

る可能性が高い。製品をエンドトキシン試験に適用するために製剤から細胞を除去することが必要となる。エンドトキシン添加回収試験を行う必要がある場合に、エンドトキシンの細胞への吸着があり、細胞上清にスパイクする必要がある。細胞そのものが、エンドトキシンの測定を妨害する。またヒトに投与するために細胞を懸濁する液に細胞の安定化剤でエンドトキシンの測定を妨害するような場合がある。このためにエンドトキシンの測定では細胞懸濁液から遠心操作により細胞を除去し、上清のみを対象として測定されることになる。

この点に関連して、再生医療等製品では生きた細胞であることから製造後、短時間の間にヒトに投与される必要がある。例えばゲル化法であれば、前処置に加え、試験の判定に約3時間を要する。出来るだけ迅速な試験法が適用できることが望まれている。

また<4.01>では「カプトガニの血球成分より調製されたライセート試薬を用いる」とされている。カプトガニ血球成分は生体からの抽出物であるための不確定要素を解決するために改変したファクターCを用い試薬なども開発されているが、このような試薬を用いた試験では局方に適合していないことになる。

以上のような再生医療等製品の特性を考慮した場合に、局方への適合を厳密に求めることは合理的と言えない場合が多い。再生医療等製品の特性を考慮して、エンドトキシン試験を適用する場合の対応について考察してみた。

1. エンドトキシン標準品の使用；局方エンドトキシンのゲル化法、比濁法、比色法とも試験に際してエンドトキシン標準品を使用することを規定しているが、個別化製品の特性が強く、特に自己由来製品でロットを

構成せず1-数本の製品しか製造されない細胞製品では、製造そのものがテイラーメイドの製造であり、製品ごとにエンドトキシン標準品を使用することは合理的ではないと考えられる。

2. このために市販キットを用いてエンドトキシンを測定する場合には、キットに添付されているエンドトキシン標準試料を用いることも可能であろう。その前提としては、エンドトキシン標準品とキットに添付されているエンドトキシン標準試料が同等の値を示すことをあらかじめ評価しておくことが必要である。

3. 迅速試験キット<sup>(1,2)</sup>の開発も行われており、これらのキット製品ではいわゆる保存検量線が用いられている。保存検量線は1987年にFDAがガイダンス<sup>(3)</sup>で使用を認めていたものであらかじめ標準品の検量線が添付されたキット製品を認めるもので、試験に当たってエンドトキシン標準品の検量線を新たに作製する必要が無いものである。FDAは2011年にこの保存検量線を使用可能としたガイダンスを取り消している<sup>(4)</sup>。上記したように再生医療等製品はテイラーメイド製品として特徴を持ち、生産が対象患者単位で行われることを考慮するとエンドトキシン試験に際して局方標準品を用いず保存検量線を用いることも合理的であると考えられる。保存検量線がエンドトキシンと同等の値を示すことをあらかじめ評価しておくことが必要であろう。

4. 特殊な細胞組織加工医薬品を用いる場合  
1) 細胞組織加工製品では、細胞をコラーゲンや生分解性の医療材料等に懸濁、あるいは包埋して投与されることも多い。医療材料等との複合製品では通常

のエンドトキシン試験の実施が困難となる。細胞を包埋した材料を可溶化する操作を行うことも可能であるが、可溶化に用いる酵素等がエンドトキシンの測定を妨害することもあり、またその可溶化試薬からのエンドトキシンの汚染も考慮しなければならない。従ってこのような製品では、最終製品を製造する直前の細胞懸濁液と医療材料をべつべつに試験することも可能と考えられる。

- 2) 複合製品の場合には、エンドトキシン測定では2通りの方法が想定される。複合製品をエンドトキシンを含まない注射用水やあらかじめエンドトキシンが測定された塩溶液等に懸濁し、一定期間の間に溶液に抽出されるエンドトキシンを測定するという方法である。連続投与のエンドトキシンの安全域としては1時間当たりのkg体重当たりのエンドトキシン単位（静脈投与で5 EU/kg/時間）であることを考慮すれば一時間当たりの溶出量を測定することになる。このような抽出操作はヒトに投与した際に、一定期間内に体内に放出されるエンドトキシンを反映していることが求められる。
- 3) もう一つの測定法は、細胞懸濁液と混合する医療材料等を別々にエンドトキシンを測定し、最終製品のエンドトキシンの値を推定する方法である。

#### D. 考察

本年度は再生医療等製品のエンドトキシン試験の適用について検討を行った。再生医療等製品の特性である、テイラーメイドの個別化医

療製品である特徴を考慮すると公定書である局方への適用を厳格に求めるのは、合理性にかけると考えられる一面があること、特に自己由来製品でロットを構成しない少量の製品を製造する場合に大量の製剤を生産する医薬品での試験を実施することが困難である。

局方エンドトキシン試験では、事前に感度や被検液の妨害物質の有無について評価を予試験により実施しておくことが求められる。再生医療等製品は生きたい細胞がその本質であり、十分な安定性を担保するために様々な添加剤が用いられておりこれらがエンドトキシンの測定を妨害することも考えられる。そのためにもあらかじめ十分な評価が必要と考えられる。一方個別の試験の実施に際しては、有効成分が生きた細胞のために製剤化後、速やかに被験者に投与されなければならない。従って迅速な測定系が望まれている。また、個々の試験でエンドトキシン標準品を用いた定量を行うことが求められているが、一度に1製品しか製造されない再生医療等製品でエンドトキシン標準品を常に使用することは試験の性格からも合理的であるとは考えられない。多くのエンドトキシン試験ではキット化された市販製品が用いられているが、添付されているエンドトキシン標準試薬によりエンドトキシン標準品を代替することが合理的な場合が多いと考えられる。もちろんこのためには、エンドトキシン標準品とエンドトキシン標準試薬との相関性が用いる機器の性能を含めて評価されていることが前提となる。

また、場合によっては内部検量線法を用いることも有用であろう。内部検量線を用いることは局方では認められていないが、FDAの旧ガイドラインではその使用が認められており、一定の評価が可能と考えられる。このようなキッ

トを使用することにより迅速にエンドトキシンの測定が可能であれば再生医療等製品の特性に合致しているともいえる。もちろんそのためにはあらかじめ内部検量線法との相関性が評価されている必要がある。

再生医療等製品では医療材料との併用、場合によっては医療材料に埋め込んだ形でのヒトへの投与が行われる。このような場合、必ずしも最終製品ではなくその直前の細胞と医療材料を個別に試験することも合理的な場合があると考えられる。すなわち、再生肥料等製品の特性を考慮し、ケースバイケースの判断を行うべきと考えられる。

## E. 結論

再生医療等製品の安全性に関わるエンドトキシン試験の要件について検討を行った。1) 局方エンドトキシン試験で求められるエンドトキシン標準品を個別製品ごとに使用することは必ずしも合理的とはいえない。

2) エンドトキシン内部標準線法を用いることも可能と考えられる。

3) 1)及び 2)の前提としてあらかじめエンドトキシン標準品との相関性が確認されていることが必要。

4) 特殊な再生医療等製品のエンドトキシン試験においては、個別製品の特性を考慮しケースバイケースで試験要件を考えることが有用と巻がえらる。

## <参考文献>

- (1) Gee AP, Sumstad D, Stanson J, Watson P, Proctor J, Kadidlo D, Koch E, Sprague J, Wood D, Styers D, McKenna D, Gallelli J, Griffin D, Read EJ, Parish B, Lindblad R.: A multicenter comparison study

between the Endosafe PTS rapid-release testing system and traditional methods for detecting endotoxin in cell-therapy products. *Cytherapy*. 10, 427-435. (2008)

- (2) Sarno, MU. Sidow, SJ. Stephen W. Looney, SW. Lindsey, KW. Tay, FR.: Canal and Isthmus Debridement Efficacy of the VPro EndoSafe Negative-pressure Irrigation Technique. *Journal of Endodontics* 38, 1631-1634 (2012)
- (3) Guideline on Validation of the Limulus Amebocyte Lysate Test as an End-product Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs, Biological Products, and Medical Devices, Food and Drug Adm (. 1987)
- (4) Questions and Answers on Current Good Manufactuirng Practices, Good Guidance Practices, Level 2 Guidance – Laboratory Controls.  
<http://www.fda.gov/Drugs/Guidance/ComplianceRegulatoryInformation/Guidance/ucml24785.htm>, 7/18/2011.

