

表 3. A. PMCA 法による異常プリオンの検出系としてヒツジ ARQ プリオンに有用性 1)

異常プリオンの由来種	マウス	ヒト M129	ウシ	ヒツジ VRQ	ヒツジ ARQ
BSE 感染ブタ	+/-	+	+	++++	++++
BSE 感染ヒツジ	+	+/-	+/-	++++	++++
BSE 感染ウシ	+	-	++	++++	++++
vCJD 感染霊長類	+	-	+	+++	+++
vCJD 感染ヒト	+/-	++	+	++++	++++
対照	-	-	-	-	-

- Q171 遺伝子型ヒツジプリオンが PMCA 法による多種の異常プリオン検出に有効との結論
- 但し、Q171 遺伝子型であっても 154 や 158 番目の遺伝子型の違いによって抵抗性になる可能性

表 3. B

136	154	158	171	Successibility	
V	R		Q	+	2)
A	R		Q	+	
A	H		Q	-	
A	R		R	-	
A	R	P	Q	+	3)
A	R	L	Q	-	

1) Lacroux, C. et al. : PLoS Pathog. 10, e1004202 (2014)

2) Razaeei, H. et al. : J. Mol. Biol. 322, 799 (2002)

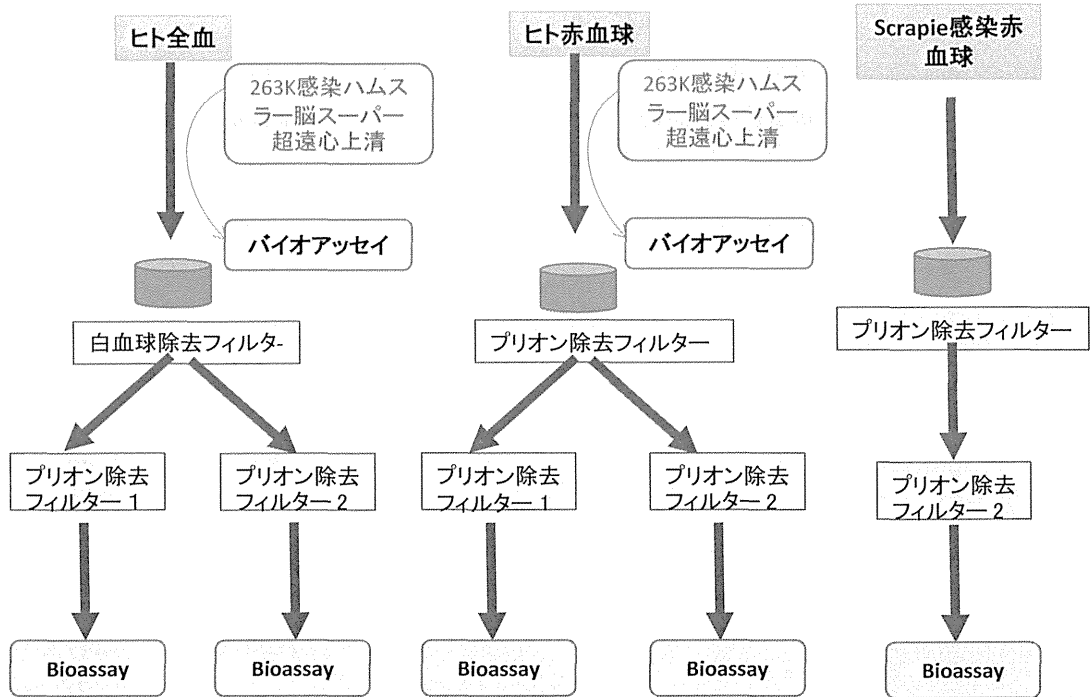
3) Goldmann, W. et al. : J. Gen. Virol. 87, 3741 (2006)

