (図 3、レーン 3・9)。一方、18 回の継代後に通常酸素濃度下で 23 日間培養後、低酸素濃度下 (5 % O₂; hypoxia) で 1 日間培養した T98G 細胞 (P18D24) から調製した total RNA では、先のものより短い 296 bp のバンドを示した (図 3、レーン 7)。296 bp のバンドをゲルから切り出してその

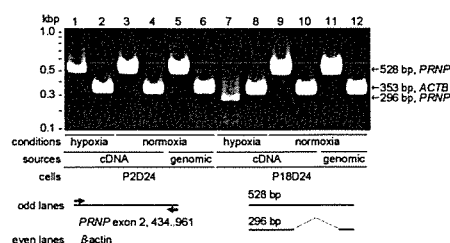


図 3. Exposure of T98G cells to hypoxia produces splice variant of PrP mRNA

T98G cells for 24 days after 2 passages (P2D24, lanes 1-6) and 18 passages (P18D24, lanes 7-12) were exposed to hypoxia (5% O₂, lanes 1-2 and 7-8) or normoxia (lanes 3-6 and 9-12) for the last 1 day. First strand-cDNA from total RNA (5 µg) and genomic DNA (2.5 ng) were prepared, followed by PCR using human PrP primer set (odd lanes) and β-actin primer set (even lanes) with KOD Plus polymerase. PCR products were separated on a 2 % agarose gel and visualized with ethidium bromide.

塩基配列を解析したところ、PrP の C 末端と GPI アンカーシグナル配列を含む 232 塩基対が 528 bp の内部から欠落していた (図 3 下段)。しかし、2 回の継代後に同様に低酸素濃度下 (5 % O₂; hypoxia) で培養した T98G 細胞 (P2D24) では、296 bp のバンドは認められなかった (図 3、レーン 1)。同時に調製した T98G 細胞 (P18D24) の genomic DNA を鋳型とした PCR では 528 bp のバンドを示し、296 bp と同じ塩基配列は存在しなかった (図 3、レーン 12)。以上の結果から、継代数を重ねた後に長期間培養した T98G 細胞では、PRNP exon 2 のスプライス変異型 RNA を発現することが示唆された。

1-2. エクソン結合部位に特異的なプライマー (exon-exon junction primer) を用いたスプライス変異型

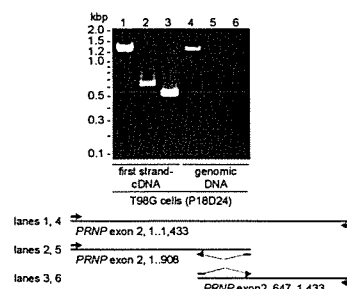


図 4. Detection of splice variant of PrP mRNA using exon-exon junction primers

T98G cells were incubated for 24 days after 18 passages (P18D24). First strand-cDNA from total RNA (5 µg) and genomic DNA (2.5 ng) were prepared, followed by PCR using PRNP exon 2 primer set (1..22 and 1,433..1,411; lanes 1 and 4) and 24-nucleotide exon-exon junction primers (lanes 2-3, and 5-6) with Ex taq polymerase.

プリオン蛋白質 mRNA の検出

スプライス変異型 PrP の mRNA を検出することを目的とし、エクソン結合部位に特異的に結合するプライマー (exon-exon junction primer) を設計した。

PrP の ORF を含む PRNP exon2 の 1 ~ 1,433 に結合するプライマーを用いた PCR では、T98G 細胞 (P18D24) から調製したファーストストランド DNA 及び genomic DNA 中に 1,433 bp のバンドを示し (図 4、レーン 1・4)、ゲルから切り出した 1,433 bp のバンドの塩基配列は、PRNP exon 2 と一致した。一方、スプライシングで欠落する部位 (232 bp) を挟み、その両端の配列を結合させたプライマーを用いた PCR は、ファーストストランド DNA に 676 及び 555 bp のバンドを示したが (図 4、レーン 2・3)、genomic DNA ではバンドが検出されなかった (図 4、レーン 5・6)。また、切り出した 676 及び 555 bp のバンドの塩基配列は、

PRNP exon 2 のそれぞれ 908 及び 787 bp に相当する部位から 232 bp の配列が欠落したものと一致した。以上の結果から、設計した exon-exon junction primer はエクソン結合部位と結合し、スプライス変異型 PrP の mRNA を特異的に検出可能なことが示された。

1-3. 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 細胞が発現するスプライス変異型 PrP 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 末端を認識するニワトリモノクローナル抗体 HUC2-13 (図 5 (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 5 (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、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 5 (C)・(D))。以上の結果から、HPSV178 はスプライス変異型 PrPSV を特異的に認識することが確認された。

1-4. 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

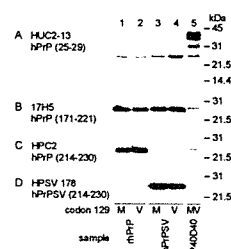


図 5. Immunoblot analysis of recombinant human PrP and splice variant isoform of PrP

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.