## <謝辞>

本研究でエンドトシキン試験について医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団の村井博士、中川博士の協力に対して謝意を表します。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

G-1 論文発表 (○は本科研費に直接関係する論

文)

- 1) K. Sakai-Kato, K. Nanjo, T. Yamaguchi, H. Okuda, and T. Kawanishi, High-performance liquid chromatography separation of monoclonal IgG2 isoforms on a column packed with nonporous particles. *Analytical Methods* 5, 5899-5902 (2013)
- 2) Itoh,S. Hiruta,Y., ashii,N., Fujita,N., Natsuga,T., Hattori,T., Bandoc,A., Sekimoto,Y., Miyata,K., Namekawa,H., Mabuchi,K., Sakai,T., Shimahashi,H., Kawai,K., Yoden,H., Koyama,S., Odgaard Herr,S., Natsuka,S., Yamaguchi,T., Kawasaki,N.: Determination of Galactosamine Impurities in Heparin Sodium using Fluorescent Labeling and Conventional High-Performance Liquid Chromatography. *Biologicals*, in press
- 3) Yamaguchi T, Kanayasu-Toyoda T, Uchida E:

**H-2** 実用新案登録 なし

Angiogenic Cell Therapy for Severe Ischemic Diseases. *Chem. Pharm. Bull.* 36, 176-181 (2013)

- 4) 内田恵理子, 古田美玲, 菊池裕, 窪崎敦隆, 遊佐精一, 宮原美知子, 佐々木裕子, 小原有弘, 大谷梓, 松山晃文, 大倉華雪, 山口照英:細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験のPCR法の見直しに関する研究. *医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス*, 印刷中

#### **G-2** 学会発表

- 1) Kishioka,Y, Sakurai,K, Yamaguchi,T.: Current Situation of Japanese Biosimilar Regulation. *APEC International Symposium Soul Korea*, (2013)

**H.** 知的財産権の出願・登録状況

**H-1** 特許取得 なし

**H-3** その他 なし

表 1. 国内で市販されている主なエンドトキシン測定試薬

ゲル化法 (試験管法)	比濁法 (キネティック法)	比色法	
		エンドポイント法	キネティック法
パイロテル ( 0.06EU/mL, ca.130min)	パイロテル-T (試験管法/プレート 法)	PYROCHROME (プレート法) エンドスペシー ES-50M (プレート法) エンドスペシー ES-50M (試験管法) トキシカラーLS-50M (プレート法)	PYROCHROME (プレート法) エンドスペシー ES-50M (プレート法) エンドスペシー ES-50M (試験管法) トキシカラーLS-50M (プレート法)
PYROGENT ( 0.06EU/mL, ca.130min)	PYROGENT-5000 (プレート法) (0.01 ～ 100EU)	QCL-1000 (試験管法/プレート 法) (0.1 ～ 1EU)	Kinetic-QCL (プレート法) (0.005 ～ 50EU)
リムルス ES-II (0.015 EU/mL) PYROSTAR ES-F (0.03 EU/mL) リムルス HS-J/F J/F (0.03 EU/mL) リムルス HS-T リムルス HS-J/F, J (0.03 EU/mL)	リムルス ES-II (試験管法) (0.015EU/ml) PYROSTAR ES-F (試験管法) (0.03EU/ml) リムルス HS-T (試験管法) (0.015EU/ml) リムルス HS-J/F, J (試験管法) (0.03EU/ml) リムルス ES-III (試験管法) (0.015EU/ml)		リムルスカラー (試験管法/プレート 法) Endchrome-K (試験管法/プレート 法)

1. ここであげたプレート法は全て複数の検体を同時に測定するものであり、個別化医療製品のように患者一人ひとりの測定を行うには適していない
2. 試験管法は単一検体を測定することの出来る場合と複数検体を同時に測定する試薬キットに分類される

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等イノベーションサイエンス総合研究事業）  
分担研究報告書

ウイルス等感染性因子安全性評価に関する研究（H24-医薬-指定-029）  
ー持続感染細胞クローンを用いた多様な異常型プリオンの検出・評価系の確立ー

分担研究者 大阪大学微生物病研究所 教授 生田 和良  
研究協力者 大阪大学微生物病研究所 井上 雄嗣  
一般社団法人日本血液製剤機構 柚木 幹弘、坂井 薫、上平 崇、久保 純

平成 25 年度研究要旨：

マウス PrP<sup>o</sup> 強発現細胞（RK13mo1）を入手し、mo-vCJD 感染マウス脳材料（0.01%乳剤）をこの細胞に感染させたところ、感染後 1 週目の細胞からは PrP<sup>Res</sup> は検出されなかったが 5 週目で検出された。このことから、RK13mo1 細胞を用いた感染実験系は Western blotting (WB) より感度が高く、感染価測定系として確立できる可能性が示唆された。

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。これまでに、マウス馴化 vCJD (mo-vCJD) 株感染脳を対象とした WB 法を確立し、bSP-SC\_148 細胞株を用いた感染価測定法を検討したが、安定した系の確立には至っていない。本年度はマウス PrP<sup>o</sup> を強発現する RK13mo1 細胞株を用いて感染価測定法の確立を試みた。

B. 研究方法

(1) mo-vCJD 感染脳由来検体 (10%脳乳剤) の調製：

mo-vCJD 感染マウス脳と Parchi (100 mM NaCl、10 mM EDTA、0.5% Triton X-100、0.5% Sodium deoxycholate、10mM Tris、pH 7.4) を 10% (w/v) となるように混合し、21G 針付きシリンジでほぐした後、200 x g で 5 分間遠心した上清を 10% 脳乳剤とした。

(2) 細胞を用いた感染実験法：

RK13mo1 株を 10% ウシ血清を含む Opti-MEM GlutaMax 培地で培養した。プリオン接種時は培地に Doxycycline (Dox) を終濃度 1 µg/ml になるように添加して 96 well plate を用いて 7 日間培養した。次に、mo-vCJD 脳乳剤を含む培地 (Dox を含む) に交換して更に 1 週間培養した。PrP<sup>Res</sup> 検出のために細胞を回収する場合は well 中の細胞を PBS で 2 回洗浄した後、Parchi を用いて細胞を溶解し、WB に供した。残りの well は培地を同様に交換して培養を継続し、2 週間-5 週間目に上記同様に細胞溶解液を回収し、WB 法に供した。

(3) WB 法

細胞溶解液に Proteinase K (PK) を最終濃度 3 µg/ml になるように添加し、37°C で 30 分間消化した。AEBSF (4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride) を最終濃度 10 mM になるように添加して反応を停止し、1/3 量の 5 x Sample buffer (含 βME) を加えて 100°C で 3 分間処理した。さらに総量に対して 1/4 量の 8 M urea を混合した。これを Nu-PAGE 4-12% Bis-Tris ゲル (Invitrogen) を用いて電気泳動し、iBlot (Invitrogen) を用いてニトロセルロースメンブレンに転写した。メンブレンは 5% スキムミルクを含む TBS-T (0.1% Tween#20) で 1 時間ブロッキングし、抗体反応も同組成の溶液中でおこなった。一次抗体反応は 0.1 µg/ml の 6D11 抗 PrP 抗体 (Covance) で 12 時間、二次抗体反応は 0.25 µg/ml の HRP-conjugated anti-mouse Ig 抗体 (KPL) で 45 分間おこない、反応後に TBS-T を用いて 10 分間の洗浄をそれぞれ 3 回および 5 回おこなった。ブロッキングを含む一連の抗体反応は BenchPro4100 (Invitrogen) を用いて自動でおこなった。メンブレンを Super Signal Pico 発光基質 (Thermo) に浸し、5 分間振盪後、X 線フィルムに露光した。

倫理面への配慮。プリオン感染サンプルは大阪大学微生物病研究所バイオセイフティー委員会の規定（共同研究先での実施においてはその施設の委員会の規定）に従い取り扱った。動物実験は微生物病研究所動物委員会の規定（共同研究先での実施におい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

RK13mo1 培養細胞に Dox 添加後、マウス PrP

発現を追跡したところ、遅くとも発現誘導 2 日後には安定した発現量を示した (図 1)。Dox 添加 7 日後の RK13mo1 細胞について 6D11 抗体を用いた蛍光抗体法により染色したところ、細胞表面部分に染色が見られたことから、PrP は細胞表面に発現していることが確認された (図 2)。mo-vCJD 感染マウス脳乳剤の希釈サンプルを RK13mo1 細胞に接種し、1 週間ごとに細胞を回収して PrP<sup>res</sup> の検出を試みた。0.01%脳乳剤を感染させた典型例では 5 週目に初めて PrP<sup>res</sup> が検出された (図 3)。ただし、条件によっては 3 週目や 4 週目のみに散発的に検出されるという例も見られたため、安定な結果を得るべく実験系の最適化が必要である。