表 4. In vitro 細胞培養による PrPsc 増幅系

細胞名	細胞を分離した組織	細胞種	プリオン株
<b>1. 神経／脳由来細胞株</b>			
N2a	neuroblastoma cell line*	mouse	Chandler, RML, 139A, 22L, C506, Fukuoka-1, FU CJD
GT1	hypothalamic cell line	mouse	Chandler, RML, 139A, 22L, kCJD, FU CJD, M1000
SN56	cholinergic septal cell line	mouse	Chandler, ME7, 22L
HpL3-4	hippocampal PrP-deficient cell line, upon ectopic expression of moPrP*	mouse	22L
CF10	brain derived PrP-deficient cell line, upon ectopic expression of moPrP	mouse	22L
SMB	prion-infected brain cell	mouse	Chandler, 139A, 22F, 79A
CAD	catecholaminergic cell line	mouse	RML, 22L, 22F, 79A, 139A, ME7
MG20	microglial cell line overexpressing PrPC	tg20 mouse	Chandler, ME7, Obihiro, mouse-adapted BSE
PC12	pheochromocytoma cell line	rat	139A, ME7
HaB	brain-derived cell line	hamster	Sc237
SH-SY5Y	neuroblastoma cell line	human	sCJD brain material
MDB	primary brain cells, SV40 transformed	mule deer	CWD
<b>2. 神経／脳由来初代分離細胞</b>			
CGN	cerebellar granule neurons overexpressing ovine PrPC	tgov mouse	mo 127S
CAS	cerebellar astrocytes overexpressing ovine PrPC	tgov mouse	mo 127S
NSC	neural stem cells	mouse	22L, RML

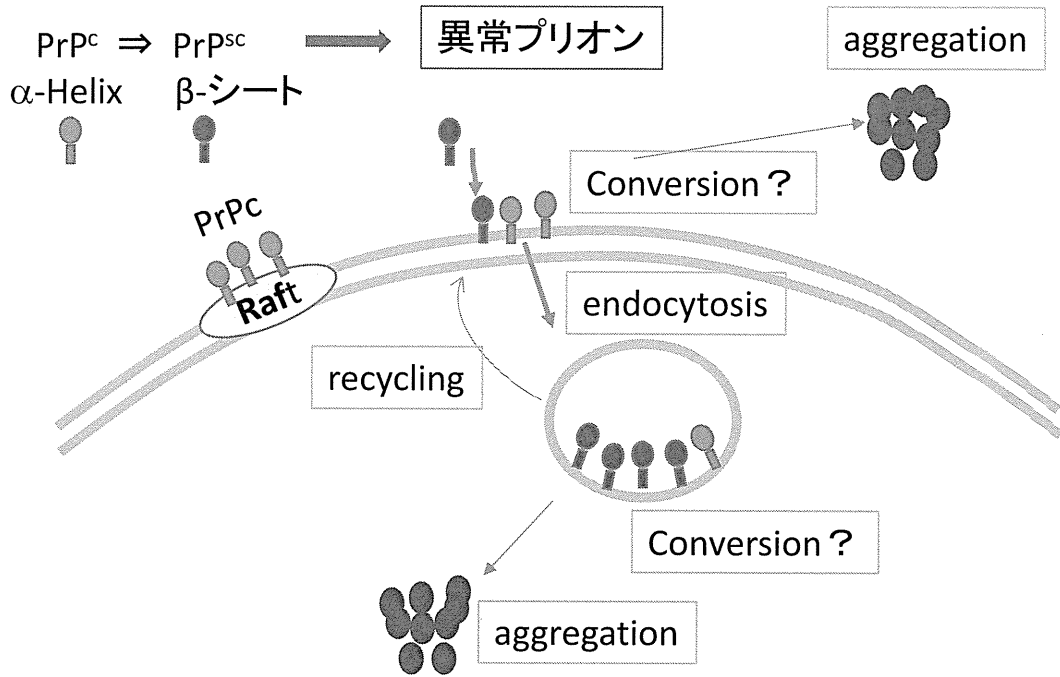
3. 非神経細胞株			
G2C12	skeletal myoblast cell line	mouse	22L
L fibroblasts	fibroblast cell line	mouse	ME7, Chandler
L929	fibroblast cell line	mouse	22L, RML, ME7
NIH/3T3	fibroblast cell line	mouse	22L
MSC-80	Schwann cell line	mouse	Chandler
MovS	Schwann cell-like from dorsal root ganglia	tgov mouse	PG127, SSBP/1, scrapie field isolates
moRK13	epithelial cell line expressing mouse PrPC	rabbit	Fukuoka-1, 22L, Chandler, M1000, mo sCJD
voRK13	epithelial cell line expressing vole PrPC	rabbit	vo BSE
ovRK13/ RoV9	epithelial cell line expressing ovine PrPC	rabbit	PG127, LA404, SSBP/1, scrapie field isolates
elkRK13	epithelial cell line expressing elk PrPC	rabbit	CWD
4. 非神経由来初代細胞			
BM-derived MSC	bone marrow derived mesenchymal stem cell	mouse	Fukuoka-1
BM-derived MSC-like	bone marrow derived mesenchymal stem cell like	mouse	Fukuoka-1

