

Fig. 1 4種のPEIビーズのPrP吸着能の比較。分子量及び構造が異なる4種類のPEIビーズ、MW 1800、MW 10000、MW 70000、MW 70000 Brに、培養細胞由来の組成精したPrP^Cを負荷した。レーンの内訳は以下の通りである。Cell-PrP^C; 負荷したPrP^C、1; Flow through、2; 200 mM NaCl 溶出画分、3; 400 mM NaCl 溶出画分、4; 600 mM NaCl 溶出画分、5; 800 mM NaCl 溶出画分、6; 1 M NaCl 溶出画分、7; PEI ビーズ sample buffer 処理画分。

Table 1 プリオン除去効果

| Condition | Antithrombin | Albumin | PBS |
|----------------------|--------------|------------|-------------|
| Filter | Planova15N | Planova15N | MW 70000 Br |
| Log Reduction Factor | ≥3.5 | ≥3.1 | Effective |

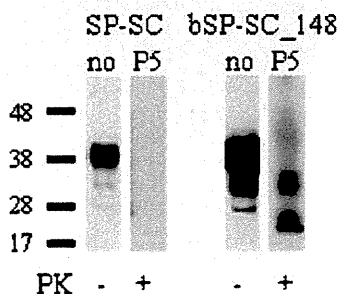


Fig. 2 クローン間のPrP^C発現量とmo-vCJDへの感染効率。クローン化する前のSP-SCと単クローン化したbSP-SC_148について、(no)はmo-vCJD感染前にPK未処理で、(P5)はmo-vCJDに細胞を感染させてから5回経代したものをPK処理して、それぞれWB法によりPrP^CとPrP^{Pres}を検出した。1レーンあたりの細胞数は(no)、(P5)でそれぞれ 3×10^3 、 1.5×10^5 個となっている。

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュトリーサイエンス総合研究事業）
（分担研究報告書）

遺伝子組換え医薬品等のプリオン安全性確保のための検出手法及び
プリオン除去工程評価に関する研究（H22・医薬一般・006）

分担研究者 酪農学園大学獣医学群 教授 萩原 克郎
研究協力者 株式会社ベネシス 柚木 幹弘、坂井 薫、久保 純

研究要旨：

マウス馴化 vCJD（mo-vCJD）感染モデル動物の確立を目的として、生後 1 日齢と 30 日齢マウスにそれぞれ mo-vCJD 株を接種し臨床所見を比較した。

- ④ 感染マウス脳乳剤 1%及び 5%接種において 30 日齢マウスで体重減少及び神経症状を伴う瀕死状態（Terminal ill、以下 TI）の発現が早期であった（体重減少：90、90 dpi TI：158、154 dpi）。
- ⑤ TI 時点での PrP^{res} の脳内蓄積量は大腦、中脳及び延髄に多く、接種日齢による PrP^{res} 蓄積部位とその量に差は見られなかった。
- ⑥ 病理学的所見をスコア化し比較したところ、延髄>大腦>中脳>小脳の順位で変性の程度が顕著であったが、接種日齢による差は認められなかった。

以上の知見から、発症までの期間が生後 1 日齢マウスよりも 30 日齢マウスで早かったことから、mo-vCJD を用いた感染評価では 30 日齢マウスでの接種が適していることが明らかとなった。

A. 研究目的

バイオ医薬品の製造工程におけるプリオン除去能力評価は、安全な医薬品製造において重要な課題である。本研究では、マウス馴化 vCJD（mo-vCJD）株を用いた in vivo 評価手法を確立するために、mo-vCJD 感染マウス脳乳剤をマウスに接種する発症モデルを検討した。前年度は、生後 30 日齢マウスに脳内接種し、①臨床所見、②脳内の Proteinase K 抵抗性プリオン蛋白（PrP^{res}）の蓄積及び③脳の病理学的所見を評価した。今年度は、モデルマウスの発症期間の検討を目的として、生後 1 日齢の新生仔マウスを用いて接種日齢差による発症期間の比較を検討した。

B. 研究方法

vCJD 感染モデルの作出は、マウスに馴化させた mo-vCJD 感染マウス由来の脳乳剤（1%及び 5%）を用い、生後 1 日齢の FVB/n mouse に上記乳剤を脳内接種し、発病まで観察した。

①発病時サンプル：接種後、臨床所見（行動所見）を確認し、瀕死状態（Terminal ill、以下 TI）に至った時点で剖検して脳を採取した。

②採取した脳（右）は大腦、中脳、小脳、延髄に分け、それぞれの PrP^{res} をウエスタンブロット（WB）法で測定した。

③左脳は、組織解析用にホルマリン固定し、定法に従い組織切片を作成し、免疫染色（PrP^{res}）、GFAP、HE 染色を行った。GFAP 及び HE 染色におけるグリアの増生、空砲変性及び神経変性について病理学的評価を実施し、それぞれ 0 から 3 迄の 4 段階でスコア化した。

以上①～③の内容を前年度実施した 30 日齢マウスでの接種実験の結果と比較した。

倫理面への配慮。プリオン感染サンプルは酪農学園大学病原体等安全管理委員会の規定（共同研究先での実施に当たってはその施設の委員会の規定）に従い取り扱った。動物実験は酪農学園大学動物実験指針の規定（共同研究先での実施に当たってはその施設の委員

会の規定) に従い実施した。

C. 研究成果

①1日齢マウスへの接種では、対照個体に対して体重増加率が低く、約180dpiまで緩やかに増加した。その後、発症しTI状態に至るまで急激な体重減少が見られた。なおTIに至るまでの平均日数は1%、5% mo-vCJD接種群でそれぞれ196、197日であった。TIにいたるまでの期間は30日齢マウスの場合よりも30~40日長かった (Fig. 1, Table 1)。

②上記発症マウスにおいては小脳以外の脳部位でPrP^{Pres}の蓄積が多く見られ、その部位毎のPrP^{Pres}の蓄積量は30日齢マウスに接種した所見と類似していた (Fig. 2)。

③病理学的所見のスコアは延髄>大脳>中脳>小脳の順位で変性の程度が顕著であり、この傾向は両接種群間で同様であったが、スコアの平均値は1日齢接種マウスが高かった (Fig. 3)。

D. 考察

vCJD感染マウスモデルを検討するには、発症までの期間と再現性、病変の特徴等を評価しやすいものであることが望ましい。一般的にプリオン感染症は、発症までの期間が長く実験条件が難しい面を有していた。ヒトのvCJD発症例では、平均26歳で発症し、その潜伏期間は約10年と考えられている。本研究では、発症までの期間がマウスの接種日齢に影響するか否かを検討した。

その結果、1日齢マウスにmo-vCJDを接種した方が潜伏期間は長期化傾向を示した。末期の個体間では脳内のPrP^{Pres}の蓄積量に有意な差はないが、病理学的所見のスコアは1日齢マウスの方が大きくなったことから、脳の発達段階におけるvCJD感染は、脳の変性に影響を及ぼすことが推察された。

E. 結論

バイオ医薬品の製造工程においてPrP除去効果を評価する動物試験では、実験手技の簡便性、実験期間、組織病変所見等を考慮すると30日齢マウスへの接種が感染マウスモデルとして適当であると考えられる。

F. 健康危険情報

特筆する情報なし

G. 研究発表 (○は本科研費に直接関係する論文) 論文発表

1. 論文発表

- 1) Kanai Y, Miyasaka S, Uyama S, Kawami S, Kato-Mori Y, Tsujikawa M, Yunoki M, Nishiyama S, Ikuta K, Hagiwara K. Hepatitis E virus in Norway rats (*Rattus norvegicus*) captured around pig farm. BMC Res Notes. 2012 Jan 5;5(1):4. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22217009.
- 2) Hagiwara K, Ando T, Koiwa M. The Influence of Borna Disease Viral Infection on Dairy Cow Reproduction. J Vet Med Sci. 2011 Nov 25. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22123302.
- 3) Sakemi Y, Tamura Y, Hagiwara K. Interleukin-6 in quarter milk as a further prediction marker for bovine subclinical mastitis. J Dairy Res. 2011 Feb;78(1):118-21. Epub 2010 Dec 7. PubMed PMID: 21134313.
- 4) Hisaeda K, Arima H, Sonobe T, Nasu M, Hagiwara K, Kirisawa R, Takahashi T, Kikuchi N, Nagahata H. Changes in Acute-Phase Proteins and Cytokines in Serum and Milk Whey from Dairy Cows with Naturally Occurring Peracute Mastitis Caused by *Klebsiella pneumoniae* and the Relationship to Clinical Outcome. J Vet Med Sci. 2011 Dec;73(11):1399-404. Epub 2011 Jun 28. PubMed PMID: 21712644.
- 5) ◎柚木 幹弘、萩原 克郎、生田 和良. バイオ医薬品におけるプリオンの問題ーヒト赤血球を原料とする人工酸素運搬体をめぐる問題ー. 人工血液 2011; 18(4): 142-150.