#### D. 考察

バイオ医薬品や血漿分画製剤の製造工程におけるプリオンの安全性評価に mo-vCJD が in vitro (WB), in vivo ともに利用可能であることをこれまでに報告した。プリオンの感染性評価は動物を用いて行うのが一般的であるが、この場合長期にわたる飼育が必要なため、安易に利用できない問題があった。感染性の評価を簡便にできるように本研究ではマウス PrP<sup>c</sup> を強発現するように改変した RK13mo1 細胞を用いて PrP<sup>res</sup> の増幅を試みたところ、この細胞は感染 5 週目より細胞内に WB 法で検出できるレベルの PrP<sup>res</sup> を有していた。この結果は研究用の PrP<sup>res</sup> 産生のみならず、感染価測定法に至適な細胞株になる可能性を示唆している。今後は感染価測定法としての実験条件の最適化を行い、動物を用いた感染実験及び WB 法との相関性を評価する予定である。

#### E. 結論

mo-vCJD 感染マウス脳サンプルを RK13mo1 株に感染させたところ、感染 5 週目から細胞中に PrP<sup>res</sup> が検出された。この細胞は効率よく PrP<sup>res</sup> を増幅し、研究用 PrP<sup>res</sup> 産生や感染価測定法に至適な細胞である可能性が強く示唆された。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表 (○は本科研費に直接関係する論文)

##### 1. 論文発表

- 1) Inoue Y, Kubota-Koketsu R, Ideno S, Nakamura H, Ono K, Okuno Y, Ikuta K: Induction of anti-influenza immunity by modified GFP

carrying hemagglutinin-derived epitope structure. *J. Biol. Chem.*, 288(7), pp. 4981-4990 (2013).

- 2) Yasugi M, Kubota-Koketsu R, Yamashita A, Kawashita N, Du A, Sasaki T, Nishimura M, Misaki R, Kuhara M, Boonsathorn N, Fujiyama K, Okuno Y, Nakaya T, Ikuta K: Human monoclonal antibodies broadly neutralizing against influenza B virus. *PLoS Pathogens*, 8(10), e77892 (2013).
- 3) Watanabe Y, Ibrahim M S, Ikuta K: Evolution and Control of H5N1. *EMBO Reports*, Feb;14(2):117-22 (2013).
- 4) Urayama T, Cameron R, Sato T, Yunoki M, Ikuta K: Misinterpretation in virus clearance studies of biological products due to an uncommon discrepancy between cytopathic effects and infectivity of human immunodeficiency virus (HIV). *Biologicals*, Mar;41(2):125-7 (2013).
- 5) Hirai I, Ebara M, Nakanishi S, Yamamoto C, Sasaki T, Ikuta K, Yamamoto Y: Jurkat cell proliferation is suppressed by Chlamydia (Chlamydomphila) pneumonia infection accompanied with attenuation of phosphorylation at Thr389 of host cellular p70S6K. *Immunobiology*, Apr;218(4):527-32 (2013).
- 6) Tian Y S, Verathamjamras C, Kawashita N, Okamoto K, Yasunaga T, Ikuta K, Kameoka M, Takagi T: Discovery of novel low-molecular-weight HIV-1 inhibitors interacting with cyclophilin A using in silico screening and biological evaluations. *J. Mol. Model*, 19 (1), 465-475 (2013)
- 7) Li Y G, Siripanyaphinyo U, Tumkosit U, Noranate N, A-Nuegoonpipat A, Kurosu T, Ikuta K, Takeda N, Anantapreecha S: Chikungunya virus induces a more moderate cytopathic effect in mosquito cells than in mammalian cells. *Intervirology* 56 (1), 6-12 (2013)
- 8) ○加藤 (森) ゆうこ, 柚木 幹弘, 生田 和良, 萩原 克郎. 血液製剤の安全対策-プリオン除去の現状-. *モダンメディア* 2013: 59(9): 231-237.
- 9) 高橋一恵, 大久保祐士, 古木理恵, 服部眞次, 浦山健, 坂井薫, 柚木幹弘, 萩原克郎, 生田和良. 由来の異なる E 型肝炎ウイルスの熱感受性の違いについて. *血液事業* 2013: 36(3):679-685.
2. 学会発表
  1. Speaker: Mikihiro Yunoki. Co-authors: Katsuro Hagiwara, Kazuyoshi Ikuta. HEV Prevention,

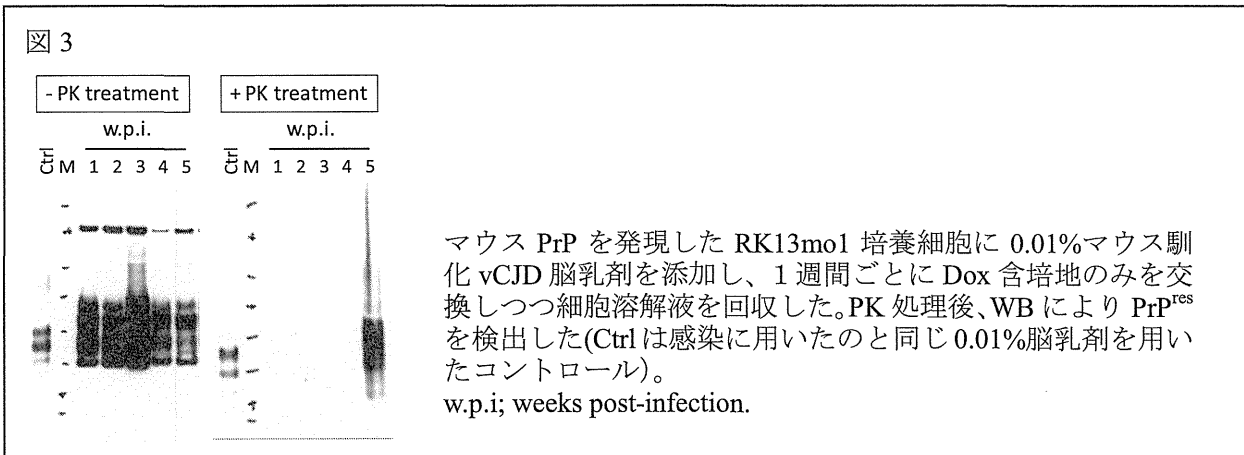
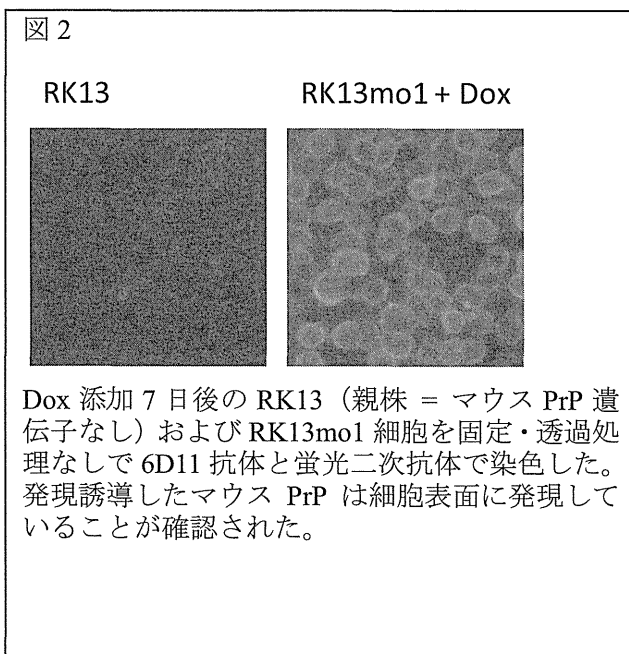
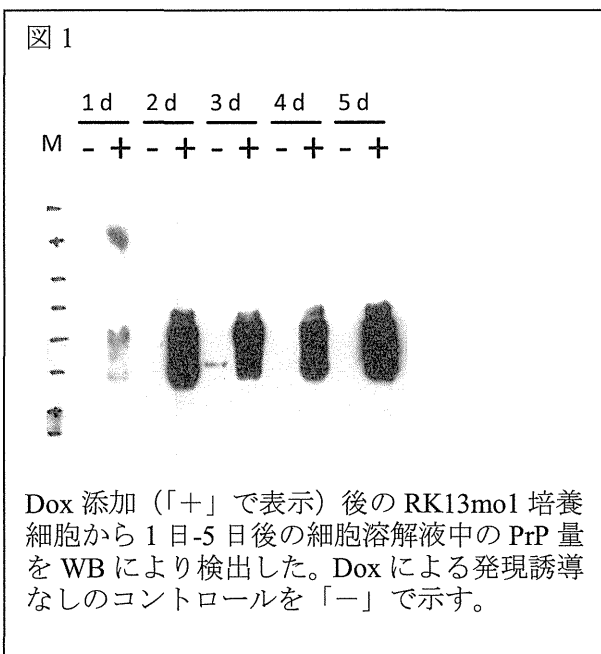
2. Speaker: Mikihiro Yunoki. Co-authors: Katsuro Hagiwara, Kazuyoshi Ikuta. Significant differences of properties between model viruses and target viruses (wild type) in HAV, HEV and B19 during manufacturing processes of plasma derivatives. Bioplasma World Asia 2013, 3-4 Sep 2013, Bali, Indonesia.
3. 小林不二夫、上園昭人、坂井薫、柚木幹弘、萩原克郎. グロブリン存在下におけるインフルエンザウイルス感染細胞の炎症性因子産生に対する影響. 第61回日本ウイルス学会総会 (2013年11月、神戸) .
4. 鈴木瑞穂、加藤 (森) ゆうこ、浅川満彦、柚木幹弘、生田和良、萩原克郎. NAT法の違いによる野外サンプルからのE型肝炎ウイルスの検出感度の違い. 第61回日本ウイ