図1. ヒト血液に感染させた異常プリオンのフィルターでの除去能評価の最適化



Cardone, F. et al. (2014) Transfusion 54, 990-995

図2. インビトロ細胞培養系による異常プリオンの検出系



再生医療製品等のエンドトキシン試験の適用に関する研究

研究分担者 山口 照英 国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部・主任研究官

研究要旨 本年度は、再生医療等製品の安全性に関して、エンドトキシン試験の要件について検討を行い、以下のような結論がえられた。

- 1) エンドトキシン標準品の使用；ロットを構成しない自己由来製品では、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。例えば市販キットを用いてエンドトキシンを測定する場合に、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。そのためには、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評価しておくことが必要。
- 2) エンドトキシン標準品を用いて表示感度の確認や反応干渉試験を実施しておくことにより、再生医療製品ごとの出荷判定としての実施は不要としてよい
- 3) 迅速試験キットも市販されており、いわゆる保存検量線が用いられているケースもある。適切な評価があらかじめなされていれば保存検量線を用いたキット製品を用いることで迅速な試験が可能
- 4) 組換えファクターCな局方に規定されていない手法を用いる場合に、あらかじめエンドトキシン標準品等を用いて評価されていれば使用も可とする。
- 5) 特殊な細胞組織加工医薬品を用いる場合には、複合製品をエンドトキシン陰性塩溶液等に懸濁し、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ことや、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試験を実施し、最終製品のエンドトキシンの値とするなどを選択することでよいと考えられる。

#### A. はじめに

iPS 細胞の確立や幹細胞研究の進展、細胞培養や細胞加工技術の進展により再生医療製品等は生きた細胞を治療に用いるために製品の品質が患者ごとに大きく変動すること、通常のバイオ医薬品のように高度な精製や感染因子の不活化工程を適用することが困難である。また自己由来製品の開発にあたっては多くの

場合で製品がロットを構成していないテイラーメイド的製品であり、単回投与されるためにしまた製品によってはきわめて少量の細胞で構成される場合があり、安全性に関連する様々な試験に関して通常の公定書に記載された方法が適用できない場合が多い。

日本薬局方一般試験法エンドトキシン試験法〈4.01〉の目的は、注射剤中に発熱を惹

起する量のエンドトキシンが含まれていないことを確認することにより、注射剤の安全性を確保することを目的としている。エンドトキシンはグラム陰性菌の細胞壁構成成分の一つで、リピド A とよばれる資質の糖鎖が結合したりポリサッカライド (LPS) である。エンドトキシンは自然界の中で最も強力な発熱物質であり、血中に直接投与されると微量で発熱を引き起こし、さらに大量に投与されるとショックを引き起こす。グラム陰性菌によって引き起こされる致死性敗血症ショックの本体であることが知られている。またエンドトキシンは耐熱性であり、通常の加熱滅菌などでは不活性化されず、完全に失活させるには 250℃で 30 分以上の感熱滅菌処理が必要とされる。

このようにエンドトキシンは発熱のみならず様々な有害な生体応答を引き起こすために注射剤での試験が求められている。一方再生医療等製品では、生きた細胞を用いる点やロットを構成しない特性、非常に少量しか生産されない場合もある。これらの特性からエンドトキシン試験の適用においても通常の医薬品に適用される局方試験法を適用することは必ずしも合理的といえない。また、再生医療製品等は生きたい細胞であり凍結保存される場合を除いて製剤化後、速やかに患者に投与される必要がある。