2. 学会発表

- 1) ◎Yunoki M, Hagiwara K, Ikuta K. TSE removal by filtration. 2011 PDA European Virus & TSE Safety Forum. June 2011, Barcelona, Spain.
- 2) ◎久保 純、大久保 裕士、中川 典子、坂井 薫、

柚木 幹弘、川見 祥代、萩原 克郎、生田 和良. バイオ医薬品からのマウス馴化型 vCJD の除去の可能性; 作用機序が異なる 3 種類のろ過膜のプリオン除去能. 第 35 回日本血液事業学会 2011 年 10 月 20-22 日、埼玉.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

特許取得：なし

実用新案登録：なし

I. その他：研究協力者：

本研究の一部は株式会社ベネシスとの共同研究として実施した。

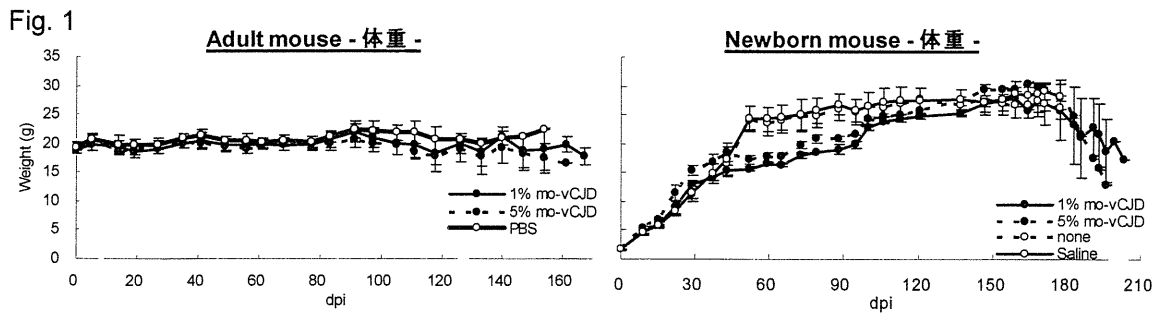


Fig. 1 接種時 30 日齢マウス (Adult mouse) と 1 日齢マウス (Newborn mouse) の体重の推移。

Table 1. mo-vCJD 接種から主要な病態発症までの期間 (dpi: days post-infection)

| 接種材料 | 30日齢マウス | | 新生仔マウス(1日齢) | |
|--------------------------|------------|------------|-------------|------------|
| | 1% mo-vCJD | 5% mo-vCJD | 1% mo-vCJD | 5% mo-vCJD |
| Terminal illnessに至るまでの期間 | 158 dpi | 153 dpi | 191 dpi | 196 dpi |
| 体重減少開始 | 90 dpi | 90 dpi | 159 dpi | 164 dpi |
| 異常行動開始* | 約100 dpi | 約100 dpi | 188 dpi | 191 dpi |

*成熟マウスと幼弱マウスでは評価項目が異なる

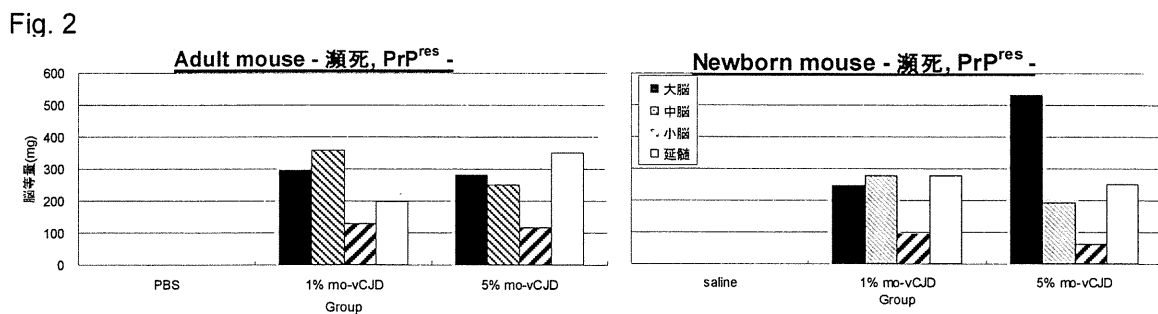


Fig. 2 接種時 30 日齢マウス (Adult mouse) と 1 日齢マウス (Newborn mouse) の脳内における PrP^{res} の量。採取した脳は大脳、中脳、小脳、延髄に分け、WB 法により PrP^{res} 量を測定した。Y 軸は測定した 1.6% 脳乳剤の、接種に用いた瀕死状態の Adult mouse に対する脳等量となっている。

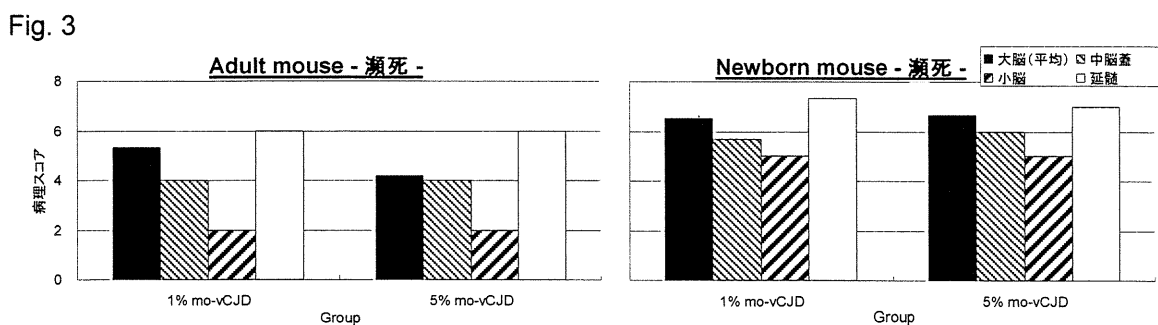


Fig. 3 接種時 30 日齢マウス (Adult mouse) と 1 日齢マウス (Newborn mouse) の脳の病理学的所見。採取した脳について GFAP、HE 染色を施し、大脳、中脳、小脳、延髄についてそれぞれスコア化した。

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）
平成23年度分担研究報告書
遺伝子組換え医薬品等のプリオン安全性確保のための検出法及び
プリオン除去工程評価に関する研究
・異常型プリオンの新規検出法に関する試験研究・

研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 菊池裕

研究要旨

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ウシ異常型プリオン蛋白質(PrP^{Sc})の高感度な検出法の開発が望まれている。動物由来製造原材料の品質確保および種々の製造工程の安全性評価を目的とし、特異的にPrP^{Sc}を認識する抗体の作製を行った。

PrP^{Sc}形成の初期段階に、ヒトPrPのN端側43残基のセリン(S43)がリン酸化S43 (pS43)に変化することから、pS43を含む周辺のアミノ酸配列を基にリン酸化プリオンペプチド抗原[pS43-hPrP (39-50)-Cys-SPDP-BCIP]を合成し、マウスを免疫して特異的にPrP^{Sc}を認識する抗体を調製した。

マウス21匹を4回免疫し、抗体価が上昇したマウス脾細胞を用いて細胞融合を行い、得意抗体を産生するハイブリドーマ3株を樹立した。その培養上清はイムノプロット法で抗プリオン蛋白質抗体6H4と同様な挙動を示してPrP^{Sc}を認識し、単量体及び二量体のPrPに相当するバンドを示した。

これらの研究成果はPrP^{Sc}やBSE罹患ヒツジ試料を用いた解析等への応用が期待され、今後はPrP^{Sc}のマウス脳内投与による伝達実験を行い、感染初期でのPrP^{Sc}検出法確立等への利用を試みる。

A. 研究目的

人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(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。一方、1996年に英国で発症が確認された変異型CJDは、従来の散発型CJDとは異なって若年性の患者で発症し、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牛海綿状脳症(BSE)に関する疫学研究から、ウシPrP^{Sc}が人へ伝達して発症すると考えられている。また、輸血によって変異型CJDを発症したと推定される症例が報告されており、血液を介したCJDの伝達が注目を集めている。多くの遺伝子組換え医薬品等の製造工程ではウシ胎児血清を用いることから、医薬品へのPrP^{Sc}汚染を防ぐために、ウシ由来原材料中のPrP^{Sc}測定法の確立が望まれている。

本研究は PrP^{Sc} を特異的に認識する抗体を作製し、新たな検出法の開発を目的とする。スクレイビー(Obihiro 株)を ICR マウスの脳内に投与して増幅された PrP^{Sc} を抗原とし、マウスを免疫し、正常型ではなく PrP^{Sc} を特異的に認識する抗体の作製を行う。

最近、PrP^{Sc}の産生にはセリン残基のリン酸化が関与し、cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5)がヒトPrP^CのN端側43残基のセリン(S43)をリン酸化すると、PrP^{Sc}への立体構造変化が促進され

ことが報告された(Giannopoulos, P.N. *et al.*, 2009, *J. Neurosci.* **29**, 8743-8751)。PrP^{Sc}が形成される初期にリン酸化S43 (pS43)への変換が予測され、pS43を含む周辺のアミノ酸配列を特異的に認識する抗体は、プリオン病の早期診断への利用が期待される。

本年度は、PrP^{Sc}感染マウス脳の作製を行うとともに、pS43-PrPを特異的に認識する抗体の調製を試みた。

B. 研究方法

1. 抗リン酸化セリンプリオン蛋白質抗体の作製

ヒトPrPのアミノ酸配列39-50残基を抗原とし、その43残基のSerがリン酸化されたリン酸化プリオンペプチド[pS43-hPrP (39-50)-Cys]及び通常のプリオンペプチド[hPrP (39-50)-Cys]を合成した。架橋剤としてSPDPを用い、水溶性キャリア蛋白質 Blue Carrier Immunogenic Protein (BCIP)に結合させた免疫原pS43-hPrP (39-50)-Cys-SPDP-BCIP (Fig. 1A)を調製した。マウス(BALB/c)を数回免疫後、脾臓から調製した脾細胞とマウス・ミエローマ細胞PAIの細胞融合を行った。培養上清のスクリーニングは、架橋剤のMBSでウシ血清アルブミン(BSA)とペプチドを結合させた pS43-hPrP (39-50)-Cys-MBS-BSA (Fig. 1B) 又は hPrP (39-50)-Cys-MBS-BSAを固相抗原として用いたELISAで行った。

2. スクレイピー感染脳乳液の調製

スクレイピー(obihiro株)感染マウス凍結脳は、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構プリオン病研究センター 横山隆 チーム長から御供与いただいた。マウスへのPrP^{Sc}感染実験は、広島大学広島大学大学院 生物圏科学研究科 免疫生物学研究室 松田治男教授に御教授いただいた。

ICR マウスの脳にスクレイピー(obihiro株)10%脳乳液を投与し、4か月後に安楽死させた。得られたスクレイピー感染脳を左右に二分割し、それぞれを0.32 Mシヨ糖溶液を用いて10%脳乳液を調製し、以降の実験に用いた。

3. イムノプロット法

試料をSDS-PAGEで分離後にPVDF膜へ転写し、第1抗体として抗PrP抗体6H4 (ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社)または抗p43S-hPrP (39-50)-BCIP抗体を、第2抗体にHRP標識抗IgG抗体を用いたイムノプロット法を行い、化学発光法で検出した。

(倫理面への配慮)

本研究の遂行にあたり、「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」、「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」、「同動物実験に関する指針」及び「同遺伝子組換え実験安全管理規則」を遵守した。

C. 研究結果

1. 抗pS43-hPrP (39-50)-Cys-BCIPモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの樹立