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:

本研究の一部は一般社団法人日本血液製剤機構との共同研究として実施した。本研究に用いたvCJD株は米国赤十字社 Dr. Larisa Cervenakova より分与された。また、RK13mo1株は UMR INRA/ENVT 1225 Interactions Hôtes- Agents Pathogènes Pathologie du bétail の Dr. Didier ViletteE より分与された。





ウイルス等感染性因子安全性評価に関する研究（H24-医薬-指定-029）  
－異常型プリオンの *in vivo* 検出系の評価に関する研究－

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 酪農学園大学 獣医学群 加藤（森） ゆうこ  
一般社団法人日本血液製剤機構 柚木 幹弘  
一般社団法人日本血液製剤機構 坂井 薫  
一般社団法人日本血液製剤機構 久保 純  
一般社団法人日本血液製剤機構 上平 崇  
一般社団法人日本血液製剤機構 大久保 裕士

- ① マウス馴化型 vCJD 感染細胞より細胞抽出物、培養液の超遠心沈殿、培養上清の超遠心上清を TCA 沈殿させたプリオン材料を 4 週齢マウス（FVB/n mouse）に脳内接種したところ、TCA 沈殿以外の全ての接種マウス脳から異常型プリオンが検出され、脳組織には空胞変性が観察された。
- ② マウス馴化型 vCJD 感染細胞の培養液中にも感染性プリオンが存在し、超遠心沈殿画分に感染性プリオン蛋白が存在することが明らかになった。
- ③ これらの知見から、マウス馴化型 vCJD 持続感染細胞は罹患脳に代替する異常プリオン材料として応用可能であることが示唆された。

#### 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。これまでに、マウス馴化 vCJD（mo-vCJD）株感染脳及び vCJD 持続感染株（MV63）を用いた *in vivo* 評価手法について検討したが、今年度は MV63 より細胞抽出画分、培養液の超遠心沈殿、超遠心上清を TCA 沈殿させたプリオン材料（PrP<sup>res</sup>）をそれぞれ調製し、*in vivo* 感染実験を行った。

#### B. 研究方法

##### (1) 培養細胞からのプリオン材料調製法：

細胞は mo-vCJD の持続感染細胞 MV63 を用いた。また、対照細胞は正常 PrP を発現した bSP-SC<sub>148</sub> を用いた。細胞培養は 5%CO<sub>2</sub>、37°C 条件下、10% FBS/BLGM 培地（2 mM L-Glutamine, Antibiotic-antimycotic, 2-mercapto ethanol 含有 IMDM）にて約 1 週間 Confluent まで培養した。その後、2% FBS/BLGM 培地に置換して更に 2 週間培養した。培養液を遠心し、細胞画分と培養液に分離した。細胞画分は細胞破碎を目的とした凍結融解を 3 回繰り返し、超音波処理を行ったのち、PBS を用いて 5 x 10<sup>7</sup> cells/ml 相当（1% mo-vCJD 脳乳剤相当、前年度報告）となるように調整し、細胞抽出画分とした。

培養液は 0.22µm フィルターでろ過したのち、超遠心操作（150,000g 30 分）により上清画分と沈殿画分に分離した。沈殿画分は細胞抽出画分と同じ容積になるように PBS で懸濁した（培養液の超遠心沈殿）。上清画分は更に 5% TCA 沈殿及

びエタノール沈殿を行い、細胞抽出画分と同じ容積になるように PBS を用いて懸濁した（超遠心上清の TCA 沈殿）（図 1）。

##### (2) プリオン材料を用いた感染実験：

MV63 由来プリオン材料の感染性を確認するために、生後 4 週齢の FVB/n mouse に調製したプリオン材料（細胞抽出画分、培養液の超遠心沈殿、超遠心上清の TCA 沈殿）を脳内接種（30 µL/head）し、瀕死状態（Terminal ill、以下 TI）又は接種後 202 日をエンドポイントとして観察した。

脳サンプルは、TI 又はエンドポイントで採取し、採取した右脳から PrP<sup>res</sup> を WB 法で検出した。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、病理学的評価を実施した。

倫理面への配慮。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

(1) 感染実験に用いた MV63 由来プリオン材料及び調製途中の画分における総 PrP を WB 法で確認したところ、細胞抽出画分、超遠心沈殿画分、TCA 沈殿画分から PrP が検出された（表 1）。対象として実施した bSP-SC<sub>148</sub> 由来材料は細胞抽出画分、と TCA 沈殿画分から PrP が検出されたが、培地から PrP は検出されなかった。

(2) MV63 由来プリオン材料の感染性：

プリオン材料（細胞抽出画分、培養液の超遠心沈殿、超遠心上清の TCA 沈殿）を接種された群のうち、細胞抽出画分及び培養液の超遠心沈殿画分に PrPres が WB 解析により検出された。更に、病理学的観察の結果、空砲変性及び異常型プリオン蛋白の蓄積が認められた（表 2、図 2）。一方、超遠心上清の TCA 沈殿を接種された群では WB、空砲変性、異常型プリオン蛋白は検出されなかった。

#### D. 考察

バイオ医薬品や血漿分画製剤の製造工程におけるプリオンの安全性評価は感染した動物の脳から調製したマイクロソーム画分を使用するのが一般的である。これは高力価のプリオン材料を得るためには脳組織が最適な部位であることに由来する。一方、実際のバイオ製剤は培養細胞や血漿が出発原料であり、そこに混入する可能性のある性状を伴ったプリオン材料を用いるのが現実的である。今年度の実験より細胞由来のプリオン材料 (PrPres 持続産生細胞及びその培養上清) も脳由来材料と同様に感染性の異常プリオン蛋白を有していることが確認できた。このことは、マウス馴化型 vCJD 持続感染細胞は感染脳に代替するプリオン材料として使用できる可能性を示唆した。

#### E. 結論

マウス馴化型 vCJD 持続感染細胞は細胞抽出画分のみならず、培養液にも感染性プリオン蛋白が存在し、これらの材料は少なくとも定性的なバイオ医薬品の *in vivo* 工程評価に使用できることが分かった。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表 (○は本科研費に直接関係する論文) 論文発表

1. Higuchi H, Gondaira S, Iwano H, Hirose K, Nakajima K, Kawai K, Hagiwara K, Tamura Y, Nagahata H. Mycoplasma species isolated from intramammary infection of Japanese dairy cows. Vet Rec. 2013; 172(21): 557.
2. 加藤 (森) ゆうこ, 柚木 幹弘, 生田 和良, 萩原 克郎. 血液製剤の安全対策-プリオン除去の現状-. モダンメディア 2013; 59(9): 231-237.
3. 高橋一恵, 大久保祐士, 古木理恵, 服部眞次, 浦山健, 坂井薫, 柚木幹弘, 萩原克郎, 生田和良. 由来の異なる E 型肝炎ウイルスの熱感

受性の違いについて. 血液事業, 2013; 36(3): 679-685.

#### 学会発表

1. Speaker: Mikihiro Yunoki. Co-authors: Katsuro Hagiwara, Kazuyoshi Ikuta. HEV Prevention, Inactivation and Removal Strategies. Pathogen Clean Asia Summit 2013, 15-16 May 2013 Shanghai.
2. Speaker: Mikihiro Yunoki. Co-authors: Katsuro Hagiwara, Kazuyoshi Ikuta. Significant differences of properties between model viruses and target viruses (wild type) in HAV, HEV and B19 during manufacturing processes of plasma derivatives. Bioplasma World Asia 2013, 3-4 Sep 2013, Bali, Indonesia.
3. 小林不二夫, 上園昭人, 坂井薫, 柚木幹弘, 萩原克郎. グロブリン存在下におけるインフルエンザウイルス感染細胞の炎症性因子産生に対する影響. 第 61 回日本ウイルス学会総会 (2013 年 11 月, 神戸).
4. 鈴木瑞穂, 加藤 (森) ゆうこ, 浅川満彦, 柚木幹弘, 生田和良, 萩原克郎. NAT 法の違いによる野外サンプルからの E 型肝炎ウイルスの検出感度の違い. 第 61 回日本ウイルス学会総会 (2013 年 11 月, 神戸).

