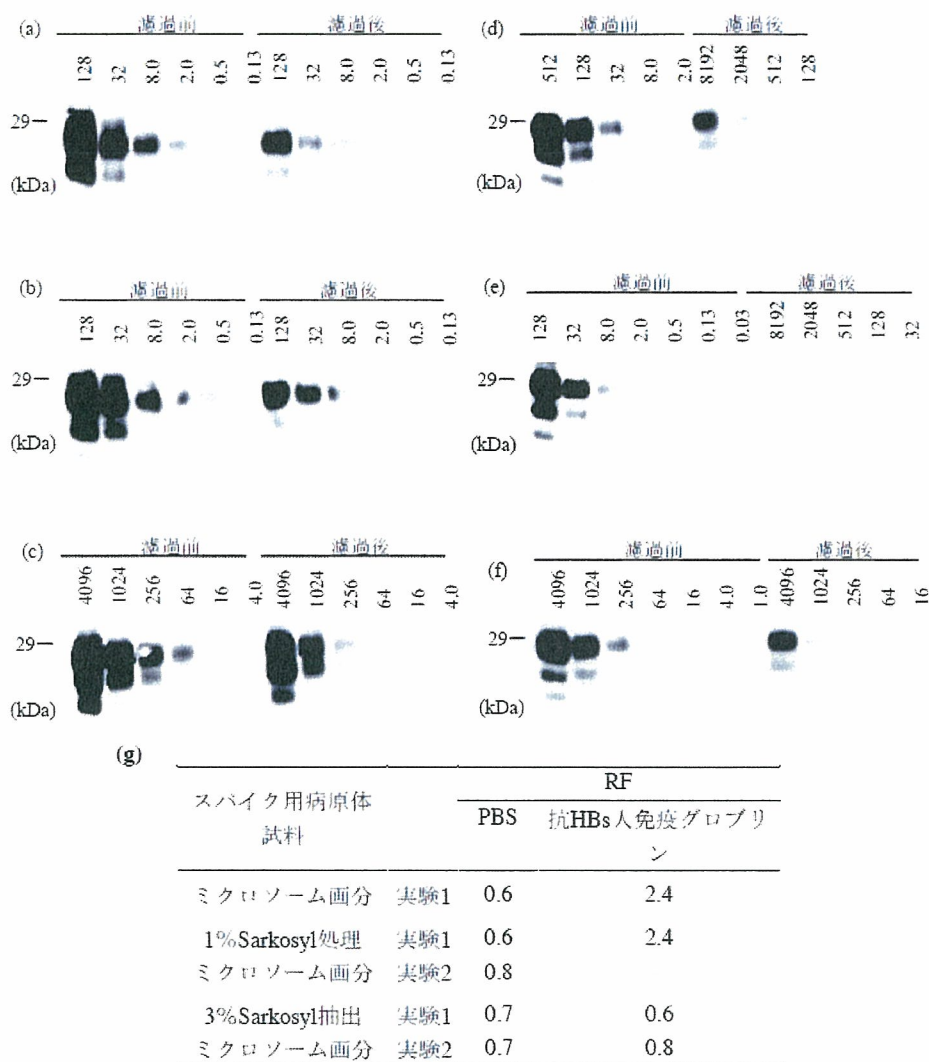
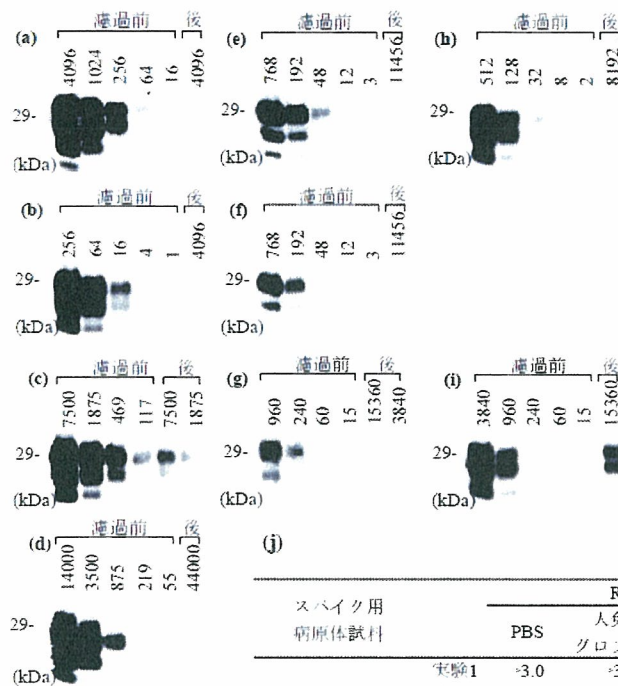