先に報告されたヒトPrPの43残基近傍のアミノ酸配列はほ乳類で高度に保存されており、本研究ではリン酸化セリンを含むヒトpS43-PrP (39-50)ペプチドを用いてマウスを免疫した。抗体価の測定はELISAで行い、固相抗原のリン酸化セリンを含まないhPrP (39-50)ペプチドを認識せず、リン酸化セリンを含むpS43-hPrP (39-50)を特異的に認識するマウスをスクリーニングした。21匹のマウスを2週間毎に4回免疫し、リン酸化プリオンペプチドを特異的に認識するマウスを得た。最も抗体価が上昇した1匹のマウス(Fig. 2)を最終免疫し、3日後に安楽死させたマウスから摘出した脾臓をマウスミエローマ細胞PAIと細胞融合させ、ハイブリドーマ産生抗体をELISAでスクリーニングし、数度の限界希釈法によるクローニング後、特異抗体を産生するハイブリドーマ3株、pSP240、pSP279及びpSP289を樹立した。

樹立したハイブリドーマを大量培養し、得られた培養上清に含まれる抗体の特異性をELISAで確認した。産生する抗体のアイソタイピング

の結果、サブクラスは3株ともIgG (κ, γ2b)だった(Table 1)。

次に、リン酸化プリオンペプチド[pS43-hPrP (39-50)-Cys-MBS-BSA]又はプリオンペプチド[hPrP (39-50)-Cys-MBS-BSA]を固相抗原としたELISAで、抗体の特異性を調べた(Fig. 3、Table 1)。pSP279の抗体価の比率(リン酸化プリオンペプチドの抗体価/プリオンペプチドの抗体価)は138を示し、pS43を含む配列に対する特異性が最も高かった。pSP289の比率も46と比較的高かった。一方、pSP240は高い抗体価を示したが、その比率は7で、特異性は最も低かった。

2. イムノプロット法によるpS43-PrP^{Sc}の検出

ハイブリドーマの培養上清を用い、PrP^{Sc}感染マウス脳乳液中のpS43-PrPに対する反応性を調べた。脳内にスクレイピー(obihiro株)を接種されたマウスは、その脳内にPrP^{Sc}を蓄積し、4-5か月後に死亡する。本研究ではエンドポイント直前の4か月でマウスを安楽死させ、PrP^{Sc}感染脳及び溶液のみを投与した対照脳(mock)を調製し、イムノプロット法に用いた(Fig. 4)。抗プリオン蛋白質抗体6H4を用いたイムノプロット法は、対象脳(lane 1)及びPrP^{Sc}感染脳(lane 2)ともに、二量体及び単量体のPrP^{Sc}に相当するバンドを示した(Fig. 4., lower panel)。一方、pSP279抗体を用いたイムノプロット法では、対象脳(lane 1)及びPrP^{Sc}感染脳(lane 2)ともに、6H4抗体と同様な二量体及び単量体のPrP^{Sc}に相当するバンドを示した(Fig. 4., upper panel)。pSP240抗体及びpSP289抗体を用いたイムノプロット法でも、pSP279と同様なバンドを示した。

D. 考察

本研究では遺伝子組換え医薬品等の安全性を確保するため、ウシ血清などの動物由来製造原料を汚染する恐れのあるPrP^{Sc}の新規検出法の確立を目的とし、PrP^{Sc}を特異的に認識する抗体の開発に関する研究を行った。

PrP^{Sc}の産生にはセリン残基のリン酸化が関与し、cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5)がヒトPrP^CのN端側43残基のセリンをリン酸化すると、PrP^{Sc}への立体構造変化が促進されることが報告されている(Giannopoulos, P.N. *et al.*, 2009, *J. Neurosci.* **29**, 8743–8751)。ヒトPrPのN端側43残基に位置するセリン近傍のアミノ酸配列はほ乳類間で高度に保存されており、リン酸化された43残基セリン(pS43)を特異的に認識する抗体は、ウシ、ヒツジ、マウス等のPrP^{Sc}を特異的に認識することが予想される。現在、リン酸化チロシンを特異的に認識する多くの抗体が知られているが、リン酸化セリンを認識する有効な抗体はいまだ得られていない。本研究ではpS43を

含むヒトPrPペプチドを合成し、pS43近傍のアミノ酸配列を特異的に認識する抗体の作製を試みた。

昨年度はマウスを pS43-hPrP (39-50)-Cys-MBS-BCIPで免疫し、血清の抗体価が上昇したマウスの脾細胞を用いて細胞融合を行ったが、安定したクローンを樹立できなかった。抗血清はイムノブロット法でPrP^{Sc}感染脳を特異的に認識したが、ペプチドとキャリア蛋白質の架橋剤として用いたMBSを認識する抗体を多く含んでいた。樹立したハイブリドーマも、PrPでは無く、MBSを認識した。MBSはSH基を含む低分子化合物とキャリア蛋白質の結合に多用され、多くの抗体産生ハイブリドーマが樹立されているが、その構造に芳香環を含むことから、抗原性が低い免疫原ではスパーサー部分に対する抗体を誘導する。

今年度は架橋剤の免疫原性を下げるため、免疫原の調製には直鎖のSPDPを架橋剤として用いた。免疫したマウスの抗血清は、MBSを含む免疫原で得られた抗血清より抗体価は低かったが、スパーサー部分のSPDPではなく、pS43-hPrP (39-50)を特異的に認識した。

リン酸化プリオンペプチドに対する抗体価がプリオンペプチドに対する抗体価より高いマウスの脾臓を摘出し、マウスミエローマ細胞株PAIと細胞融合を行い、3株の特異抗体産生ハイブリドーマを樹立した。その培養上清はELISAで極めて高い抗体価を示し、イムノブロット法でpS43近傍のアミノ酸配列を認識し、市販の抗プリオン蛋白質抗体6H4と同様に、PrP^{Sc}及びPrP^Cに特異的なバンドを示した。

樹立した3株のハイブリドーマは、それぞれ異なった特異性を示した。pSP279はELISAで固相のリン酸化プリオンペプチドに対する高い特異性を示し、一方でpSP240の特異性は低かった。これらpS43近傍のアミノ酸配列に対する反応性が異なる抗体を用いた検出法の構築は、リン酸化又は非リン酸化プリオン蛋白質それぞれの検出に有用と考えられる。

樹立したハイブリドーマが産生する抗体は、6H4と同様にイムノブロット法でPrP^{Sc}を認識した。しかし、PrP^{Sc}感染脳の例数が少ないことから、さらに多くの例数を検証する必要がある。その他、脱リン酸化したPrP^{Sc}感染脳のイムノブロット法や免疫蛍光法による脳切片の染色による比較等が必要である。

今年度はリン酸化プリオンペプチドに対する抗体産生ハイブリドーマを樹立したが、今後はPrP^{Sc}感染脳を免疫原として用い、PrP^{Sc}を特異的に認識する抗体の作製を試みる。また、固相抗原としてpS43-hPrP (39-50)を用いたELISAに加え、固相抗原にPrP^{Sc}感染マウス脳を用い、

より効率的な検出法の確立を予定している。

今後はスクレイピーのマウス脳内投与による伝達実験を行い、スクレイピー感染脳を抗原としたニワトリへの免疫による異常プリオン蛋白質特異的ニワトリ抗体の調製を予定している。

E. 結論

本研究ではPrP^{Sc}の新規検出法確立を目的とし、それらに資する基礎研究としてヒトpS43-PrP免疫原の作製、ハイブリドーマの樹立、産生するモノクローナル抗体の特異性をELISAおよびPrP^{Sc}感染マウス脳を用いたイムノブロット法で行った。これらの結果は、新たなPrP^{Sc}バイオアッセイ系の構築、プリオン病のバイオマーカー測定法開発への寄与が期待できる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 遊佐精一、菊池裕、小西良子、山口照英：Molecular characterization of mouse, human, bovine, and sheep PrP^C in cell lines.、Asian Pacific Prion Symposium 2011、平成23年7月10-11日、軽井沢町
- 東原知宏、菊池裕、中島治、遊佐精一、手島玲子、辻勉、小西良子、山口照英：ヒツジOA1細胞が発現するスプライス変異型プリオン蛋白質遺伝子の解析、第84回日本生化学会大会、平成23年9月20-24日、京都市
- Yutaka Kikuchi, Sei-ichi Yusa, Toshie Kanayasu-Toyoda, Osamu Nakajima, Reiko Teshima, Yoshiko Sugita-Konishi, Teruhide Yamaguchi: Expression of a splice variant of prion protein during hypoxia in human glioblastoma cell line T98G, Keystone Symposia, Advances in Hypoxic Signaling: From Bench to Bedside, February 12 - 17, 2012, Banff, Alberta, Canada

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I. 研究協力者

広島大学広島大学大学院 生物圏科学研究科
免疫生物学研究室 青笹正義
国立医薬品食品衛生研究所
代謝生化学部 中島治
衛生微生物部 遊佐精一

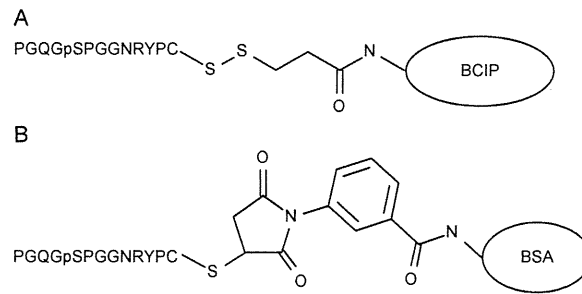


Fig. 1. Schematic diagram of antigens.

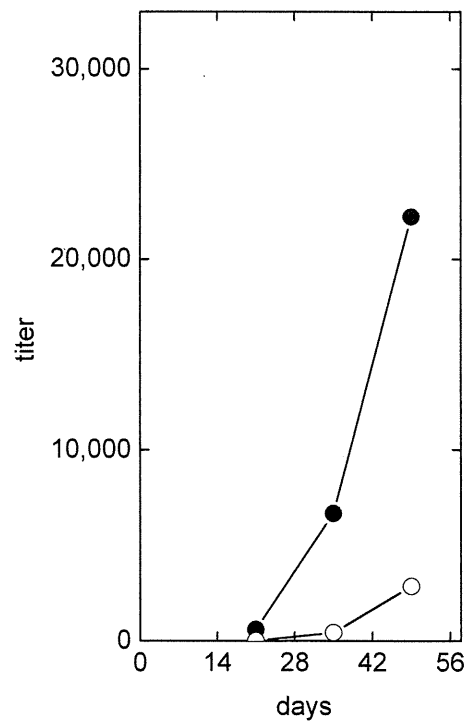


Fig. 2 Time course curve of mouse serum-titer.