#### 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:

本研究の細胞培養に関する一部の研究は一般社団法人日本血液製剤機構との共同研究として実施した。本研究に用いた細胞株 (MV63 及び bSP-SC\_148) は米国赤十字社 Dr. Larisa Cervenakova より分与された。

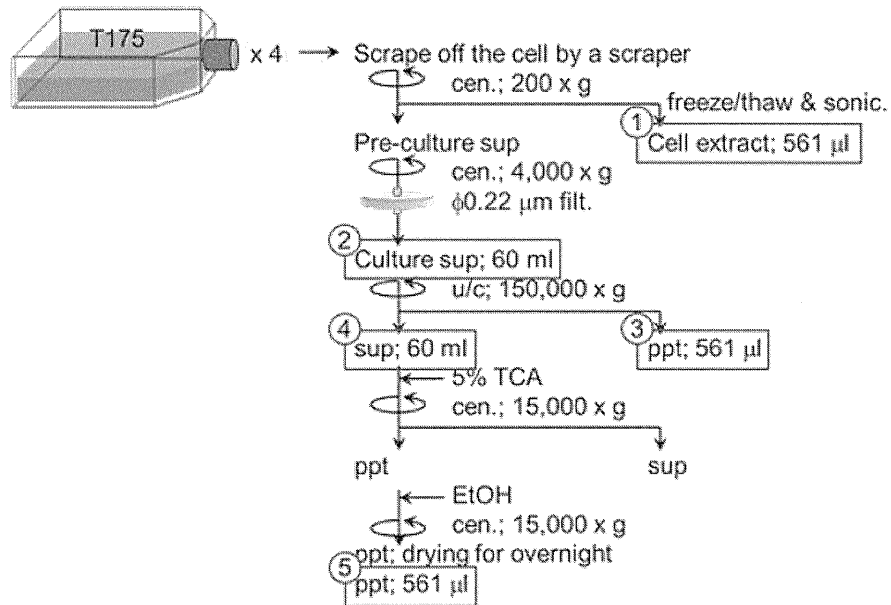


図1. プリオン材料調製方法フロー

mo-vCJD の持続感染細胞 MV63 より、細胞抽出画分①、培養液の超遠心沈殿画分③、超遠心上清画分の TCA 沈殿⑤（プリオン材料）の調製方法。それぞれの画分は 1%脳乳剤 1 mL に相当する細胞数である  $5 \times 10^7$  cell/ml（検体量として 561 $\mu\text{l}$ ）に調製した。

表 1 調製した細胞及び培養液上清画分と PrP の検出

Source		Sample	PrP by WB
bSP-SC_148 (PrP <sup>c</sup> production cells)	1	Cell extract	+
	2	Culture sup	Not detected
	3	Ultra centrifuged sup (u/c-p)	Not detected
	4	Ultra centrifuged ppt (u/c-s)	Not detected
	5	TCA treated u/c-s (u/c-s TCA)	+
MV63 (PrP <sup>Res</sup> production cells)	1	Cell extract	+
	2	Culture sup	Not detected
	3	u/c-p	+
	4	u/c-s	Not detected
	5	u/c-s TCA	+
Medium (Mock treat)	1	Cell extract (proper)	Not detected
	2	Culture sup (proper)	Not detected
	3	u/c-p (proper)	Not detected
	4	u/c-s (proper)	Not detected
	5	u/c-s TCA (proper)	Not detected

表 2. mo-vCJD の持続感染細胞 MV63 より調製した細胞抽出画分 (cell extract)、培養液の超遠心沈殿画分 (u/c-p)、超遠心上清画分の TCA 沈殿 (u/c-s-TCA) を感染させた動物の所見

	動物番号	観察期間 (dpi)	HE 染色所見	免疫染色所見	脳検体 WB PrP <sup>Res</sup> 検出
Cell extract	1-1	202	+	+	+
	1-2	202	+	+	+
	1-3	175	+	+	+
	1-4	181	+	+	+
	1-5	202	+	+	+
	1-6	181	+	+	+
	1-7	195	+	+	+
	1-8	195	+	+	+
	1-9	180	+	+	+
	1-10	195	+	+	+
u/c-p	2-1	202	+	+	+
	2-2	202	+	+	+
	2-3	202	+	+	+
	2-4	202	+	+	+
	2-5	202	+	+	+
	2-6	202	+	+	+
	2-7	202	+	+	+
	2-8	202	+	+	+
	2-9	202	+	+	+
	10	202	+	+	+
u/c-s-TCA	3-1	202	-	-	-
	3-2	202	-	-	-
	3-3	124	-	-	-
	3-4	202	-	-	-
	3-5	202	-	-	-
	3-6	202	-	-	-
	3-7	124	-	-	-
	3-8	202	-	-	-
	3-9	153	-	-	-
	3-10	153	-	-	-
	3-11	202	-	-	-

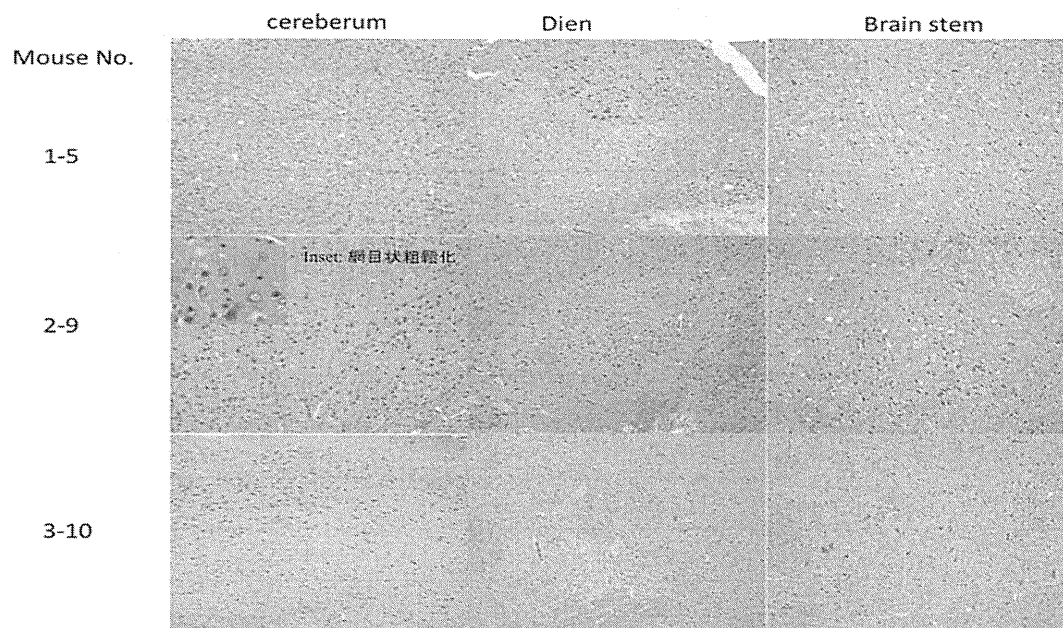


図2. プリオン感染マウス脳の HE 染色像及び免疫染色像

神経脱落、空胞変性及びグリア増生は、cell extract 投与群で強陽性に観察され、培養上清超遠心沈殿 (u/c-p)接種マウスにおいては脳幹部における空胞変性と大脳部での神経網粗鬆化(変性) が特徴的であった。

培養上清超遠心後の上清を TCA 沈殿させた画分では、脳組織に以上は確認されず WB 法においても PrP<sup>res</sup> は検出されなかった。

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25年度分担研究報告書  
ウイルス等感染性因子安全性評価に関する研究  
-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<sup>Sc</sup>)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<sup>Sc</sup>を認識する抗体の作製を行った。