その結果、ろ液から PrP^{Sc} が検出され、バンドの定量解析から RF は 1.1 と算
 図 14. 孔径 0.22 μ m の PVDF 膜を用いた PrP のろ過

- (a) 263K 株感染ハムスター脳由来マイクロソーム画分を PBS に 1/100 量スパイクした病原体溶液を、孔径 0.22 μ m の PVDF 膜でろ過した。ろ過前液及びろ液からの PrP^{Sc} 検出用試料の調製は「B. 研究方法」に示した方法に従って行った。試料を 4 倍段階希釈して各レーンにアプライし、検出限界を確認した。各レーン上の数字はアプライした脳組織当量 (μ g) を示す。免疫染色には西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ (HRP) で標識した抗 PrP 抗体 mAb31C6 を使用し (「G. 研究発表」論文 22)、酵素抗体直接法により PrP を検出した。
- (b) 263K 株感染ハムスター脳由来 1 % Sarkosyl 処理マイクロソーム画分を PBS に 1/100 量スパイクした病原体溶液を、孔径 0.22 μ m の PVDF 膜でろ過した。以下、(a) と同様。
- (c) 263K 株感染ハムスター脳由来 3 % Sarkosyl 抽出マイクロソーム画分を PBS に 1/4 量スパイクした病原体溶液を、孔径 0.22 μ m の PVDF 膜でろ過した。以下、(a) と同様。
- (d) 263K 株感染ハムスター脳由来マイクロソーム画分を 5 % 抗 HBs 人免疫グロブリン溶液に 1/100 量スパイクした病原体溶液を、孔径 0.22 μ m の PVDF 膜でろ過した。以下、(a) と同様。
- (e) 263K 株感染ハムスター脳由来 1 % Sarkosyl 処理マイクロソーム画分を 5 % 抗 HBs 人免疫グロブリン溶液に 1/100 量スパイクした病原体溶液を、孔径 0.22 μ m の PVDF 膜でろ過した。以下、(a) と同様。
- (f) 263K 株感染ハムスター脳由来 3 % Sarkosyl 抽出マイクロソーム画分を 5 % 抗 HBs 人免疫グロブリン溶液に 1/4 量スパイクした病原体溶液を、孔径 0.22 μ m の PVDF 膜でろ過した。以下、(a) と同様。
- (g) ろ過前液及びろ液に含まれる PrP^{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 又は 2 回行って求めた RF。

図 15. 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ミクロソーム画分を 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プライし、検出限界を確認した。各レーン上の数字はアプライした脳組織当量 (μg) を示す。
- (b) 263K 株感染ハムスター脳由来 1 % Sarkosyl 処理ミクロソーム画分を 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 抽出ミクロソーム画分を 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 抽出ミクロソーム画分を 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ミクロソーム画分を 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 処理ミクロソーム画分を 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 抽出ミクロソーム画分を 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ミクロソーム画分を 0.3 mol/L 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 抽出ミクロソーム画分を 0.3 mol/L 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

$= \log_{10} [\text{ろ過前液の PrP}^{\text{Sc}} \text{ 量} / \text{ろ液の PrP}^{\text{Sc}} \text{ 量}]$ を算出した。同様の実験を 1 ～ 3 回行って求めた RF。

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、ろ液からは PrP^{Sc} は検出されなかった。

したがって、スパイク用病原体試料の種類とそれを添加する試料溶液の組成との組合せによってプロセスバリデーションの評価結果が異なることが示された。また、今回使用したスパイク試料の中では 3 % Sarkosyl 抽出ミクロソーム画分を使用した場合に、膜ろ過という物理的な工程において、より厳密なプロセスバリデーション評価が可能となることが示唆された。

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 2 に示す。また、仮訳を資料として添付する。

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^{res} が PrP^{sen} の構造変換

を引き起こして PrP^{res} にする性質を利用して、動物脳組織中の微量の PrP^{res} 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 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)

表2 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。

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^{res} 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 ELISA 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))。