Titer against pS43-hPrP
(39-50)-Cys-MBS-BSA and hPrP
(39-50)-Cys-MBS-BSA were measured in ELISA.

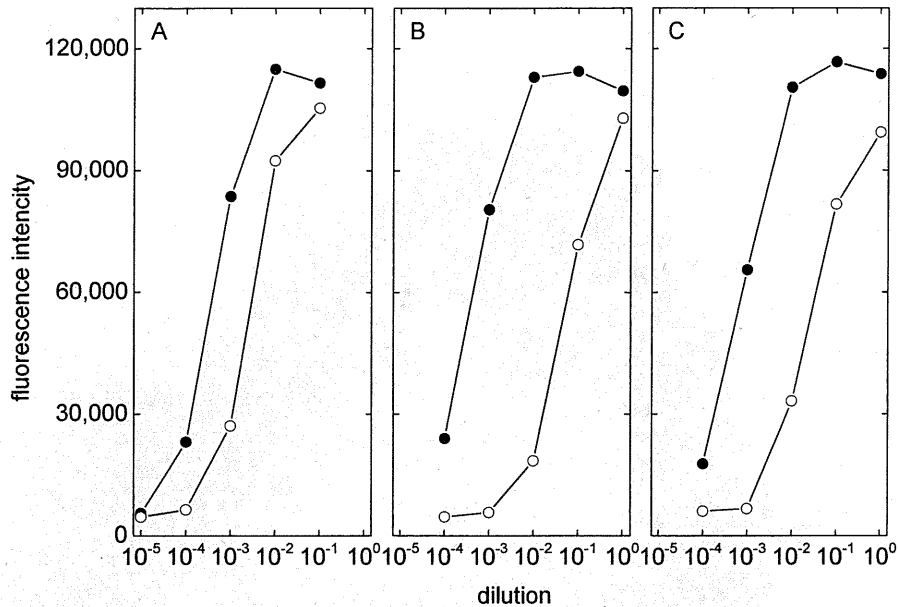


Fig. 3. Binding of antibodies to coating antigen in ELISA. Various concentration of anti-pS43-hPrP (39-50)-Cys-BCIP antibodies were incubated with pS43-hPrP (39-50)-Cys-MBS-BSA (●) or hPrP (39-50)-Cys-MBS-BSA (○) as coating antigen. A, pSP240; B, pSP279; C, pSP289.

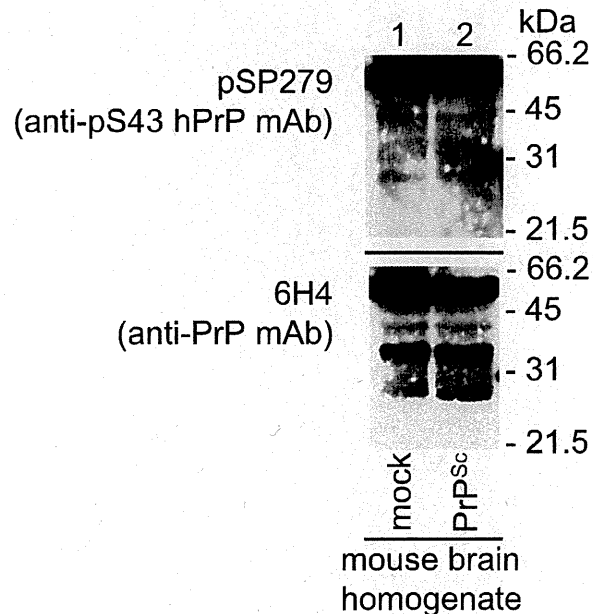


Fig. 4. Immunoblot analysis of mouse PrP^{Sc}. The mock or PrP^{Sc} inoculated mouse brain were prepared. Brain homogenates were subjected to SDS-PAGE. Mock (lane 1) and PrP^{Sc} (lane 2) were detected with anti-pS43 hPrP mAb pSP249 (upper panel) and anti-PrP mAb 6H4 (lower panel).

Table 1. 抗リン酸化プリオン蛋白質抗体の特異性

| 抗体 | 抗体価 | | | |
|--------|--------|----------------------|--------------|-----|
| | アイソタイプ | 固相抗原 | | 比率 |
| | | リン酸化 プリオン ペプチド | プリオン ペプチド | |
| pSP240 | κ, γ2b | 2,222 | 333 | 7 |
| pSP279 | κ, γ2b | 2,500 | 18 | 138 |
| pSP289 | κ, γ2b | 1,429 | 31 | 46 |

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

| 著者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|---|--|----------------------------|------------|---------|------|
| 柚木幹弘, 萩原克郎, 生田和良 | バイオ医薬品におけるプリ オンの問題ーヒト赤血球を 原料とする人工酸素運搬体 をめぐる問題ー | 人工血液 | 18 | 142-150 | 2011 |
| Tsujikawa, M., Ohkubo Y., Masuda, M., Tanaka, H., Takahashi, K., Sasaki, Y., Yunoki, M., Ikuta, K. | Caution in evaluation of removal of virus by filtration: Misinterpretation due to detection of viral genome fragments by PCR | <i>J. Virol. Methods</i> | 178 | 39-43 | 2011 |
| S. Nakazawa, N. Hashii, A. Harazono, N. Kawasaki | Analysis of oligomeric stability of insulin analogs using hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry | <i>Anal. Biochem.</i> | 420 | 61-67 | 2012 |
| 橋井則貴, 中澤志織, 川崎ナナ | 再生医療製品の品質評価に おけるグライコミクス | <i>YAKUGAKU ZASSHI</i> | 132 (4) | 489-497 | 2012 |

バイオ医薬品におけるプリオンの問題 —ヒト赤血球を原料とする人工酸素運搬体をめぐる問題—

Current Situation of Prion Risks on Biological Products - Points on the Consideration for Prion Risk in Artificial Blood Products Derived from Human Red Cells -

柚木 幹弘^(1,2,3), 萩原 克郎⁽²⁾, 生田 和良⁽³⁾

Mikihiro Yunoki^(1,2,3), Katsuro Hagiwara⁽²⁾, Kazuyoshi Ikuta⁽³⁾

和文抄録

生体成分を原料とするバイオ医薬品やヒト血液成分を原料とする血漿分画製剤には感染性病原体の理論的混入リスクが存在する。そのため、製造工程における安全対策の導入と製造工程中の感染性病原体の不活化・除去能力の評価が求められている。本稿では、ヒト血液由来の赤血球を原料とする人工酸素運搬体を中心に、注目すべき感染性病原体のひとつであるプリオンの問題に関して、1) 疫学などの背景、2) 輸血領域で現在とられている施策、3) バイオ医薬品のプリオンに対する安全対策研究の現状、などについて概説する。

Abstract

Biological products derived from animal materials and human blood theoretically carry the possible risks of contamination with infectious pathogens. Therefore, to employ the safety measures against the risks during manufacturing process, evaluation for pathogen inactivation and/or removal ability during the manufacturing process steps in individual products are required. Prion issue is an important risk factor of the biological / blood products. In this manuscript, points to consider the above possibility such as 1) epidemiology and background of prion issue, 2) safety measures against prion risks in blood transfusion and blood products fields, and 3) current situation through several researches against prion risks in the field, are summarized.

Keywords

Prion, Biological product, Blood, Safety, vCJD

1. はじめに

抗体医薬を始めとするバイオ医薬品の基本的な製造手法は確立されており、原料や細胞由来の病原体混入リスクや製造工程における病原体等の不活化・除去能力の評価に関する多くの知見が集積されている。血液製剤や血漿分画製剤についても、多くの研究や対策の実施、教訓によって得られた数多くの知見の集積がある。一方、新しい領域の血液代替物は開発途上であるが故に、これらのリスク評価は研究成果の集積途上にあると言える。このような製剤には、その製剤特性を理解した上でバイオ医薬品や血液・血漿分画製剤で得られた知見からそのリスク

の全容を俯瞰し、製造工程をデザインした上で、その製剤のリスクを評価する必要がある。本稿では研究開発途上の血液代替物の一つであり、日本の献血血液由来の赤血球を原料とする人工酸素運搬体を中心にバイオ医薬品におけるプリオン問題の現状について概説する。

2. BSE 及び vCJD の発生

1986年、英国においてこれまでに確認されていない神経症状を呈するウシの疾患が流行していることが報告された。この疾患は狂牛病 (Mad Cow Disease) と一般的に報道されたが、学

(1) ㈱ベネシス安全管理部 品質安全対策グループ 〒541-8505 大阪市中央区北浜2-6-18 Pathogenic Risk Management, Benesis Corp.
Pathogenic Risk Management, Benesis Corporation, 2-6-18, Kitahama, Chuo-ku, Osaka. 541-8505 Japan.