ヒトPrPのN端側43残基のセリン(S43)がPrP<sup>Sc</sup>形成の初期段階にリン酸化S43 (pS43)に変化する知見から、pS43を含む周辺のアミノ酸配列を認識する抗体産生ハイブリドーマを樹立した。調製したマウスモノクローナル抗体pSP279を用いてイムノブロット法を行うと、ヒト膠芽腫細胞株T98Gの総細胞抽出液に二量体の正常型プリオン蛋白質(PrP<sup>C</sup>)に相当するバンドを示したが、単量体のPrP<sup>C</sup>は認識しなかった。PrP欠損マウス脳由来細胞株HpL3-4にレトロウイルスベクターでヒトPrP遺伝子を導入して樹立したヒトPrPを安定的に産生する細胞株を用いたイムノブロット法でも、T98G細胞と同様に、pSP279抗体は二量体のPrPを認識することを確認した。プリオン病発症の初期段階には可溶性のPrPオリゴマーが形成されると推定されており、今回得られたpSP279に関する知見は、感染初期でのPrP<sup>Sc</sup>検出法確立への寄与が期待される。

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に変異のない弧発性CJDが知られ、約85-90%を弧発性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、従来の弧発性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<sup>Sc</sup>)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<sup>Sc</sup>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<sup>Sc</sup>汚染を防ぐために、ウシ由来原材料中のPrP<sup>Sc</sup>測定法の確立が望まれている。

本研究は PrP<sup>Sc</sup> 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。正常プリオン蛋白質(PrP<sup>C</sup>)ではなく、スクレイピー(Obihiro 株)を ICR マウスの脳内に投与して増幅された PrP<sup>Sc</sup> を抗原として特異的に認識する抗体の作製を行う。

最近、PrP<sup>Sc</sup>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<sup>C</sup>のN端側43残基のセリン(S43)をリン酸化すると、PrP<sup>Sc</sup>への立体構造変化が促進されることが報告された(Giannopoulos, P.N. *et al.*, 2009, *J. Neurosci.* **29**, 8743-8751)。PrP<sup>Sc</sup>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。

これらの知見をもとに、ヒトPrPのN端側43残基Serがリン酸化されたプリオンペプチドを架橋剤SPDPを用いて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を調製し、免疫したマウス(BALB/c)から調製した脾細胞を用いて細胞融合を行い、リン酸化プリオンペプチドを特異的に認識するモノクローナル抗体(mAb)産生ハイブリドーマを樹立した。昨年度に行ったイムノブロット法による解析では、得られた3種類のmAbは予想に反してPrP<sup>C</sup>を強く認識し、PrP<sup>Sc</sup>に対する反応性は低かった。

本年度はPrPを産生する培養細胞を用いて、PrPに対する抗体の特異性を比較した。

B. 研究方法

1. 抗リン酸化セリンプリオン蛋白質抗体

昨年度の研究で樹立したプリオン蛋白質の43残基リン酸化セリン(pS43)を認識する抗体を産生するハイブリドーマをBALB/cマウスに移植して得られた腹水を精製したIgG画分を用いた。ウサギ抗リン酸化PrPポリクローナル抗体は、ECM Biosciences社から購入したものをを用いた。

2. ヒトPrP産生細胞株

ヒト膠芽腫細胞株T98G (JCRB9041)をT75フラスコで長期間継代後、9-cm組織培養用シャーレで4日ごとに培地を交換しながら40日間培養し

た。

PrP欠損マウス脳由来細胞株HpL3-4は、東京大学東京大学大学院農学生命科学研究科食の安全センター 小野寺節教授より御供与して頂き、本研究に用いた。モロニーマウス白血病ウイルス(MoMuLV)由来のレトロウイルスベクターにヒトPrP (129V)遺伝子エクソン3のopen reading frame (ORF)を組み込み、当ベクターを導入したヒトHEK細胞由来パッケージング細胞Phenix-Eco (ATCC CRL-3214)の培養上清からウイルス粒子を調製し、プリオンノックアウトマウス (*prnp* <sup>-/-</sup>)脳から樹立された培養細胞株HpL3-4に感染させ、ヒトPrP産生細胞株を樹立した。

### 3. イムノブロット法

培養細胞からフォスファターゼ阻害剤存在下で総細胞抽出液を調製し、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)、ウサギ抗リン酸化PrPポリクローナル抗体又は抗p43S-hPrP (39-50)-BCIP抗体を、第2抗体にHRP標識抗IgG抗体を用いてイムノブロットングを行い、化学発光法で検出した。

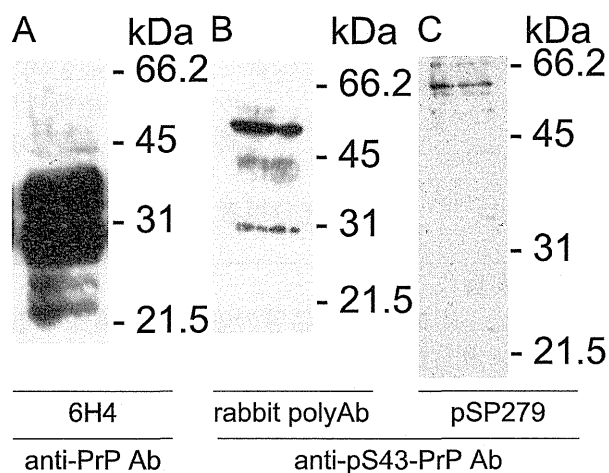
(倫理面への配慮)

本研究の遂行にあたり、「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。

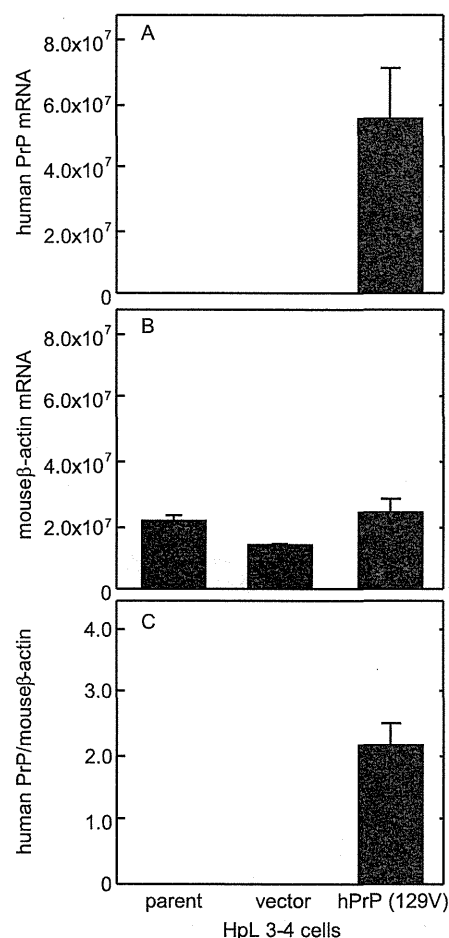
### C. 研究結果

先に樹立した3種類の抗pS43-hPrP (39-50)-Cys-BCIPモノクローナル抗体の中で、pS43-hPrPに対する特異性が最も高かったpSP279を用いて、培養細胞が産生するPrPの検出を行った。長期間継代培養したT98G細胞ではPrP産生量が増加し、イムノブロット法で抗PrP抗体6H4が認識するバンドを示した(Fig. 1A)。また、市販のウサギ抗リン酸化PrPポリクローナル抗体は、PrPの二量体と単量体に相当するバンドを示した(Fig. 1B)。一方、p43S-hPrPを認識するマウスmAb pSP279は、単量体を認識せず、二量体に相当するバンドのみに反応性を示した(Fig. 1C)。

次に、pSP279が認識するバンドの特異性を明らかにする目的で、T98G細胞のゲノムDNAからPrP遺伝子のORFを調製し、プリオンノックアウトマウス(*prnp* <sup>-/-</sup>)脳由来のPrP欠損細胞株HpL3-4にレトロウイルスベクターで導入し、ヒトPrPを安定的に産生する細胞株を構築した。樹立した細胞株から抽出したtotal RNAを用い、RT定量PCRでPrP遺伝子の発現解析を行った(Fig. 2)。親株のHpL3-4細胞、ベクターのみを導入した細胞及びhPrP遺伝子のORFを組換えたベクターを導入した細胞で、マウスβ-actin mRNAの