た細胞懸濁液を用い、PrPSV 産生の変化をイムノブロット法で調べた。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 5 (D) レーン 5; 図 6 (A) レーン 1)、52 週間以降では PrPSV の産生が確認された (図 6 (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 6 (B) レーン 1、上段)。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 6 (B) レーン 2、上段)。一方、HPSV178 が認識する PrPSV には糖鎖がなく、PNGase F

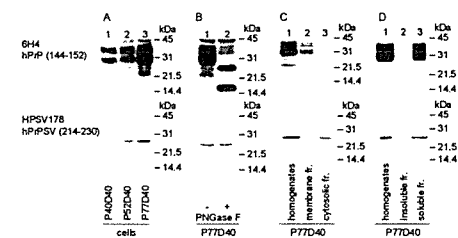


図 6. Characterization of splice variant form of GPI anchorless PrP in T98G cells

- (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 $100,000 \times g$ 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 $100,000 \times g$ 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.

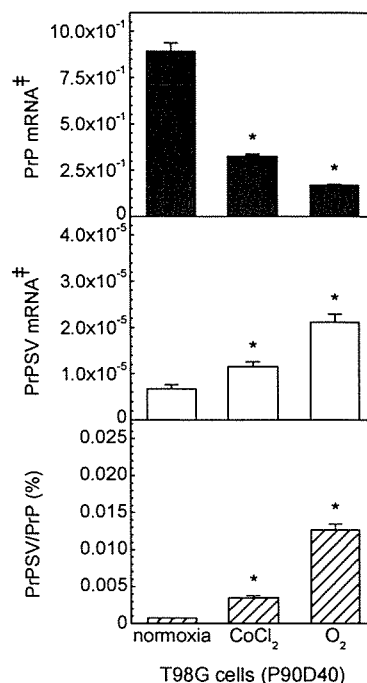


図 7. Quantification of splice variant of PrP mRNA in T98G cells

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 $\pm$ 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).

処理で 25 kDa のバンドに変化はなかった (図 6 (B) レーン 1・2、下段)。

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 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 6 (C)、上段)、HPSV178 が認識する PrPSV は細胞質画分に局在していた (図 6 (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 ($100,000 \times g$, 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 6 (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 6 (D) レーン 3)、不溶性画分では検出されなかった (図 6 (D) レーン 2)。

1-5. 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 7, normoxia)、最後の 4 日間を低酸素濃度下 (hypoxia; 2 % O_2) で培養すると PrP mRNA の発現量は減少し、PrPSV mRNA は増加した (図 7, 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 ($100 \mu\text{M}$ CoCl_2) で T98G 細胞を 4 日間培養すると、PrP mRNA の発現量は減少し、PrPSV mRNA は増加した (図 7, CoCl_2)。

次に、T98G 細胞 (P90D40) の細胞懸濁液を用いたイムノブロット法で、PrPSV 産生の変化を調べた。低酸素濃度下 (2 % O_2) 又はコバルト存在下 ($100 \mu\text{M}$ CoCl_2) で 4 日間培養すると、HPSV178 が認識する PrPSV の産生量が増加した (図 8 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 8 上段)、PrPSV は PK 処理感受性だった (図 8 下段)。

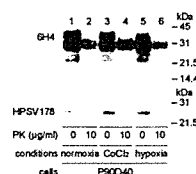


図 8. Proteinase K sensitivity of splice variant form of GPI anchorless PrP in T98G cells

T98G cells for 40 days after 90 passages (P90D40) were exposed to hypoxia (2 % O_2 , lanes 5 and 6), CoCl_2 ($100 \mu\text{M}$; lanes 3 and 4), and normoxia (lanes 1 and 2) for the last 4 days. Methanol-precipitated homogenates ($50 \mu\text{g}$ protein) were treated with PK ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) at 37°C for 30 min (lanes 2, 4, and 6) or left undigested (lanes 1, 3, and 5). The resultants homogenates were boiled for 10 min and subjected to immunoblot with the 6H4 (upper panel) or HPSV178 (lower panel) antibodies.