なお、各々の詳細については、年度毎の総括／分担研究報告書を参照されたい。

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 PrP^C を産生し (Kikuchi, Y., *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.* 25: 728-733 (2002))、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))。この条件下で、T98G 細胞を低酸素条件下で培養すると、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 を発現した。その ORF は 230 アミノ酸をコードし、1 ~ 217 残基までは PrP と同じ 1 次構造で、94 % の相同性を有している (図 9)。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、PrPSV の C 末端部位 218 ~ 230 残基のペプチドを免疫原として抗体を作製した。得られたマウスモノクローナル抗体 HPSV178 は、イムノブロット法で組換えヒト PrPSV を認識した。これらの蛋白質と抗体は、製造工程等における異常プリオン蛋白質の除去技術の評価への利用が期待できる。

T98G 細胞を長期間継代すると、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。本研究で行った 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、マウスニューロブラストーマ細胞株 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))、ヒトニューロブラストーマ細胞株 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これらの 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。

スプライス変異型 PrP mRNA は、T98G 細胞だけではなく、市販の各種ヒト臓器由来 total RNA での発現が確認された。本研究で明らかにしたスプライス変異の部位は、*PRNP* exon 2 下流の 3' UTR に存在する。この部位に相当する牛及びマウス exon 3 の 3' UTR の塩基配列は良く保存されており、これらの動物種でもスプライス変異型 PrP の mRNA を発現している可能性がある。異常型プリオン蛋白質の産生とスプライス変異型 PrP mRNA 発現の関与は不明だが、今後は様々な遺伝子組換え医薬品等の産生に用いられる細胞培養株で、exon-exon junction primer を用いた RT-PCR で発現の確認を確認する予定である

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 × 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、粒子サイズの小さい PrP^{Sc} 画分の調整法を検討した結果、プリオン感染マウス脳乳剤を Sarkosyl で抽出することで、100,000 × g の超

遠心の上清中に PK 抵抗性の PrP^{Sc} が回収できることを見出した。プロセスバリデーションに使用する場合、病原体溶液はできるだけ濃度の高いことが望ましい。そこで、PrP^{Sc} の濃縮率を考慮し、263K 株感染脳からミクロソーム画分を調整し、そこから Sarkosyl 抽出を行うことで、PrP^{Sc} の濃度を高めることが可能となった。本研究では PrP^{Sc} 濃度の高いスパイク用試料が調製できる 263K 株をスパイク用試料として使用したが、他のプリオン株や界面活性剤の使用についても詳細に検討する必要がある。

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することの有用性が改めて確認できた。しかし、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も示唆された。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を用いたバイオアッセイで調べ、プリオンの感染性は 35nm 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} 検出方法にリン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られる。

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-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

本研究によって、以下のような成果が得られた。

- ① ヒトグリオーマ細胞株 T98G がスプライス変異型 GPI⁻ PrPSV を産生することを見いだした。ヒト組換え PrP 及び GPI⁻ PrPSV のコドン 129 Met/Val それぞれの発現ベクター、それらの蛋白質の産生および特異的に認識するモノ

クローナル抗体 HPSV178 を樹立した。組換え PrPSV は C 末端 13 残基が PrP と異なり、その部位を認識する特異的な抗体 HPSV178 を得たことから、血液製剤への添加回収実験への応用が可能と考えられる。今後は、プリオン病罹患者の脳や血液中の GPI⁻ PrPSV 測定など、今回開発された新たな研究手法がプリオン病発症機構解明に寄与することが期待される。

- ② 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、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、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孔径約 35 nm のプラノバ 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、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、及び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 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。

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., Takeya, T., Sakai, A., Takatori, K., Nakamura, N., Matsuda, H., Yamazaki, T., Tanamoto, K., and Sawada, J. "Propagation of a protease-resistant form of prion protein in long-term cultured human glioblastoma cell line T98G." *J. Gen. Virol.* 85: 3449-3457 (2004)
 - 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., Takeya, 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ェージ1本鎖抗体の作製." 日本薬学会第126年会 (28-30 Mar. 2006, 仙台)
- <平成17年>
- 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 I3/15 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., Takeya, 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

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

<資料>

"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)

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)

1. 背景

変異型のクロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) に代表されるヒトの伝達性海綿状脳症 (TSE) について、1998 年 1 月、1999 年 1 月、1999 年 12 月、2000 年 5 月、2000 年 12 月、2002 年 6 月及び 2004 年 1 月に EMEA の専門家会議／ワークショップで議論され、変異型 CJD (vCJD) と血液由来医薬品に関する CHMP の見解声明の改訂版が 2004 年 6 月に発行された (CHMP, EMEA. "CHMP Position Statement on Creutzfeldt-Jakob Disease and Plasma-derived and Urine-derived Medicinal Products." (EMEA/CPMP/BWP/2879/02/rev 1, 23 Jun. 2004))。