本研究では、再生医療等製品におけるエンドトキシン試験をどのように適用していくのか、局方エンドトキシンに沿った試験が困難な場合にどのように試験を実施するのが合理的であるのか検討した。また、再生医療等製品は多様な製品が開発中であり、その製品の特性に応じてどのようにエンドトキシン試験を実施するべきかについても考察した。

## B. 方法

再生医療等製品の培養液やヒトへの投与に用いられるアルブミンを含む塩緩衝液にエンドトキシン標準品をスパイクし、局方 <4.01> に準拠しているキットを用いた測定と局方には準拠していない他の迅速測定キットでの結果を比較した。特に添加回収実験やばらつきなどを測定し、<4.01> に適合しないキットを用いる場合にどのような問題点があるのかについて検討した。

### B.1. 分光法

分光法での測定には、LALPyrochrome™ を用いた。標準品検量線として 50EU/ml、5EU/ml、0.5EU/ml、0.05 EU/ml、0.005 EU/ml のエンドトキシン標準品を測定した。また、細胞培養に用いた無血清培地上清及びヒトアルブミン添加塩溶液にエンドトキシンを添加し、10 倍希釈、及び 100 倍希釈を作製して検量線からエンドトキシン量を測定した。

### B.2. ELISA キットによるエンドトキシン測定

抗エンドトキシン抗体を利用したエンドトキシン測定法である EndoLisa™ を用いて、B.1 と同様の希釈系列に対して測定を行った。

### B.3. 保存検量線を用いた市販キットでの測定

エンドトキシン標準品をあらかじめキットにセットし、検体中のエンドトキシン測定に及ぼす緩衝作用を同時に測定する Endosafe™ が市販されている。Endosafe を用いて上記の培地及びアルブミン緩衝液の希釈検体を対象として保存検量線を利用したエンドトキシンの測定を行った。

## C. 結果

### C.1. 局方エンドトキシン試験法

日本薬局方一般試験法エンドトキシン試験法 <4.01> の目的は、注射剤中に発熱を惹起す

量のエンドトキシンが含まれていないことを確認することにより、注射剤の安全性を確保することを目的としている。エンドトキシンは古くはウサギを用いた発熱性物質試験法により検査されてきたが、インビボ法のために感度が高くなく、時間のかかる方法であり改良が望まれていた。このためカプトガニ血球の抽出物が微量のエンドトキシンによりゲル化することを利用してインビトロ法が開発された。現在はゲル化法以外にも、ゲル化過程での濁度増加を光学的に測定する方法（比濁法）、及び合成基質の加水分解による発色を指標とする比色法がある。

一方、局方エンドトキシン法を再生医療等製品へ適用するには次のような課題が想定される。まず、市販されているエンドトキシンキットの表示感度の確認では、エンドトキシン標準品の被検液に応じて希釈系列を作製して用いる必要がある。また、反応干渉因子試験でも局方エンドトキシン標準品を用いることが必要とされる。しかし、多くの製剤が作られる通常の注射用医薬品とは異なり、特に自己由来細胞組織加工製品はテイラーメイド製の特徴を持ち、個別製品ごとにエンドトキシン標準品を用いた干渉作用の有無を製品ごとに求めるのは合理的ではない可能性が高く、また生きた細胞を用いるために出荷判定が急がれる再生医療製品で、その予試験を毎回実施するとするのはかなりハードルが高くなる。

再生医療等製品は生きた細胞を用いており、細胞そのものがエンドトキシン試験を妨害する可能性が高い。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して試験に供することが必要となる。

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。

細胞を医療材料等に包埋するような製品の場合に、そのままではエンドトキシン試験の実施が困難が困難となる場合が多い。

<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」とされているが、最新のキットでは組換えファクターCやELISA法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。