1-6. ヒト各種臓器由来 total RNA 中のスプライス変異型 PrP mRNA の確認

市販のヒト組織パネル由来 total RNA から調製したファーストストランド DNA を鋳型とし、exon-exon junction primer を用いた RT-PCR を行った。成人及び胎児の脳から調製したファーストストランド DNA に 1,433 bp のバンド (図 9 (A) レーン 1・4) と 232 bp が欠落した 676 及び 555 bp のバンド (図 9 (A) レーン 2・3・5・6) が検出された。同様に、成人各種臓器から調製したファーストストランド DNA に 1,433 bp のバンド (図 9 (B) パネル A) と 555 bp のバンド (図 9 (B) パネル B) が検出され、T98G 細胞と同様にスプライス変異型 PrP mRNA の存在が示唆された。

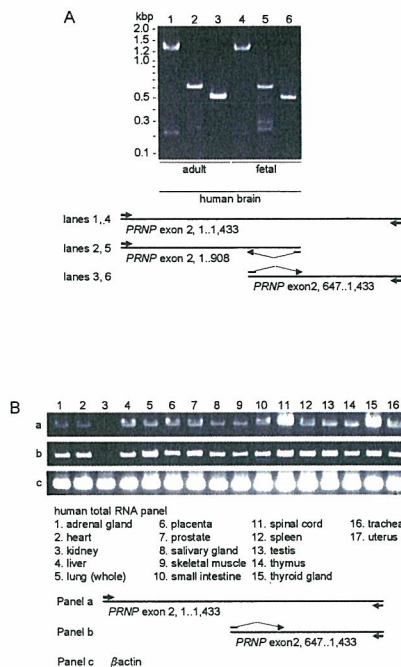


図 9. Detection of splice variant of PrP mRNA using exon-exon junction primers

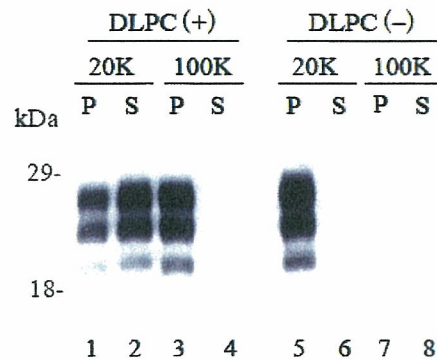
(A) First strand-cDNA from adult human brain total RNA and human fetal brain total RNA (5 µg each; BD Biosciences, Palo Alto, CA, USA) were prepared, followed by PCR using the *PRNP* exon 2 primer set (lanes 1 and 4) and the exon-exon junction primers (lanes 2-3 and 5-6) with Ex taq polymerase.

(B) First strand-cDNA from adult human total RNA panel (5 µg each; BD Biosciences, Palo Alto, CA, USA) were prepared, followed by PCR using the *PRNP* exon 2 primer set (Panel a), the exon-exon junction primers (Panel b), and β -actin (Panel c) with Ex taq polymerase.

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. 脳乳剤からの PrP^{Sc} 画分抽出条件の検討

精製 PrP^{Sc} の遠心による沈降を図 10 に示した。DLPC 未処理では 20,000

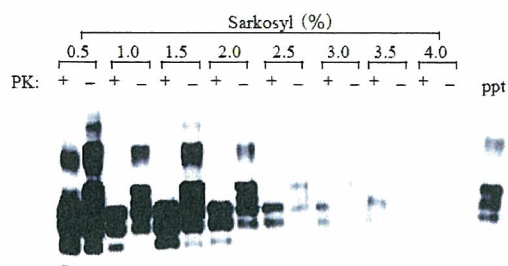


× g の遠心によりほぼすべての PrP^{Sc} 図 10. 精製 PrP^{Sc} の DLPC 処理による粒子サイズの変化

精製 PrP^{Sc} を DLPC 処理せずに遠心した場合 [DLPC(-)]は、20,000 × g (20K) の遠心上清には検出されなかった (レーン 5 ~ 8)。DLPC 処理後 [DLPC(+)]は、20,000 × g (20K) の遠心上清に約 55 % の PrP^{Sc} が残存したが (レーン 1・2)、100,000 × g の遠心では沈殿した (レーン 3・4)。