vCJD は 1996 年に同定された。2004 年 8 月 1 日現在での英国における vCJD 患者数は、vCJD 確定診断例及び疑い例を合わせて 147 例であった (香港での 1 例は、英国の症例として、英国の患者数に含まれる)。英国外では、アイルランドで 1 例、米国で 1 例及びカナダで 1 例が発生しているが、これらはおそらく英国内で感染した症例である。しかし、フランスの 7 例及びイタリアの 1 例は、いずれも英国の滞在経験はなかった。他の国で症例が発生している可能性は除外できない。これまでにジェノタイプ解析が行われたすべての vCJD 臨床症例において、プリオン蛋白質遺伝子の 129 番目のコドンはホモ接合体 (Met-Met) である。しかし、vCJD を発症していないものの明らかに感染している症例が最近報告された。その症例では、129 番目のコドンがヘテロ接合体 (Met-Val) であった (Peden, A. H., *et al.* Lancet 364: 527-529 (2004))。

ウシにおけるウシ海綿状脳症 (BSE) の病原体が vCJD の原因であるとの強い証拠が存在する。最も可能性の高いと思われる仮説は、BSE に汚染された食物を摂取することによって vCJD が引き起こされるというものである。

今後発生する vCJD の症例数に関しては、まだ不確実な点が残っている。孤発性 CJD とは対照的に、リンパ網内系に TSE 病原体が多量に含まれるとの証拠から、未発症の感染者の血液又はそこから製造された血液製剤を介して TSE が感染する可能性が懸念されている。

TSE のげっ歯類の実験モデルから得られたデータから、血液成分により感染が起こることが明らかとなった (Brown, P., *et al.* Transfusion 38: 810-816 (1998) ; Brown, P., *et al.* Transfusion 39: 1169-1178 (1999) ; Taylor, D. M., *et al.* J. Hosp. Infect. 46: 78 (2000) ; Cervenakova, L., *et al.* Transfusion 43: 1687-1694 (2003))。また、マカクザルで馴化された BSE の系統を実験的に感染させたハイイロネズミキツネザルのバフィーコートに感染性があることも見出されている (Bons, N., *et al.* Transfusion 42: 513-516 (2002))。同種内での輸血実験からは、実験的な BSE 又は天然型のスクレイピーの感染が輸血によってヒツジの間で伝達可能であることが示された (Hunter, N., *et al.* J. Gen. Virol. 83:

2897-2905 (2002))。一方で、野生型マウス (Bruce, M. E., *et al.* Lancet 358: 208-209 (2001))、トランスジェニックマウスや霊長類を用いてヒト血液の vCJD 感染性を検出する試験においては、一部の試験は依然進行中であるものの (Cervenáková, L., *et al.* Haemophilia 8: 63-75 (2002))、ヒト血液によって vCJD が伝達するという結果はこれまでにまだ得られていない。しかし、英国供血者の血液を輸血された例の追跡調査を行ったところ、vCJD の症状を後日発現した供血者からの赤血球を輸血された 2 例において、2 次感染の可能性があることが明らかになっている (Peden, A. H., *et al.* Lancet 364: 527-529 (2004) ; Llewelyn, C. A., *et al.* Lancet 363: 417-421 (2004))。血友病患者のような血漿分画製剤を高頻度使用するハイリスク集団を対象にした調査疫学調査では、血漿分画製剤の投与による CJD の発生は現在までに 1 例も確認されていない (Cervenáková, L., *et al.* Haemophilia 8: 63-75 (2002) ; Ricketts M. N., *et al.* Clin. Lab. Med. 23: 129-137 (2003))。血漿分画製剤を介して vCJD が感染し得るか否かについて結論するためには、疫学的事例があまりに不足している。2004 年 2 月現在、血漿由来製品の投与経験のある vCJD の症例は確認されていない (Llewelyn, C. A., *et al.* Lancet 363: 417-421 (2004))。

英国は BSE に最も曝露されており、その他の国よりもかなり多くの vCJD 症例が発生していることから、予防の措置として、英国供血者の血漿は現在血漿分画製剤の原料として使用されていない。フランス供血者の血漿は、リスクベネフィットの点でベネフィットがまさるとみなされ、現在血漿分画製剤の原料として使用されている。もし将来ついに他の国で vCJD の症例が一定期間内に数例報告された場合であっても、TSE 感染性を減少させることができるかすでに判明している工程が血漿分画製剤の製造に用いられていれば、過去の血漿分画製剤の安全性を改めて担保することができるであろうし、血漿分画製剤の原料として引き続き利用することを正当化するための助けになる。