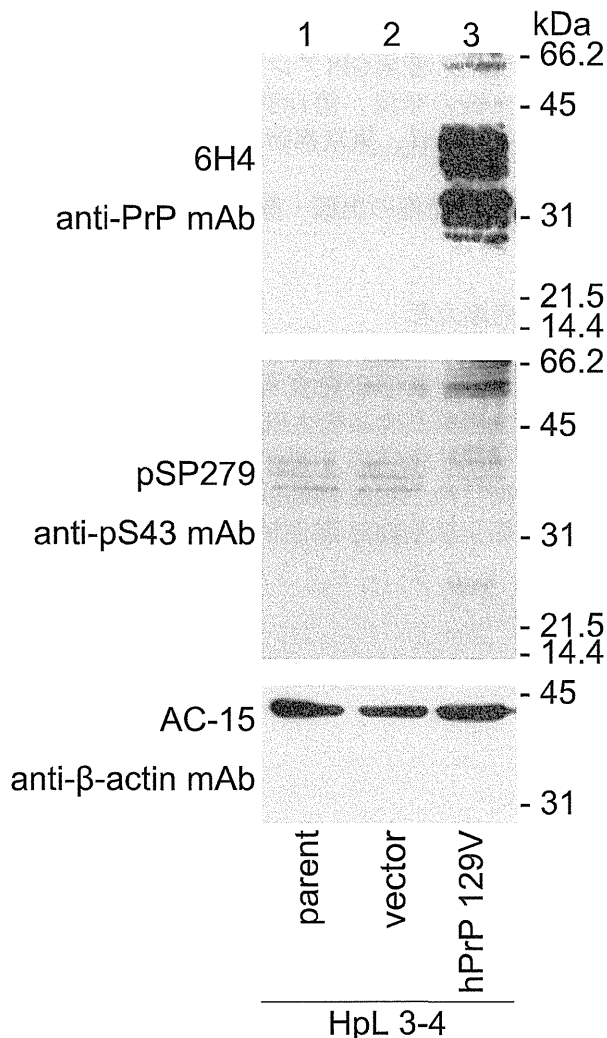


**Fig. 1. Immunoblot analysis of human PrP in T98G cells.** T98G cells were incubated with 10% FCS-RPMI 1640; whole-cell lysates were subjected to immunoblot with the anti-PrP mAb 6H4 (A), anti-pS43-PrP rabbit polyclonal Ab (B) or anti-pS43 PrP mAb pSP279 (C).



**Fig. 2. Quantification of human PrP mRNA in HpL3-4 cells.** HpL3-4 cells were incubated with 10% FCS-DMEM. The resulting total RNA (5 µg) were analyzed by real-time quantitative RT-PCR with human PrP primer set (A) and mouse β-actin primer set (B). Human PrP mRNA were shown as average relative expression values normalized to mouse β-actin mRNA (C).





**Fig. 3. Analysis of human PrP *Prnp*-deficient neuronal HpL3-4 cells.** Whole cell lysates from the parental HpL3-4 cells (lane 1), empty vector-transfected cells (lane 2), and vector coding for human PrP gene-transfected cells (lane 3) were subjected to immunoblotting with 6H4 mAb (A), pSP279 mAb or anti-mouse  $\beta$ -actin mAb (C).

発現を確認した(Fig. 2B)。一方、hPrP遺伝子のORFを組換えたベクターを導入した細胞ではhPrP mRNAの発現を確認したが、親株とベクターを導入した細胞では発現していなかった(Fig. 2A)。導入したhPrP mRNAの発現量は、ハウスキープ遺伝子 $\beta$ -actin mRNAの約2倍を示し(Fig. 2C)、安定的にhPrP遺伝子を高発現することを確認した。

樹立した細胞を用い、pSP279の反応性を調べた。それぞれの細胞を9-cm組織培養用シャーレで培養し、フォスファターゼ阻害剤存在下で総細胞抽出液を調製し、イムノブロット法を行った(Fig. 3)。抗 $\beta$ -actin抗体を用いたイムノブロット法で、親株のHpL3-4細胞、ベクターのみを導入した細胞及びhPrP遺伝子のORFを組換えたベクターを導入した細胞で、マウス $\beta$ -actinの産生を確認した(Fig. 3C, lanes 1-3)。抗PrP抗体の6H4

抗体を用いたイムノブロット法では、hPrP遺伝子のORFを組換えたベクターを導入した細胞のみでPrPの産生を確認した(Fig 3A, lane 1)。抗p43S-hPrP抗体pSP279を用いたイムノブロット法では、hPrP遺伝子導入細胞でPrPの二量体に相当するバンドを示した(Fig. 3B, lane 3)。

#### 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<sup>Sc</sup>の新規検出法の確立を目的とし、PrP<sup>Sc</sup>を特異的に認識する抗体の開発を行った。

PrP<sup>Sc</sup>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<sup>C</sup>のN端側43残基のSerをリン酸化すると、PrP<sup>Sc</sup>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Ser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、pS43を特異的に認識する抗体は、ウシ、ヒツジ、マウス等のPrP<sup>Sc</sup>を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、いまだリン酸化セリンを認識する有効な抗体は得られていない。本研究ではPrP<sup>Sc</sup>を特異的に認識する抗体の候補として、リン酸化プリオンペプチドを免疫して得られた抗体の解析を行った。

前年度の研究で樹立した3種類のmAb (pSP240、pSP279、pSP289)産生ハイブリドーマの中で、pS43-hPrPのリン酸基に対する特異性が最も高いpSP279を用いて解析を行った。pSP279はヒト膠芽腫細胞株T98Gが産生するPrP単量体を認識せず、二量体に相当するバンドのみに反応性を示した。一方、市販のウサギ抗リン酸化PrPポリクローナル抗体は、単量体と二量体のPrPを認識し、昨年度解析したmAb pSP289と同様な反応性だった。pSP289抗体はPrP<sup>C</sup>とPrP<sup>Sc</sup>の双方を認識したが、pSP279はPrP<sup>C</sup>に対する反応性が強く、明らかにウサギポリクローナル抗体と特異性が異なっている。

pSP279抗体はマウス脳由来PrP<sup>C</sup>とヒトT98G細胞が産生するPrP<sup>C</sup>に対して同様な反応性を示した。しかし、他の培養細胞では異なる可能性があることから、PrP欠損細胞株HpL3-4細胞にレトロウイルスベクターを用いてヒトPrP遺伝子を導入したPrP産生細胞株を構築し、反応性を確認した。PrP mRNA発現量は $\beta$ -actin mRNAより高く、安定的にヒトPrP mRNAを高発現する細胞株が樹立できた。T98G細胞の産生するPrPと同様に、pSP279は単量体PrPには反応せず、二量体PrPを認識した。

アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患では、発症初期段階でアミロイドβやα-シヌクレインの可溶性オリゴマーの形成されることから、それらの発症と関連が注目されている。プリオン病も、PrP<sup>Sc</sup>感染初期にはPrP<sup>C</sup>がオリゴマーを形成し、次いでPrP<sup>Sc</sup>に変化すると推定されており、PrPオリゴマーを認識するmAbの作製が積極的に試みられている(Tayebi, M. *et al.*, 2011, *Plos One* **6**, e19998)。ウサギポリクローナル抗体を用いた研究で、PrP<sup>Sc</sup>感染脳では正常脳に比較してpS43が多いと報告されている(Giannopoulos, P.N. *et al.*, 2009, *J. Neurosci.* **29**, 8743-8751)。PrPのN端側43残基のSerリン酸化とオリゴマー形成の関連は不明だが、pSP279抗体は二量体PrPを特異的に認識することから、プリオン病発症初期段階でPrPの動態を調べる研究への利用が期待できる。

今年度は培養細胞が産生するPrPを用い、イムノブロット法でリン酸化プリオンペプチドに対する抗体の特異性を調べた。今後は、これらの抗体と樹立したヒトPrP安定発現細胞株を用い、より効率的なプリオン病検出法の確立を試みる。

#### E. 結論

本研究はPrP<sup>Sc</sup>の新規検出法確立に資する基礎研究として、新たに樹立したヒトPrPを安定的に産生する培養細胞を用いて、ヒトPrPのN端側43残基のリン酸化Serを認識する抗体の特異性を解析した。pSP279抗体は単量体PrPを認識せず、二量体PrPに高い特異性を示した。これらの結果は、新たなPrP<sup>Sc</sup>バイオアッセイ系として、PrPオリゴマー検出系の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

1. Yutaka Kikuchi, Takahiro Ohnishi, Hiroko Furusawa, Takao Kawai, Yutaka Fukuda, Hiroshi Yokoyama, Yoshiko Sugita-Konishi: ELISA Detection of *Kudoa septempunctata* in Raw *Paralichthys olivaceus* (Olive Flounder) using a Chicken Anti-*Kudoa* Antiserum. 2013, *Biocontrol Science* **18**, 193-197.
2. Takahiro Ohnishi, Yutaka Kikuchi, Hiroko Furusawa, Yoichi Kamata, Yoshiko Sugita-Konishi: *Kudoa septempunctata* Invasion Increases the Permeability of Human Intestinal Epithelial Monolayer. 2013, *Foodborne Pathog. Dis.* **10**: 137-142.