が沈殿するが、DLPC 処理 (2 % Sarkosyl) により約 50 % の PrP^{Sc} が 20,000 × g の遠心上清に残存した。しかし、100,000 × g の遠心ではほとんどの PrP^{Sc} が沈殿した。

スクレイピー感染マウス脳乳剤から Sarkosyl で抽出した画分の 20,000 × g 遠心上清に含まれる総 PrP (PK 未処理) と PrP^{Sc} (PK 処理) を検出した結果を図 11 に示した。また、同様の実験を 3 回実施し、PrP 量を定量した結果を表 1 に示した。0.5 % Sarkosyl 抽出画分の 20,000 × g 遠心上清に、全体の約 70 % の PrP が存在し、0.5 及び 1.0 % Sarkosyl 抽出画分の両方を合わせると、全体の 90 % 以上が 20,000 × g の遠心上清に存在した。遠心上清の PrP は PK 処理後も検出されることから、大部分は PrP^{Sc} である。PrP^{Sc} 量で比較しても全体の約 90 % が 0.5 及び 1.0 % Sarkosyl 抽出画分の 20,000 × g



遠心上清に存在した。

図 11. Sarkosyl 抽出画分中の $20,000 \times g$ 遠心上清に含まれる PrP^{Sc} の PK 抵抗性

各々の濃度の Sarkosyl 抽出画分の $20,000 \times g$ 遠心上清中に存在する総 PrP (PK-) と PrP^{Sc} (PK+) を示した。総 PrP (あるいは PrP^{Sc}) に対する各抽出画分中の PrP (あるいは PrP^{Sc}) 相対量の平均値と SD ($n=3$) は表 1 に示した。1.5 ~ 3.0 % の組織当量を 1 とすると、0.5 及び 1.0 % は 1/5 組織当量、3.5 及び 4.0 % は 2 組織当量の試料を電気泳動した。

表1. $20,000 \times g$ の遠心による Sarkosyl 抽出 PrP^{Sc} の沈殿

Sarkosyl (%)	PK(+)PrP/total PK(+)PrP	PK(-)PrP/total PK(-)PrP
0.5	0.62 ± 0.05	0.74 ± 0.11
1.0	0.26 ± 0.04	0.20 ± 0.08
1.5	0.08 ± 0.05	0.04 ± 0.01
2.0	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01
2.5	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00
3.0	0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.00
3.5	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
4.0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

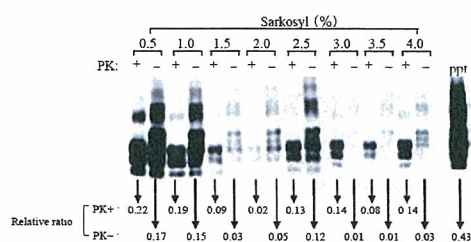


図 12. Sarkosyl 抽出画分中の $100,000 \times g$ 遠心上清に含まれる PrP^{Sc} の PK 抵抗性

各々の濃度の Sarkosyl 抽出画分の $100,000 \times g$ 遠心上清中に存在する総 PrP (PK-) と PrP^{Sc} (PK+) を示した。総 PrP (あるいは PrP^{Sc}) に対する各抽出画分中の PrP (あるいは PrP^{Sc}) 相対量を図下に示した。