(2) 酪農学園大学大学院獣医学研究科 病原体リスク管理学講座 School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University

(3) 大阪大学微生物病研究所 ウイルス免疫分野 Department of Virology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University

論文受付 2010年1月23日 論文受理 2011年1月24日

術的には伝染性海綿脳症 (Transmissible Spongiform Encephalopathy, TSE) のひとつであり、ウシ海綿状脳症 (Bovine Spongiform Encephalopathy, BSE) と名付けられた。このBSE発生の原因が、ヒツジのTSEであるスクレイパーに感染した個体を含む肉骨粉の摂取によることが指摘され、BSEは羊のTSEの原因物質による感染によって生じることが疑われた。英国の公衆衛生当局は、英国内の家畜飼料からこの肉骨粉を排除する決定と、ウシ全頭モニタリング制度を導入することにより、更なる流行の拡大を抑止した。BSEは全世界的に流行する事が懸念されたが、そのほとんどが英国での発生にとどまり1992年をピーク (年間発生頭数約37,000頭) にその発生は減少した (Fig. 1)^{1,2)}。

日本においては2001年にBSEの発生が初めて確認され、その後、英国と同様の全頭モニタリング制度の導入と全頭検査が導入された。日本では2010年12月現在で総計36例の発生が確認されている³⁾。

ところが、1996年に英国においてこれまでに確認されていない病態を呈するクロイツフェルトヤコブ病 (Creutzfeldt-Jakob Disease, CJD) が報告された。この新しいヒトの疾患はこれまでのCJDとは違い若年性であることが特徴であるとされ、変異型CJD (Valiant CJD, vCJD) と命名された。このvCJDはBSE同様にほとんどが英国で発見され、その流行パターンがBSEのパターンと相関関係にあることから、vCJDの原因がBSE発症ウシ由来の原料の摂取によるものと疑われた。このvCJDはBSE同様に全世界的に流行・拡大することが懸念されたが大流行には至らず、全世界の現時点での総発生数は221名となっている。一番多く発生した英国では2000年に28例の発生をピークとした現時点の総計174名 (内、生存4例)、続いてフランスの2005-2006年の6例をピークとする総計25名であった (図1)^{2,4)}。日本においては2004年にvCJD患者が1名 (英国渡航歴有) 発生している⁵⁾。

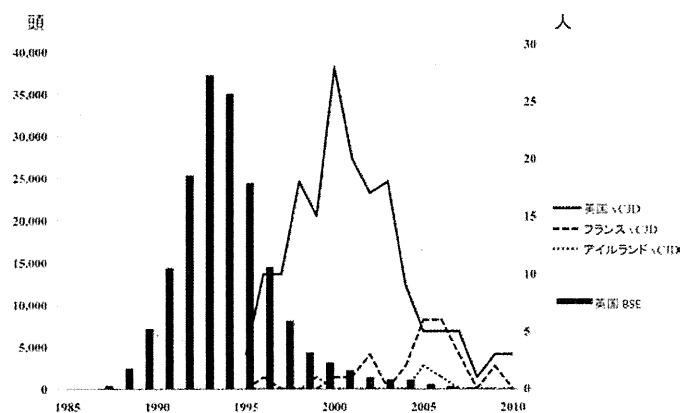


Fig. 1. BSEとvCJDの流行経過 (引用1) 2) より改変)。

3. 伝達性海綿状脳症の原因物質であるプリオン蛋白

CJD, vCJD, BSE, ScrapieなどのTSEの原因物質については長い間論争があったが、1982年にPrusinerがプリオン説を提唱したことで一定の収束を得た⁶⁾。プリオン (Prion) とは蛋白性の感染性粒子という意味であるProteinaceous Infectious Particleの短縮形造語であり、この感染性病原体はウイルス等と異なり遺伝情報を持たない蛋白質そのものである。ヒトの正常型プリオン蛋白 (Celler Prion protein, PrP^C) はCD230と同じで、第20番染色体にPRNP遺伝子としてコードされている⁷⁾。病原体としての感染性プリオン蛋白質はウイルス等の外来性物質ではなく、宿主の蛋白分解酵素感受性で α ヘリックスリッチな構造をしているPrP^Cが β シートリッチな構造をとる、蛋白分解酵素抵抗性 (Proteinase resistance prion protein, PrP^{Res}) の構造に変換したものである。これを異常型プリオン蛋白と呼ぶが、PrP^{Res}の種類により蛋白質分解酵素への抵抗性は同じではない。この構造変換はPrP^{Res}を種として、体内のPrP^Cが次々にPrP^{Res}に変化・結合・集積するものと考えられている。また、感染性プリオン蛋白は単量体でなく重合体として存在していると考えられ、粒子径10nm以下の重合体は感染性がなく、20~25nmの粒子径のものが最も感染性が高いとの報告がある⁸⁾。通常病原体はその存続のために宿主に感染・増殖し、遺伝情報の伝達により子孫を増やすというのが一般的な理解である。しかしながら、このプリオンは存続させるべき遺伝情報を持たないことから、これまでの概念に一石を投じることになった。これらのプリオン蛋白は、高次構造の違いを除いて宿主蛋白そのものであることから、新しい感染性病原体の概念がここに確立することになった。

4. 社会の反応

BSEとvCJDの関連性が指摘された事は、畜産を中心とした食品安全上のBSE問題を再び惹起する事となった。さらに、感染性プリオン蛋白は蛋白分解酵素に抵抗性であるだけでなく、121℃のオートクレーブ滅菌にも耐えるなど不活化が困難であることから、医薬品領域においても大きな問題を惹起した。医薬品にはゼラチンカプセルなどウシ由来の原材料が数多く使用されていることから、日欧米の規制当局はプリオンに関するガイダンスの制定や行政指導をおこなった。厚生労働省も、1996年にメーカーに対してウシ由来原材料の使用実態と原産国の把握を求めた⁹⁾、そしてプリオンに対するリスク評価を2000年に求めた¹⁰⁾。メーカーはこのBSE問題に対応するとともに、可能なものについてはウシ由来以外の原料への切り替えを行った。

ヒトや動物組織を原料とする蛋白医薬製剤は、その製剤化工程で強力な蛋白変性操作は導入されていない。そこで、ヨーロッパの規制当局は1998, 2003, 2004, 2009, 2010年にプリオンのリスク評価に関する見解を発出した^{11, 12, 13)}。日本においても2003年に厚生労働省よりプリオン対策強化が通知された¹⁴⁾。これを受け、ウシ組織抽出物由来の医薬品や血液製剤のメーカーは各蛋白医薬製剤に導入されている工程のプリオン除去能力

の評価を行い、必要に応じてプリオンに対するリスク低減のために、ウシ原産国の変更や新たな工程の導入を実施した。

5. CJDの疫学

ヒトのプリオン病であるCJDには孤発性CJD (Sporadic CJD, sCJD)、家族 (遺伝) 性CJD (Familial CJD, fCJD)、医原性CJD (iatrogenic CJD, iCJD) そしてvCJDがある。sCJDは55歳以上のヒトに約100万人に1人の割合で発症するCJDであるが、輸血などを通じてのヒト-ヒト感染例の報告は現時点ではない。医薬品への感染性プリオン蛋白の混入リスクが高いもののひとつに、輸血を始めとする血液製剤がある。献血後にvCJDに感染していることが判明したドナー由来の血液製剤を輸血された事例が英国で確認され、現時点で受血者4名がvCJDに感染したと考えられている¹⁵⁾。2010年のWHO見解ではヒト血液は低感染性組織のカテゴリーに分類され、vCJDの感染性あり、CJDは感染性なしと判断されている¹⁶⁾。更に、英国では血友病患者もモニタリングされている。本年、死亡した血友病患者の病理解剖を行ったところ、脾臓に異常型プリオン蛋白が発見された¹⁷⁾。この患者は生前に神経症状を発症していなかったにも関わらずvCJDに感染していた。英国健康保健局 (Health Protection Agency, HPA) 及び米国食品医薬品局 (Food and Drug Administration, FDA) は見解を出したが、そのリスクレベルの変更は行わなかった^{18,19)}。この事例は輸血製剤だけではなく血漿分画製剤でもリスクが残存することを示すことになった。2010年、欧米の規制当局はそれぞれ、メーカーが実施する製剤のリスクアセスメントに関するガイダンス (改定案) を発表した^{11,13,20)}。また、他の医原性感染として硬膜移植、ヒト脳下垂体由来製剤 (成長ホルモンなど)、角膜移植や手術器具を介しての感染も認められている^{21,22)}。

日本ではCJDのサーベイランスが実施されており、1999年から2009年までの間に確認された1324例のCJDは、sCJDが1019例 (77%)、fCJDが220例 (16.6%)、iCJD (全例硬膜移植) が80例 (6.0%、期間外を加えると総計138名))、vCJDが1例 (0.1%)、分類できないCJDが4例 (0.3%) であった²³⁾。この中で実際に輸血によるリスクがあると考えられるドナーとなりうるのはiCJDとvCJD患者由来であるが、手術歴などの確認によりiCJD患者がドナーになる可能性を排除しており、現実にはvCJDのリスクを検討する必要がある。日本のvCJDは現時点で1例であるが、英国渡航に由来してvCJDに感染するリスクと、その感染者が献血し、輸血を通して国内で感染が拡大するリスクを検討したところ、2007年までに0.06人が発症し、ポアソン分布を適用すると少なくとも1人の発生は否定できないが、2人以上の発生は極めて低いという結果が得られた。次に輸血による感染予測が行われた。モデル予測は、1) 1990年に20代前半の感染者が1名存在し、2) 輸血感染による潜伏期間は食餌による感染時と同じ、3) 汚染血の輸血で必ず感染、4) 輸血歴のある人や海外渡航歴のある人の献血制限は実施しない、5) 輸血経験者の死亡率は増加しないという条件で実施した。その結果、感染者数は2003年ごろにピークを迎え、累

積発症者数の増加は2010年代の前半ではほぼ終わり、0.563人という結果となった。これらの結果から、現在のBSE/vCJDの疫学状況等の知見が大きく変化しない限り、2010年以降の日本における輸血によるvCJD感染が現実には発生する可能性は非常に低いと考えられる²⁴⁾。

6. 血液及び血液成分のリスクとその低減策

プリオンリスクの実効的対策は、検査によるリスク排除である。現在、日本ではウシに対して世界でも例を見ない全数検査を行っており、世界的にも最高レベルの対策を取っている。これに加えて、餌の管理、臨床症状のモニタリング、イヤータグによる全数管理、屠場での解体方法や交差汚染の管理など、多くの対策を組み合わせることでその安全性を確保している。ヒトのvCJDについてもウシの場合と同様に多数の検体を迅速に安価に検査する方法を開発する必要がある。vCJD検査の産業応用できる手法として、蛋白分解酵素を用いないELISA法が提案されている²⁴⁾。しかしながら産業応用可能でCJD/vCJDに有効な検査手法は現時点で開発されていない²⁵⁾。