##### 2. 学会発表

1. 菊池裕、豊田淑江、遊佐精一、窪崎敦隆、

山口照英：低酸素条件下で誘導されるスプライス変異GPIアンカー欠損型プリオン蛋白質の発現、第1回低酸素研究会、平成25年7月6日、東京都新宿区

#### 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 窪崎敦隆  
衛生微生物部 遊佐精一

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25年度分担研究報告書  
ウイルス等感染性因子安全性評価に関する研究  
無菌試験法の研究－細胞・組織加工製品における無菌試験法の在り方について－

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

再生医療等製品は、製造可能な最終調製品の量に限りがあり、出荷時に適用される無菌試験法に用いることができる検体量が少ない。また、製造から使用までの期間が短いことから、結果判定まで長期間を要する無菌試験法の適用に支障を来している。本研究は、再生医療等製品の安全性の確保のために出荷判定試験として適用される、現実的に実施可能な無菌試験法について検討した。

日本薬局方、欧州薬局方及び米国薬局方には三薬局方調和合意に基づき規定した無菌試験法があり、ロットを構成する一般的な医薬品の出荷時判定に用いられている。欧米薬局方にはロットを構成しない細胞由来製品に対する無菌試験法も収載されているが、日本薬局方にはない。加えて、欧米薬局方では細胞由来製品の無菌試験法に微生物の迅速検出技術の適用を認め、代替微生物試験法も収載されている。一方で日本薬局方には、蛍光染色による細菌数の迅速測定法及びPCR法を利用した試験法が参考情報に収載されている。日本で行う再生医療等製品の無菌試験には、蛍光染色による細菌数の迅速測定法と、バリデーションを実施した上で核酸増幅検査の適用が考えられることから、以下に無菌試験への適用に必要な諸条件を考察した。また、微生物の迅速検出技術の進歩は速く、今後、科学的根拠が明確なものについては、このような新手法の利用も期待されることから、採用にあたっての留意点について考察した。

### A. 研究目的

平成25年11月27日に改正薬事法が公布され、薬事法は題名を「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律」に改称し、再生医療の実用化に対応できるように改正された（官報、平成25年11月27日、号外第255号）。併せて、「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」も公布された（官報、平成25年11月27日、号外第255号）。この法律の枠組みの対象には、幹細胞を使用する、幹細胞以外の細胞を加工して使用するおよび組織を加工して使用する医療が含まれている。これらの医療に用いられる再生医療等製品は、製造可能な最終調製品の量に限りがあり、出荷時に適用される無菌試験法に用いることができる検体量が少ない。また、製造から使用までの期間が短いことから、結果判定まで長期間を要する無菌試験法の適用に支障を来している。本研究は、再生医療等製品の安全性の確保のために、出荷判定試験として適用される、現実的に実施可能な無菌試験法について検討する。

### B. 研究方法

#### 1. 菌株

第十六改正日本薬局方 一般試験法 無菌試験法<sup>1)</sup>表 4.06-1 培地性能試験及び手法の適合性試験に適している試験用菌株に収載された *Staphylococcus aureus* NBRC 13276、*Bacillus subtilis* NBRC 3134、*Pseudomonas aeruginosa* NBRC 13275、*Clostridium sporogenes* NBRC

14293、*Candida albicans* NBRC 1594 及び *Aspergillus brasiliensis* NBRC 9455 を含む 13 菌株を選択し（Table 1）、独立行政法人製品評価技術基盤機構 NBRC（Biological Resource Center、NITE）から購入して PCR 試験用菌株とした。

#### 2. 鋳型 DNA の調製

鋳型 DNA の調製は、日局 16 参考情報 遺伝子解析による微生物の迅速同定法<sup>2)</sup>に準じて行った。液体培地で培養した細菌又は真菌を遠心分離後、菌体を 10 倍容量の滅菌精製水に懸濁して熱処理（96°C、5 分間）し、遠心分離して得た上清を測定用テンプレートとした。

#### 3. PCR

PCR は、日局 16 参考情報 遺伝子解析による微生物の迅速同定法<sup>2)</sup>に準じて行った。用いたプライマーを Table 2 に示した。PCR 反応液に加熱処理した菌液の DNA 抽出物を加え、細菌の場合は 10F/1500R、10F/800R、800F/1500R 又は 525F/800R プライマーセットを、真菌の場合は ITS5F/D2R プライマーセットを添加して以下の条件で PCR を行った。細菌は 94°C、30 秒→55°C、60 秒→72°C、60 秒の反応を 30 サイクル、それぞれ約 1500bp、800bp、700bp 又は 250bp の DNA 断片が増幅生成した。真菌は 94°C、30 秒→52°C、40 秒→72°C、70 秒の反応を 35 サイクル、1200bp の DNA 断片が増幅生成した。反応終了後の PCR 液 5µL を 1µL のローディング緩衝液と混合し、アガロースゲルのウェルに添加し、1 倍 TAE 緩衝液を用いて電気泳動する。泳動後、トランスイルミネーター

Table 1. PCR 試験用菌株

No.	菌種	株
細菌		
1	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	NBRC 100797
2	<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i>	NBRC 102204
3	<i>Kocuria rhizophila</i>	NBRC 12708
4	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	NBRC 12993
5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NBRC 13275*
6	<i>Staphylococcus aureus</i>	NBRC 13276*
7	<i>Proteus mirabilis</i>	NBRC 13300
8	<i>Clostridium sporogenes</i>	NBRC 14293*
9	<i>Bacillus subtilis</i>	NBRC 3134*
10	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NBRC 3512
11	<i>Escherichia coli</i>	NBRC 3972
真菌		
12	<i>Candida albicans</i>	NBRC 1594*
13	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	NBRC 9455*

\*日局 16 一般試験法 無菌試験法<sup>1)</sup>表 4.06-1 収載菌株

Table 2. PCR 試験用プライマー

微生物	プライマー	塩基配列
細菌	10F <sup>2)</sup> *	5'-GTTTGATCCTGGCTCA-3'
	525F <sup>3)</sup>	5'-GTGCCAGCAGCCGCGGTA-3'
	800F <sup>2)</sup> *	5'-GGATTAGATACCCTGGTA-3'
	800R <sup>2)</sup> *	5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3'
	1500R <sup>2)</sup> *	5'-TACCTTGTACGACTT-3'
真菌	ITS5F <sup>4)</sup>	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'
	D2R <sup>5)</sup>	5'-TTGGTCCGTGTTTCAAGACG-3'

\*日局 16 参考情報 遺伝子解析による微生物の迅速同定法<sup>2)</sup>収載プライマー

で観察した。

(倫理面への配慮)

本研究の遂行にあたり、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「国立医薬品食品衛生研究所研究倫理審査委員会規定」及び「同病原体等安全管理規程」を遵守した。

## C. 研究結果

### 1. 無菌試験法

無菌試験は、検体又は試料を規定の方法で処理し培養することによって、培地で増殖する検体又は試料に由来する微生物の有無を確認する試験である。日局 16 一般試験法は医薬品の出荷判定試験として遵守すべき試験法で、無菌試験法<sup>1)</sup>は無菌であることが求められている原薬又は製造に適用される。日局 16 の無菌試験法は、液状チオグリコール酸培地及びソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地を用いて、検体又は試料をメンブランフィルター法又は直接法によって 14 日間以上培養し、肉眼的な微生物の増殖があるかどうかを調べると規定されている。また、本試験法は一定以上の製造量があつてロットを構成する一般的な医薬品やバイオテクノロジー応用医薬品に適用されることから、容器の容量に応じた最小試料採取量と

ロット当たりの製造個数に応じた最小供試個数が規定されている。

### 2. 再生医療等製品に対する無菌試験法

細胞・組織加工製品などの再生医療等製品は、一般に製造から使用までの期間が短いことから、試料又は検体を 14 日間以上培養する無菌試験法を適用することは難しい。欧州薬局方 (European Pharmacopoeia, EP) では一般的な医薬品を対象とした無菌試験法とは別に、細胞由来製品の微生物管理が規定され (EP Chapter 2.6.27, Microbiological control of cellular products.)<sup>6)</sup>、自動化された検出法では 7 日間の培養を、肉眼での確認には 14 日間の培養を必要としている。しかし、細胞由来製品は製造から 2 日以内に出荷することが多いことから、緊急の改定が要望されて現在改定作業が進んでいる (Emmanuelle Charton、私信)。FDA は、細胞由来製品は保管期間が短いことから、従来の無菌試験法 (21 CFR 610.12 Sterility)<sup>7)</sup>より迅速な無菌試験法を開発し、それらの検証が必要と発出している<sup>8)</sup>。

一方、日局には細胞由来製品に特化した微生物管理試験はないことから、再生医療等製品の出荷判定には、一般的な医薬品やバイオテクノロジー応用医薬品と同じく、無菌試験法が科せ