## C.2. 局方エンドトキシン試験と再生医療等製品

市販されているエンドトキシン測定キットの殆どは、ゲル化法、比濁法、比色法であり、局方<4.01>に規定されている評価がされている。しかし再生医療等製品に適用する場合には迅速に結果が得られることが望ましいことから保存検量線が使用できるとその目的にかなうことになるが、局方試験法には準拠していないことになる。また、3法以外のライセート試薬を用いない方法を採用する場合にも局方に従っていないことになる。しかし、テイラーメイド製品である再生医療製品では局方と同等の結果が得られる場合には、迅速法の使用も可能と考えられ、その適用について検討した。

比色法を利用して、0.005から5EU/mlのエンドトキシン標準品を測定するとその相関係数は0.988であった(図1)。本比色法を用いて50EU/mlとなるようにエンドトキシン標準品を再生医療で用いられる培地やアルブミン含有塩溶液に添加(スパイク)し、さらにエンドトキシンプリー液で希釈して測定したところ、無



血清培地に添加した場合には 1/10 希釈でもばらつきがあまりなく適切にエンドトキシンが測定できることが明らかになった。一方、アルブミン含有培地では希釈率が低い場合には、バラツキが非常に大きくスパイクした量より高めの測定値が得られることが明らかになった。

次に ELISA によるエンドトキシン測定キットを用いて比色法と同様の解析を行った。標準見料線の相関係数は比色法程高くなかった。一方、無血清培地やアルブミン含有培地にスパイクした測定では希釈率が低いほどバラツキが大きいことが判明した(図 2)

最後に Endosafe を用いた保存検量線に測定では、無血清培地にスパイクした場合には、1/10 希釈でも 1/100 希釈でもほぼ適切な値が得られた。一方アルブミン添加塩溶液にスパイクした場合には十分な値が得られないことが明らかになった。保存検量線の回収率はそれほど差異がなかった。(図 3)

#### D. 考察

本年度は、昨年度に引き続きエンドトキシン試験を再生医療等製品に対して適用する際の考慮事項について調査研究を行うと共に、再生医療等製品で用いられる培地やアルブミン添加塩溶液を対象としてエンドトキシンの測定を行い、試験実施における問題について検討を行った。

局方エンドトキシン法を再生医療等製品へ適用するには次のような課題として、市販のエンドトキシンキットを利用する場合にエンドトキシン標準品を用いた検量線作成や反応干渉因子試験等でエンドトキシン標準品を用いることが必要とされるが、自己由来細胞組織加工製品のようなテイラーメイド製品でエンドトキシン標準品を用いた感度や妨害物質の有

無を製品ごとに求めるのは合理的ではない可能性が高い。

生きた細胞を用いる再生医療等製品のエンドトキシン測定では短時間の間にヒトに投与される必要があり、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。

以上のような課題に対処するために、あらかじめ標準検量線や干渉試験が実施され、その評価ができている場合には、局方エンドトキシン法以外の方法や異なる原理を利用した市販キットも使用可能としてよいのではと考えられる。そのためにはあらかじめ十分な評価を行うておくことが求められる。特に、再生医療等製品に適用する場合に、特に細胞の培養液や懸濁液にエンドトキシンをスパイクし、干渉がない条件の検討や試験成立の条件等を評価しておくことが求められる。さらに、市販キットではキットメーカーによって実施されたバリデーションデータが添付されている場合もあると想定されるが、少なくとも適用しようとする検体を用いてキットの記載通りの結果が得られることを確認しておく必要がある。

さらに局方エンドトキシン法では「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」とされているが、最新のキットでは組換えファクターC や ELISA 法なども開発されており、迅速あるいは簡便な測定を可能とすることを考慮してもよいのではと考えられる。

今回局方試験法に適合している比色法でのエンドトキシン測定と2つの局方に適合はしていないが簡便法として市販されている測定キットを用いた測定を行った。比色法を用いた場合でも細胞懸濁に用いられる溶液によってはスパイクしたエンドトキシンを正確に測定することが難しい場合もありうることが示され