血液は主に赤血球、血小板、白血球、血漿の画分に分けることができる。プリオン蛋白は細胞膜上に存在すると考えられていることから、血液細胞が輸血領域における主なプリオン伝播リスクであると考えられる。輸血によるvCJD感染リスクの低減策を講じる必要があるが、献血基準の中にCJD/vCJDリスクを低減させる問診項目として英国などの滞在歴を設定し、ドナーの適格性を確保している。また、白血球除去フィルターがプリオン除去に効果があるとされ、その効果が確認されているものもある^{25,26)}。血漿分画製剤の原料となる血漿については、更に6ヵ月の貯留保管を行った後に日本赤十字社からメーカーに出荷されることにより、採血 (原料) 段階でのリスク低減を行っている。更に、血漿分画製剤の製造工程においてプリオンを除去する工程を導入することによりその安全性の確保に努めている²⁷⁾。

7. 人工酸素運搬体

現在開発研究が進められている人工酸素運搬体の種類はいくつかあるが、その多くはヒト赤血球よりヘモグロビン (Hb) を抽出・精製した高純度・高濃度のヒトヘモグロビン (Hb) 溶液を原料とし、脂質二重膜で包埋したりポソーム型又は非カプセル型架橋修飾・PEG修飾の形状をとる²⁸⁾。ヒト赤血球の大きさは約8μm、精製したHbは約4nmの大きさであり、これを小胞体に包埋した時の小胞体径は約200~250nmである^{28,29)}。これらの運搬体はHbをヒト赤血球から得ていることから、ドナー由来の病原体の混入が理論的なリスク因子として存在する。この人工酸素運搬体に使用されるHbは赤血球を出発原料として精製されるが、Hbの大きさが約4nmに対して、異常型プリオン蛋白単分子の分子量は約30,000、感染性プリオン蛋白の粒子は10nm以上の重合体³⁰⁾と考えられる。Hbの精製工程におけるプリオン除去は血漿分画製剤の製造工程に導入されているプリオン除去手法を応用可能であると考えられ、人工酸素運搬体の製

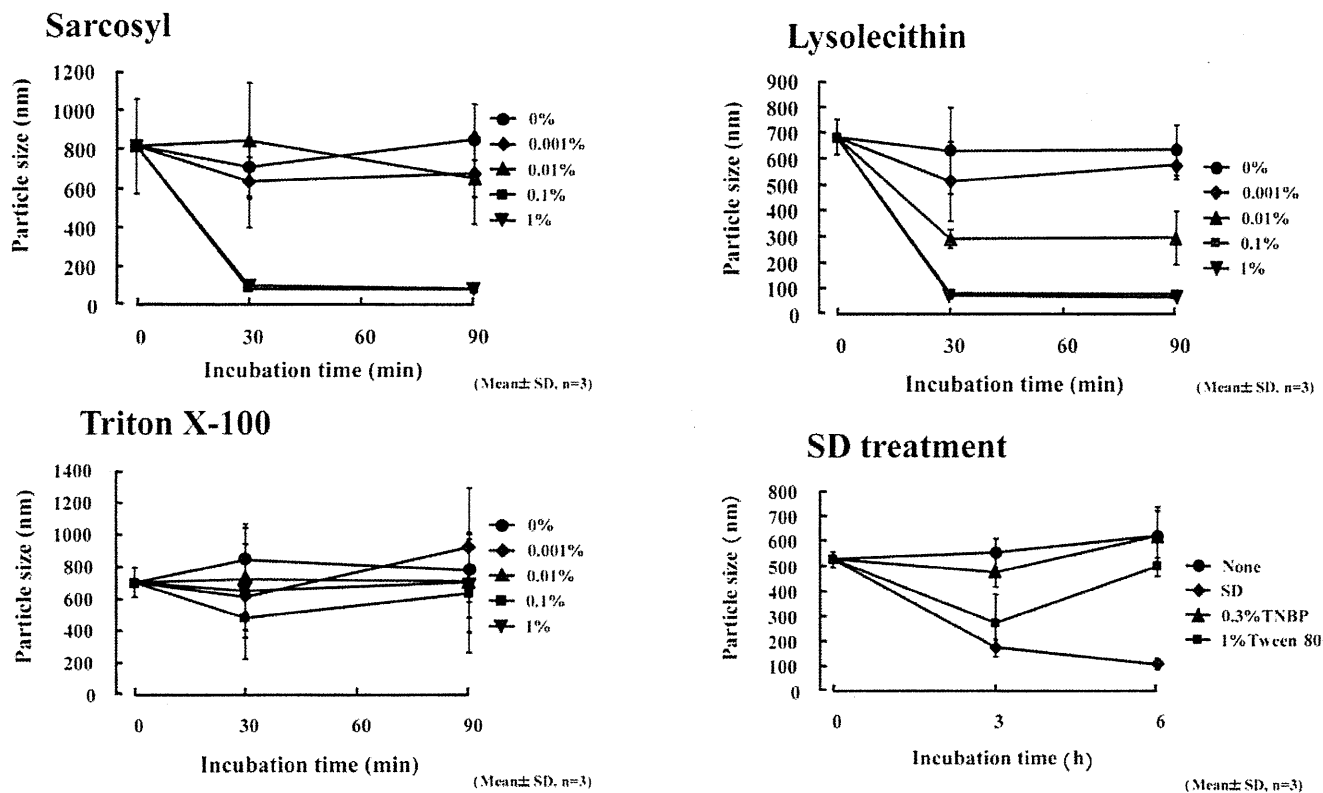


Fig. 2. 界面活性剤処理による263K株感染ハムスター脳由来マイクロソーム画分の粒子径変化 (文献30より引用).

造工程にプリオン除去工程を導入するには赤血球からヘモグロビンを精製する過程に導入するのが適している。

8. 工程評価を行う上でのプリオン材料調製法の問題

プリオン除去に関する工程評価を行う場合、感染動物の脳を出発材料として調製することが一般的である。プリオン研究初期には脳ホモジネート (Brain Homogenate, BH) を用いていたが、その後は精製操作を加えて膜画分 (Microsomal Fraction, MF) が主に使われるようになった。本来、工程評価に用いるプリオン材料は感染動物の血液や血漿を用いることが望ましい。しかしながら、血液から工程評価に用いることができる量の感染性プリオン蛋白を得ることは困難であり、このMFを使用せざるを得ない。しかしながらMFは工程評価に用いる材料として最適化されたものではなかった。

そこで私たちは、ヒツジのスクレイピー株 (Hamster adopted scrapie ハムスター 263K) を用いてこのMFの粒子径に着目した工程評価材料としての適格性を検討した。MFの平均粒子径は約800nm程度あったのに対して、Sarcosyl や Lysolecithin や超音波処理によって短時間で、約200nm以下の平均粒子径にすることができた。ウイルス不活化に用いられるSD処理は用いられるTri (n-butyl) phosphate (TNBP) と Polyoxyethylensorbitan monooleate (Tween80) を組み合わせて長時間処理しないと平均粒子径を200nm以下に出来な

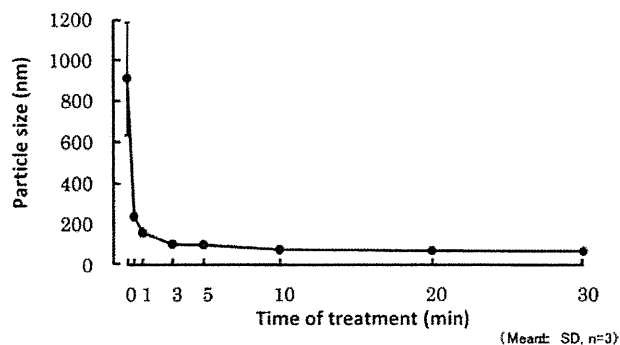


Fig. 3. 超音波処理による263K株感染ハムスター脳由来マイクロソーム画分の粒子径変化 (文献30より引用).

った。これに対して、Polyoxyethylene-p-isooctylphenol (Triton X-100) は平均粒子径に影響を与えなかった (Fig. 2, 3)³⁰⁾。また、MFをPBSに添加し220nm, 100nm, 75nm, 35nm, 19nm, 15nmのろ過膜でろ過したところ、100nmと75nmのろ過膜の結果において超音波処理の有無で除去効果 (除去指数, Log Reduction Factor, LRF) に差が生じた (Table 1)³⁰⁾。このことより、工程評価に用いるプリオン材料はSarcosilやLysolecithinなどの界面活性剤処理や超音波処理を行う事が望ましいことが明らかになった。なお、超音波処理

Table 1. PBS中の263K株異常型プリオン除去（文献30より引用）.

| 公称膜孔径 | PVDFフィルター | | | | Planovaフィルター | | | | | |
|-------|-----------|---------|---------|---------|--------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | 220nm | | 100nm | | 72nm | | 35nm | | 15nm | |
| 超音波処理 | あり | なし | あり | なし | あり | なし | あり | なし | あり | なし |
| ろ過前 | 4.2/3.5 | 3.5/4.2 | 4.2/3.5 | 3.5/4.2 | 4.2/4.2 | 3.5/4.2 | 4.2/4.2 | 3.5/4.2 | 4.2/4.2 | 3.5/4.2 |
| ろ過後 | 3.8/3.8 | 3.1/3.8 | 3.8/3.1 | 2.4/3.1 | 2.4/2.4 | <1.0/<1.0 | <1.0/<1.0 | <1.0/<1.0 | <1.0/<1.0 | <1.0/<1.0 |
| 除去指数 | 0.4/-0.3 | 0.4/0.4 | 0.4/0.4 | 1.1/1.1 | 1.8/1.8 | ≥2.5/≥3.2 | ≥3.2/≥3.2 | ≥2.5/≥3.2 | ≥3.2/≥3.2 | ≥2.5/≥3.2 |

ウエスタンブロッティング (WB法) による評価.

数値はNon-detectable endpoint法によって求めた総Log₁₀値で示した.

したMFは組成の変化がなく、工程サンプルに与える影響は最小限に止めることができるが、界面活性剤処理したMFは界面活性剤が残存することから工程サンプル及び評価に与える影響を考慮する必要がある.