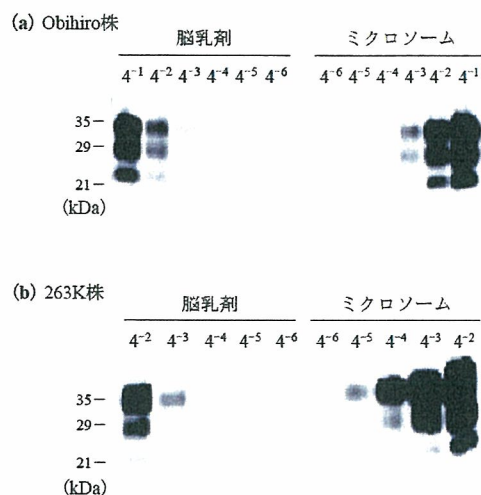


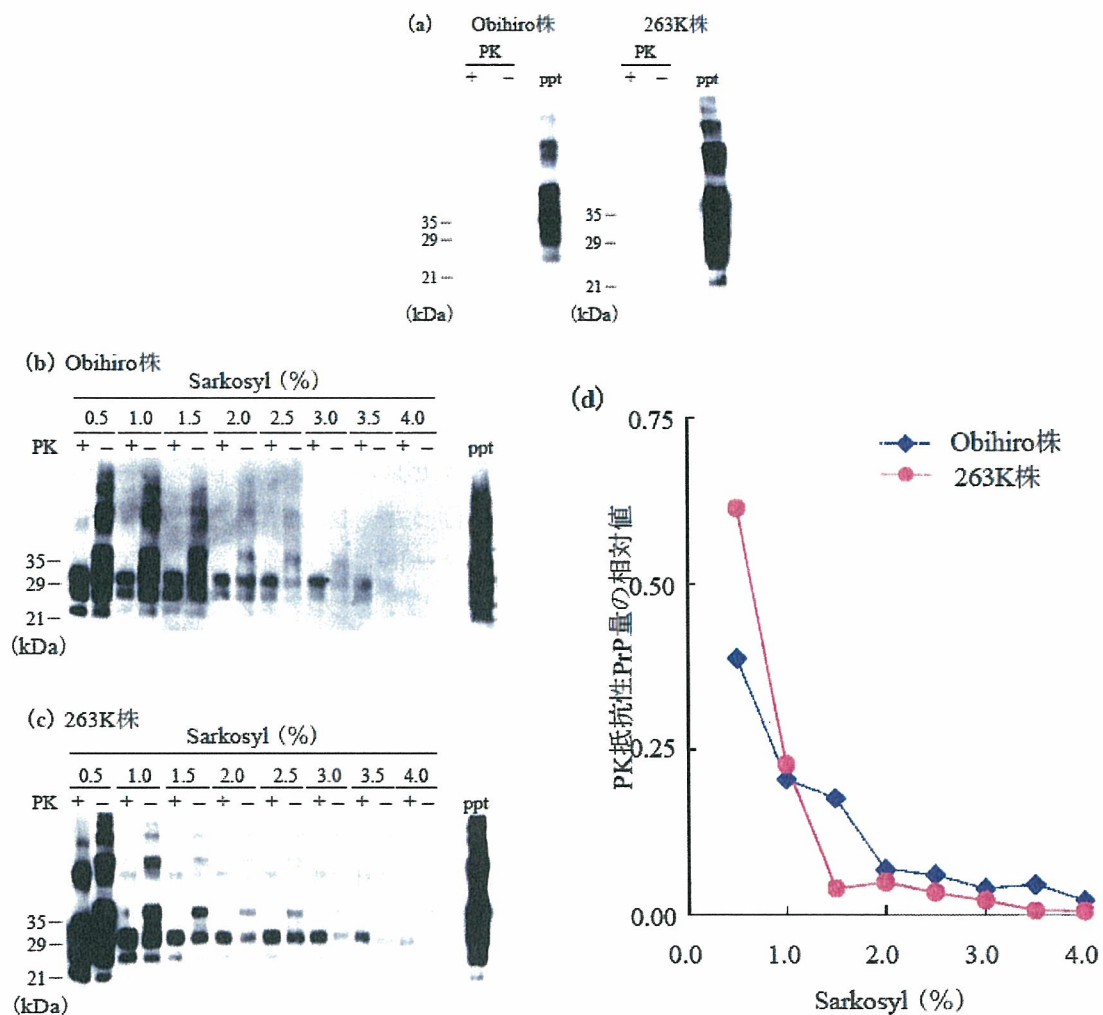
図 13. ミクロソーム画分調製による PrP^{Sc} の濃縮

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

遠心条件を $100,000 \times g$ に変更した結果を図 12 に示した。超遠心を用いた場合は、4 % Sarkosyl 抽出画分でも沈殿する PrP が全体の 50 % を占めた。一方、0.5 及び 1.0 % 抽出画分の遠心上清には各々全体の 20 ~ 10 % 程度の PrP が残存した。上清中の PrP は PK 抵抗性であることから PrP^{Sc} が含まれていることが確認できた。 PrP^{Sc} 量で比較しても、0.5 及び 1.0 % 抽出画分の遠心上清には各々全体の 15 % 程度の PrP^{Sc} が存在することが判明した。