2. 本指針の適用範囲

仮に原料となるヒト血漿中に vCJD の原因物質が存在しても、血漿由来製品の製造工程において感染性が減少するであろうことは、これまでのデータから示されている。2004 年 6 月の CHMP 見解声明においては「血漿分画製剤の製造者は、自分たちの採用する個々の製造工程について、それにより感染性を減らすことができるかどうかを、段階的アプローチを用いて見積もる必要が現在ある」とされている。

本ガイダンスの目的は、vCJD リスクに関して製造工程を評価する方法についてのガイダンスを提供することである。最終決定的なガイダンスを公表するためには、この領域における現時点での経験の蓄積は十分ではない。したがって、本ガイドラインでは現時点までの経験に基づくアドバイスを提供するが、他のアプローチも受け入れられる可能性がある。本文書は、上に引用した 2004 年 6 月の CHMP 見解声明 (改訂版)、特に「9.2.3 血漿由来製品の製造工程」の項と併せて読むことが非常に重要である。当該見解声明に記載されているとおり、関連する管轄官庁と十分に相談することを勧める。そして、CHMP 及び CHMP バイオテクノロジー作業部会 (BWP) も、新たに発生した問題について議論するために利用できるであろう。

3. 実験室レベルでの TSE クリアランス評価

3.1. 一般的原則

ウイルスの除去／不活化のバリデーション評価に関するガイダンス（CPMP, EMEA. "CPMP Note for Guidance on Virus Validation Studies: the Design, Contribution and Interpretation of Studies Validating the Inactivation and Removal of Viruses." (CPMP/BWP/268/95, 14 Feb. 1996)）で概説されている一般的原則を、TSE 病原体に関しても可能なかぎり拡張して適用すべきである。

製造工程から得られた試料に対してスパイクする、適切に調製された病原体溶液の容積は、元の試料の 10 %を超えてはならない。また、TSE の除去／不活化に関する評価は、正確にスケールダウンした実験室レベルのモデルで実施しなければならない。これらの実験は、実生産の現場から明確に隔離された場所において、よく制御され、かつ文書により管理された方法により、適切な資格のある人員が実施しなければならない。ウイルスバリデーション評価と同様に、スケールダウンしたモデルの妥当性について、関連するプロセスパラメータの値及びそのモデルの性能が適切であると示すことによって、明らかにしなければならない。

除去／不活化への寄与が期待される工程のみを評価すればよい。TSE 病原体は、血漿分画製剤の製造工程中で通常用いられる、ウイルスを不活化する物理化学的条件のほとんどに対して抵抗性を示すと考えられている。したがって、評価の対象として、冷エタノール分画、PEG 沈殿、クロマトグラフィー及びウイルスろ過のような除去／分配工程に焦点があたるであろう。

ウイルスバリデーション評価においては、このような除去工程について、当該病原体が異なる画分に存在することを明らかにすると共に、その工程のもつ当該病原体の除去／不活化能に影響を与えるパラメータについても調査することとされている（CPMP ガイダンス（CPMP/BWP/268/95）5.5 項参照）。TSE に関する研究は、従来の病原体に関する研究と比べてはるかに困難で、かつはるかに費用もかかる。そのため、実験室レベルでの試験デザインの妥当性を示す根拠の一部として、理論的根拠に基づき工程の頑健性を評価すること、及び適切にバリデートされた *in vitro* でのアッセイの結果を利用することは受け入れられる場合がある。製造パラメータの変動によって除去の効率は大きく影響を受ける可能性があるので、注意が必要である。したがって、分配工程についての評価研究のデザインを行う際には、工程内管理試験における限度値が重要である。当該研究においては、異なる画分にプリオンが実際に分配されていることを、*in vitro* のアッセイにより評価する必要がある。1 未満のクリアランス指数は重要でない。

最初にスパイクする力価が十分に高ければ、2（又はそれ以上の）工程を併せて評価できる場合もある。このような複数工程を併せて評価する場合には、それぞれの工程での各クリアランス指数及び複数工程全体のクリアランス指数を求めるために、各中間段階での試料についても分析を行うよう試験を設計すべきである。このような複数工程に対する評価は、各工程のクリアランス指数が小さい又は比較的小さい場合において各クリアランス指数を加え合わせて評価することの妥当性を示すために有用となる可能性がある。さらに加えて、TSE 病原体の物理化学的状態が大きく変化して、次の除去工程における除去効率に影響を与える可能性がある場合（例えば、ろ過工程に先立って実施