次に、このプリオン材料が工程評価を行う上で、血液中の感染性プリオン蛋白をどこまで反映・再現させているかという問題がある。輸血でvCJDが伝播することが報告されており、血液細胞画分には膜結合蛋白であるプリオン蛋白が含まれることは予測できる。しかしながら血漿には感染性プリオン蛋白が細胞断片として含まれるのか、それとも可溶化画分として存在するのかについては不明な点が多い。私たちは血漿分画製剤の製造工程に導入されているウイルス除去膜（平均膜孔径15nm）を用いて、実際の製造条件を模倣してプリオン蛋白の除去性能を評価した。この15nmのろ過膜はバイオ医薬品分野に産業応用できる世界で最も公称膜孔径の小さなウイルス除去膜である。この膜処理により、ウエスタンブロッティング (WB) 法による評価でろ液中の異常型プリオン蛋白は検出限界以下にまで除去され3.5Log以上の除去指数を示した。これに対して、動物への接種実験ではろ液中の感染性プリオン蛋白は4.0Log以上の除去指数を示したものの、一部のサンプルで感染性を認めた。更にこの15nmろ液を150,000g、1時間の超遠心操作を行い、得られた上清画分と沈殿画分について感染実験を行った。この超遠心条件はプリオン蛋白を濃縮する時に採用されている条件であるが、驚くべきことに両方の画分に感染性が認められた (Table 2)^{30,31}。感染動物の脳ホモジネートの超遠心上清に感染性が認められることはBerardiらが報告している³²が、この上清画分に残存する感染性プリオン蛋白が15nmの膜を通過することが可能であることは新しい知見である。一方、Silveiraらは約20~25nmの重合体が最も感染性が高く、10nm以下の画分には感染性は認められなかったと報告している⁸。15nmのウイルス除去膜はその孔径に近い粒子径を有するパルボウイルスなどを高負荷した時に一部のウイルスがろ液に認められることを経験している³³が、15nm以下の大きさの感染性プリオン蛋白が膜を通過した可能性がある。一方、vCJD感染マウスの、赤血球、Buffy coat、血小板含有血漿、血漿等を正常マウスに

Table 2. 15nmろ過による異常型プリオン蛋白の除去 (文献30, 31より引用).

| | Lysolecithin及び超音波処理263K | | 超音波処理263K | |
|-------|-------------------------|------------|-----------|---------|
| | WB (定量) | BA (定量) | WB (定量) | BA (定性) |
| ろ過前 | 6.1/6.1 | 7.97/8.30 | 3.6 | 発症 |
| ろ過後 | <2.6/<2.6 | <3.25/4.30 | <0.8 | 発症 |
| 除去係数 | ≥3.5/3.5 | ≥4.72/4.00 | ≥2.8 | NA |
| 超遠心沈殿 | NA | NA | <1.0 | 発症 |
| 超遠心上清 | NA | NA | <1.0 | 発症 |

WB：ウエスタンブロッティングによる評価.

数値はNon-detectable endpoint法によって求めた総Log₁₀値で示した.

BA：動物接種試験による定量又は定性評価.

定量評価は階段希釈サンプルを用い、群6匹の結果からKarbar法により、総ID50 (Log₁₀) 値で示した.

脳内又は静注にて接種したところ、赤血球画分には感染性が認められなかったものの、それ以外のサンプルすべてに感染性が認められた³⁴。これらの結果はあくまで実験的に得られた現象であり、ヒト血漿中の存在様式を証明したものではないが、感染性プリオン蛋白はこれまでに知られている膜結合型としての存在様式に加えて、血漿中に可溶化又は非常に微細な画分（私たちは、Soluble like formとした）としても存在し得ることを示唆することとなった。

赤血球を原料とするHbを考える場合、混入してくるプリオン蛋白の形態として、膜由来（結合）とSoluble like formのプリオン蛋白の2つの存在様式が考えられる。血漿も同様に細胞断片及びSoluble like formの存在様式が理論的に考えられる。現在評価試験に用いているプリオン材料はその両方を含んでいることが実験結果から示されているので、評価結果は両方の存在様式を反映したものであると思われる。しかしながら、Soluble like formの感染性プリオン蛋白の実態や血漿中の感染性プリオン蛋白の存在様式に関する知見はほとんどないので、Soluble like formの意味についての更なる研究が求められる。

9. 工程評価を行う上でのプリオン株の問題

現在工程評価にはvCJDのモデルとして、263K株などが主に使用されている。これは263K株が長期にわたりプリオン研究に用いられてきており、評価手法が確立していたことや、BSEやvCJDの動物馴化株がなかったことによる。しかしながら、263K株を評価に用いる場合は、BSE株、vCJD株の持つ蛋白分解酵素（PK）への抵抗性等の性状が異なる可能性があることを考慮する必要がある。また、再利用するデバイスや設備などのプリオン清浄化（不活化）に関しても、プリオン蛋白の持つ性状から慎重にその条件を設定する必要がある³⁵⁾。これらのことから、vCJDやBSEのモデルとして263K株を用いることによる影響を工程条件設定時や評価時には必ず意識しておくべきである。

米国赤十字のAkimovらは、vCJDのマウス馴化株及び細胞培養法を樹立した³⁶⁾。私たちはこの株と関連技術を導入し、vCJDを直接用いた評価試験技術確立とvCJDのモデルとしての263K株の妥当性に関する検討を進めている。vCJD感染マウス脳由来の超音波処理プリオン材料を用いて15nmろ過膜による異常型プリオン蛋白の除去特性をWB法で評価したところ、2.8Logの除去指数を示したものの、ろ液中に異常型プリオン蛋白を認めたと（Table 3）³⁷⁾。この結果から、同じ方法で調製したプリオン材料を用いたろ過実験では、263K株も、vCJD株も同様のろ過（除去）特性を示すことが明らかになった。しかしながら263K株はこれまでWBレベルで15nmろ過後液には検出された事がなかったのに対して、vCJD株は検出された。この結果は検出感度によるものなのか、263K株とvCJD株由来の異常型プリオンの物性の違いによるものなのか、現時点で判断することはできない。感染性を含めた詳細を更に検討する必要がある。

Table 3. 15nmろ過膜によるvCJD及び263K由来・超音波処理マイクロソーマル画分中の異常型プリオン蛋白の除去。

| | vCJD | 263K |
|------|------|------|
| ろ過前 | 3.1 | 4.2 |
| ろ過後 | 0.3 | <1.0 |
| 除去指数 | 2.8 | ≧3.2 |

ウエスタンブロッティング（WB法）による検出。
数値はNon-detectable endpoint法によって求めた総Log₁₀値で示した。

10. リスク評価を行う上での留意点

工程評価を行う上でのプリオン材料の留意点は上述の通りであるが、製剤のリスク評価を行うにあたっては他にも留意すべき点がある。まず、製剤のリスク評価はいくつかの施策の組合せによって完成するという点が挙げられる。人工酸素運搬体のリスク評価を行う場合、原料に対する評価と工程に対する評価が基本となる。そしてその製剤を投与される患者に対するリスク・ベネフィットに基づき有用性の判断を行うことになる。

原料に対する評価は、1ロットの製剤を製造するための原料

（赤血球）に異常型プリオン蛋白が混入する量を疫学的に推定することによって行う。現在、日本では輸血によるvCJDの発生確率は1人と考えられている²³⁾。現在、ヒト血液中のvCJDの感染価を定量的に推測することができないが、英国ではvCJDに汚染していると思われる輸血例66例中4例が感染している³⁸⁾。vCJD感染マウスのBuffy coat、赤血球及び血漿を静注ルートによりマウスに感染させたところ、Buffy coatと血漿は感染性を示し、赤血球画分は感染性を示さなかった³⁴⁾。これらの知見に基づけば、日本の献血由来のvCJD陽性原料を製造に用いる可能性はほとんどないと解釈されるが、原料画分には感染性が認められることから、任意のロットに混入する推定最大量は1単位（ドナー）となる。よって、工程の評価はこれを基準として考えることになる。

具体的な対策として、次の対策が考えられる。まず、採血時に白血球除去膜処理を導入し、原料段階でのリスク低減策を講じる。白血球除去膜は白血球除去によるリスク低減に加え、プリオン蛋白そのものの除去が期待できる。しかしながら白血球除去膜によるプリオン蛋白除去については一部の製品を除き評価は定まっていない^{11, 12, 25)}。次に製造工程におけるリスク低減を行う。工程にはプリオン除去の堅牢性を確保するために、除去能力を示す複数の工程を導入する。この能力についてはガイドラインに従って評価する必要がある。ウイルスを対象とした評価においては数値目標が設定されているが、プリオンを対象とした評価では現時点で数値目標は設定されていない^{39, 40, 41)}。このことから、プリオンを対象とした評価において、目標とする数値の妥当性や必要とする安全係数についての更なる議論が必要であり、得られた数値（RLF）だけで安全性を判断するのは時期尚早である。むしろ、製造工程中にプリオン除去の機作が異なる工程を複数導入することによってセーフティーネットを構成する方が効果的であり、工程の堅牢性も高くなると考えられる。

血漿分画製剤やHb精製工程に導入可能と思われるデバイスは、採血時の白血球除去フィルター他に、ウイルス除去フィルター、デプスフィルター、荷電された除菌・清澄ろ過フィルター等があり、蛋白質の精製工程としては、エタノール分画、硫酸分画、ポリエチレングリコール分画、クロマトグラフィー等が考えられ、複数の工程対応は可能と考えられる。なお、目標とする除去係数やその妥当性を評価するために血液中の感染性プリオンの性状や感染価についての更なる研究が望まれる。

工程での除去能力はプリオンに対する安全性確保の根幹となるので慎重な試験デザインと解釈が求められる。基本的な手法はガイドライン^{11, 39, 40, 42)}に記述されているが、ガイドラインは策定時のMinimum requirementであって、指針のひとつにすぎない。よって、実際にはその製剤と製造工程の特性を良く理解した上でデザインしなければならない。工程のプリオン除去評価を行うにあたって、WBレベルで検出限界以下になったプリオン除去に関する重要工程については、動物への接種実験で感染性の有無を確認することが望ましい¹¹⁾。また、プリオン蛋白の実態が良く分かっていない以上、不十分な知識や誤解に基

づくデザインによる評価試験の結果解釈は誤った判断を導く可能性を秘めていることを明確に理解しておかなければならない。製剤の有効性と安全性は承認審査の時に評価されるが、有用性は科学技術の進歩により得られたプリオンに関する新しい知見に基づき、その時々には評価・確保されなければならないことも理解しておくべきである。