2-2. ミクロソーム画分からの PrP^{Sc} 画分抽出条件の検討

脳乳剤からの Sarkosyl 抽出により、全体の 20 ~ 30 % の PrP^{Sc} を超遠心上



清中に回収できた。そこで、ミクロソ

図 13. Obihiro 株感染マウス及び 263K 株感染ハムスター脳由来ミクロソーム画分からの Sarkosyl による PrP 抽出

- (a) Obihiro 株感染マウス及び 263K 株感染ハムスターの脳から調製した脳乳剤を $100,000 \times g$ で 10 分間遠心することにより得られた上清 (PK 処理(+), 非処理(-)) 及び沈殿 (ppt) 中の PrP を、WB により検出した。
- (b)・(c) Obihiro 株感染マウス (b) 及び 263K 株感染ハムスター脳 (c) から調製した各ミクロソーム画分 10 μ L (脳組織 30 mg 相当) に Sarkosyl を最終濃度 0.5 % となるよう加え、液量が 100 μ L となるよう PBS を添加し、攪拌及び超音波処理を行った後、 $100,000 \times g$ の遠心を 10 分間行い、その遠心上清を 0.5 % Sarkosyl 処理ミクロソーム画分とした。これを 40 μ L ずつ 2 本にサンプリングし、一方は PK 処理を実施し (PK 処理(+))、もう一方は PK 処理を行わなかった (PK 処理(-))。
- 0.5 % Sarkosyl 処理ミクロソーム画分を除いて得られた遠心沈殿に、1.0 % Sarkosyl を含む PBS を 100 μ L 加え、上と同様に攪拌、超音波処理及び遠心操作を行って、その遠心上清を 1.0 % Sarkosyl 連続処理ミクロソーム画分とした。その後、Sarkosyl 濃度を 0.5 % ずつ段階的に上げながら 4.0 % になるまで、各沈殿からの連続抽出を実施し、1.5 ~ 4.0 % Sarkosyl 連続処理/抽出ミクロソーム画分をそれぞれ得た。
- なお、4.0 % Sarkosyl 連続抽出ミクロソーム画分を除いて得られた遠心沈殿 (ppt) から調製した検出用試料のアブライ量 (脳組織当量) は、他の試料の 1/2 量相当。
- (d) (b)・(c) 記載の方法により各 Sarkosyl 濃度で連続抽出された PK 抵抗性 PrP (PrP^{res} , PK(+)) の総和に対する各画分中の PrP^{res} 量の割合。2 回繰り返し実施した平均値。

ーム画分を調製することによる PrP^{Sc} の濃縮及び部分精製の効果について検討した。その結果、Obihiro 株で 2.6 倍、263K 株で 9.8 倍に濃縮されることが判明した (図 12)。さらに、濃縮効率の高かった 263K 株感染脳ミクロソーム画分から Sarkosyl 抽出を行ったところ、約 30 % の PrP^{Sc} が 100,000 × g の遠心上清から回収できることが判明した (図 13)。

2-3. 膜ろ過工程のプロセスバリデーションのモデル試験

ミクロソーム画分を直接 3.0 % Sarkosyl で抽出した後に 100,000 × g の遠心を行って得た遠心上清 (3.0 % Sarkosyl 抽出ミクロソーム画分) のプロセスバリデーションにおける有用性を、人グロブリン製剤製造工程における孔径 0.22 μm ろ過膜によるろ過工程をモデルとして検証した。ミクロソーム画分、1 % Sarkosyl 処理ミクロソーム画分 (ミクロソーム画分を直接 1.0 % Sarkosyl で処理して得た遠心上清)、及び 3 % Sarkosyl 抽出ミクロソーム画分をそれぞれスパイク用 PrP^{Sc} 試料としてろ過試験を行い、ろ過前液及びろ液中に存在する PrP^{Sc} の定量結果から、膜ろ過工程における RF を算出した。これら 3 種のスパイク用病原体試料を PBS に添加して病原体溶液とした場合には、RF が 0.6 ~ 0.7 となり、PrP^{Sc} はろ液中に検出された。しかし、スパイク用試料を添加する試料溶液として 5 % 人免疫グロブリン溶液を使用した場合、ミクロソーム画分及び 1 % Sarkosyl 処理ミクロソーム画分をそれぞれ添加したときの RF は 2.4 に増大したが、3 % Sarkosyl 抽出ミクロソーム画分を添加したときの RF は 0.6 ~

0.8 であった (図 14)。

2-4. 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試験

上述したように、3 % Sarkosyl 抽出ミクロソーム画分は、孔径 0.22 μm ろ過膜を用いたろ過工程のプロセスバリデーション有用であったことから、次に、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。図 15 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、ミクロソーム画分および 1 % Sarkosyl 処理ミクロソーム画分は、いずれの溶媒にスパイクした場合でもろ液からは 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。検出されたバンドの発光強度を定量して、その RF は 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。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。