謝辞

本研究の一部は大阪大学微生物病研究所、酪農学園大学獣医学部、米国赤十字、ベネシスの共同研究として実施された。また、本研究の一部は厚生労働科学研究（H22-医薬-一般-006）として実施された。本稿を執筆するにあたって、榎ベネシス岡島文子氏、池田美朗氏の貢献に深謝します。これらの共同研究の成果が血液製剤領域のみならずバイオ医薬品領域の安全性向上に役立つことを願います。

引用文献

1. World Organization for Animal Health. Number of reported cases of bovine spongiform encephalopathy (BSE) in farmed cattle worldwide. http://www.oie.int/eng/info/en_esbmonde.htm (2010.12.22 downloaded)
2. 食品安全委員会。「牛海綿状脳症（BSE）と変異型クロイツフェルト・ヤコブ病（vCJD）」について。 http://www.fsc.go.jp/sonota/faq_bse-tori.html (2010.12.22 downloaded)
3. 農林水産省。BSE患者発生状況。 http://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/bse/b_kantiku/index.html (2010.12.22 downloaded)
4. The European Creutzfeldt Jakob Disease Surveillance Network. vCJD cases Worldwide. <http://www.eurocjd.ed.ac.uk/> (2010.12.22 downloaded)
5. Eurosurveillance editorial team. First case of vCJD reported in a Japanese patient. *Eurosurveillance*. 10 February 2005; 10(6). <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=2640> (2011.1.9 downloaded)
6. Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*. 1982; 216: 136-44.
7. Robakis NK, Devine-Gage EA, Jenkins EC, Kascsak RJ, Brown WT, Krawczun MS, Silverman WP. Localization of a human gene homologous to the PrP gene on the p ARM of chromosome 20 and detection of PrP-related antigens in normal human brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 140: 758-765.
8. Silveira JR, Raymond GR, Hughson AG, Race RE, Sim VL, Hayes SF, Caughey B. The most infectious prion protein particles. *Nature* 2005; 437: 257-261.
9. 厚生省薬務局審査課・薬務局医療機器開発課。ウシ由来物を用いた医薬品等に関する調査依頼について。薬審第165号平成8年3月27日。
10. 厚生省医薬安全課長。ウシ等由来物を原料として製造される医薬品等の品質及び安全性確保について。医薬発第1226号平成12年12月12日。
11. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), European Medical Agency. CHMP position statement on Creutzfeldt-Jakob disease and plasma-derived and urine-derived medicinal products. Draft EMEA/CPMP/BWP/2879/02/rev 2. 24 June 2010.
12. European Medical Agency. Concept Paper on the Need To Update the CHMP Position Statement on CJD and Plasma-Derived and Urine-Derived Medicinal Products. EMEA/CHMP/BWP/253246/2009. 23 July 2009. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003742.pdf (2011.1.8 downloaded)
13. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) and Committee for Advanced Therapies (CAT), European Medicines Agency. CHMP/CAT position statement on Creutzfeldt-Jakob disease and advanced therapy medicinal products. Draft, EMEA/CHMP/CAT/BWP/353632/2010. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/07/WC500095069.pdf (2010.12.24 downloaded)
14. 厚生労働省医薬局長。ウシ等由来物及び人由来物を原料として製造される医薬品、医療器具等の品質及び安全性確保の強化について。医薬発第0414005号平成15年4月14日
15. National Blood Service Scottish National Blood Transfusion Service Welsh Blood Service and Northern Ireland Blood Transfusion Service National CJD Surveillance Unit. TRANSFUSION MEDICINE EPIDEMIOLOGY REVIEW (TMER). <http://www.cjd.ed.ac.uk/TMER/TMER.htm> (2010.12.25 downloaded)
16. World Health Organization. Tables on Tissue Infectivity Distribution in Transmissible Spongiform Encephalopathies Updated 2010, WHO/EMP/QSM/2010.1. <http://www.who.int/bloodproducts/tablestissueinfectivity.pdf> (2010.12.25 downloaded)
17. Peden A, McCardle L, Head MW, Love S, Ward HJ, Cousens SN, Keeling DM, Millar CM, Hill FG, Ironside JW. Variant CJD infection in the spleen of a neurologically asymptomatic UK adult patient with haemophilia. *Haemophilia* 2010; 16: 296-304.
18. vCJD abnormal prion protein found in a patient with haemophilia at post mortem. Health Protection Agency. Press release, 17 February 2009. <http://www.hpa.org.uk/NewsCentre/NationalPressReleases/2009PressReleases/090217vCJDABNORMALPRIONPROTEINFOUNDINAPATIENTWITH> (2010.12.24 downloaded)
19. 21st Meeting of the Transmissible spongiform Encephalopathies Advisory Committee. June 12, 2009.

- <http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/Calendar/UCM164322.pdf>
20. A 2010 Update of the Draft Quantitative Risk Assessment of vCJD Risk Potentially Associated with the Use of Human Plasma-Derived Factor VIII Manufactured Under United States (US) License From Plasma Collected in the US. October 6, 2010. Center for Biologics Evaluation and Research US Food and Drug Administration. <http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/BloodVaccinesandOtherBiologics/TransmissibleSpongiformEncephalopathiesAdvisoryCommittee/UCM231018.pdf> (2010.12.24 downloaded)
 21. ヒト・プリオン病－感染症としての変遷と新たな課題. 萩原健一, 山河 芳夫, 花田 賢太郎. ウイルス. 2009; 59: 155-166
 22. 薬事・食品衛生審議会 平成21年度 第3回 血液事業部会運営委員会資料「変異型Creutzfeldt-Jakob病 (vCJD) の国内外の発生状況」. 山田正仁. <http://www.mhlw.go.jp/shingi/2009/12/dl/s1210-8n.pdf> (2010.12.25 downloaded)
 23. 薬事・食品衛生審議会 平成21年度 第3回 血液事業部会運営委員会資料「英国渡航に由来するvCJD感染リスクの評価と献血制限のあり方について」. 梯 正之. <http://www.mhlw.go.jp/shingi/2009/12/dl/s1210-8o.pdf> (downloaded 2010.12.25)
 24. Tattum MH, Jones S, Pal S, Khalili-Shirazi A, Collinge J, Jackson GS. A highly sensitive immunoassay for the detection of prion-infected material in whole human blood without the use of proteinase K. *Transfusion*. 2010; 50: 2619-2627.
 25. FDA. Informational Issue Summary, FDA's Currently-Recommended Policies to Reduce the Possible Risk of Transmission of Creutzfeldt-Jakob Disease (CJD) and Variant Creutzfeldt-Jakob Disease (vCJD) by Blood and Blood Products Transmissible Spongiform Encephalopathies Advisory Committee 22nd Meeting October 28-29, 2010. <http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/BloodVaccinesandOtherBiologics/TransmissibleSpongiformEncephalopathiesAdvisoryCommittee/UCM231179.pdf> (2010.12.25 downloaded)
 26. 日本赤十字社ホームページ. <http://www.jrc.or.jp/donation/refrain/detail/detail09.html> (2010.12.25 downloaded)
 27. Yunoki M, Urayama T, Ikuta K. Possible removal of prion agents from blood products during the manufacturing process. *Future Virol* 2006; 1: 659-674.
 28. 人工赤血球. *New Current*. 2006.9.1; 17: 2-10.
 29. 武岡真司. 分子集合科学を利用した人工血液の創世. *人工血液* 2005; 13: 136-147.
 30. Yunoki M, Tanaka H, Urayama T, Hattori S, Ohtani M, Narita Y, Kawabata Y, Miyatake Y, Nanjo A, Iwao E, Morita M, Wilson E, MacLean C and Ikuta K. Prion removal by nanofiltration under different experimental conditions. *Biologicals* 2008; 36: 27-36.
 31. Yunoki M, Tanaka H, Urayama T, Kanai Y, Nishida A, Yoshikawa M, Ohkubo Y, Kawabata Y, Hagiwara K, Ikuta K. Infectious prion protein in the filtrate even after 15nm filtration. *Biologicals*. 2010; 38: 311-313.
 32. Berardi VA, Cardone F, Valanzano A, Lu M, Pocchiari M. Preparation of soluble infectious samples from scrapie-infected brain: a new tool to study the clearance of transmissible spongiform encephalopathy agents during plasma fractionation. *Transfusion*. 2006; 46: 652-8.
 33. 柚木幹弘, 浦山健, 西田真直, 辻川宗男, 堀井肇, 西横秀雄, 上村八尋, 鍵谷昌男, 佐藤進一郎, 加藤俊明, 関口定美. Antithrombin-III製剤の製造工程のウイルスバリデーション試験. *医薬品研究*. 1999; 30: 331-341.
 34. Cervenakova L, Yakovleva O, McKenzie C, et al: Similar levels of infectivity in the blood of mice infected with humanderived vCJD and GSS strains of transmissible spongiform encephalopathy. *Transfusion* 2003; 43: 1687-1694.
 35. Lee D*, Lebing W, Stenland C, Petteway S. Methods of inactivation of transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) as applied to production chromatography processes. *DownStream* 27: 18-22. [http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/B1A81AC9A032FB48C1257628001CD8A9/\\$file/18113084.pdf](http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/B1A81AC9A032FB48C1257628001CD8A9/$file/18113084.pdf) (2011.1.9 downloaded)
 36. Akimov S, Yakovleva O, Vasilyeva I, McKenzie C, Cervenakova L. Persistent propagation of variant Creutzfeldt-Jakob disease agent in murine spleen stromal cell culture with features of mesenchymal stem cells. *J Virol*. 2008; 82: 10959-19562. Epub 2008 Aug 20.
 37. 久保 純, 大久保祐士, 中川 典子, 佐々木祐子, 柚木 幹弘, Larisa Cervenakova, 萩原 克郎, 生田 和良. vCJDを用いた血漿分画製剤の工程評価. 第58回日本ウイルス学会学術集会 (2010徳島)
 38. Shimian Z, Chyang TF, Lawrence B, Schonberger. *Transfusion transmission of human prion diseases. Transfusion Med Rev* 2008; 20: 58-69
 39. The European agency for the evaluation of medicinal products/committee for proprietary medical products (CPMP) biotechnology working party: 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.
 40. 厚生省医薬安全局長. 血漿分画製剤のウイルスに対する安全性確保に関するガイドラインについて. *医薬発*第1047号 1999.8.30