た。ただ、あらかじめ測定に影響が出ない希釈処理などに関して評価をしておくことにより、適切な測定が可能であることが示された。

一方、局方に適合していないキット製品でも十分な希釈を行うことや適切な被検液を選択することにより十分なエンドトキシン測定が可能であると考えられた。

## E. 結論

エンドトキシン試験法を再生医療等製品に適用する際の考慮事項と実際に再生医療等製品で使用される被検液等を用いてエンドトキシン試験を実施する場合に課題について検討をおこなった。その結果次のような点が明らかとなった。

- 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の使用や干渉試験などをテイラーメイド製品である再生医療等製品に求めるのは必ずしも合理的とは言えず、適切な評価ができていればエンドトキシン参照品や保存検量線を使用することも可能と考えられる。
- 2) 局方に適合はしなくても十分な評価が実施されていれば市販キットの使用も可能と考えられる。

## 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) 山口照英: 再生医療の安全性確保法と薬事法改正、レギュラトリーサイエンス学会誌

(RSMP)、vol.4, No.3, 237-247(2014)

- 2) Maeda,D., Yamaguchi,T., Ishiduka,K., Takekita,T., Sato,D.: Regulatory Frameworks for Gene and Cell Therapies in Japan. in "Regulatory Aspects of Gene Therapy and Cell Therapy Products in Japan." Springer, Serbian,M. &Galli,M.C. eds., in press
- 3) 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: 日本薬局方参考情報収載マイコプラズマ否定試験のPCR法改正のための共同研究、マイコプラズマ学会雑誌(印刷中)
- 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 45 (5), 442-451 (2014)

### G-2 学会発表

- 5) 山口照英、内田恵理子、小野寺裕史: 「遺伝子治療製品の品質・安全性確保のための指針改定と国際動向」東京大学医科学研究所遺伝子・細胞治療センターキックオフ・シンポジウム 2014年11月東京

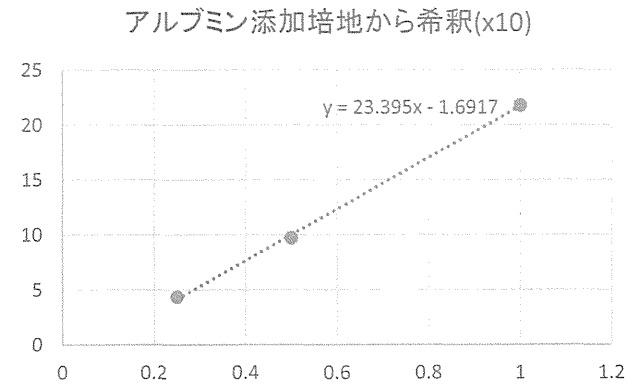
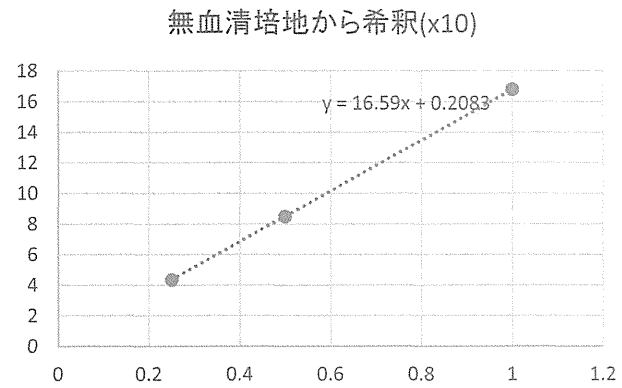
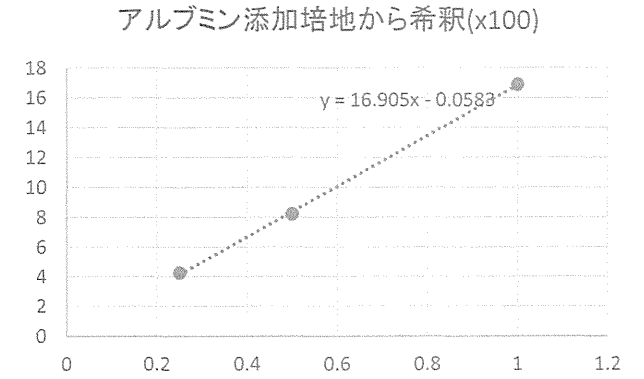
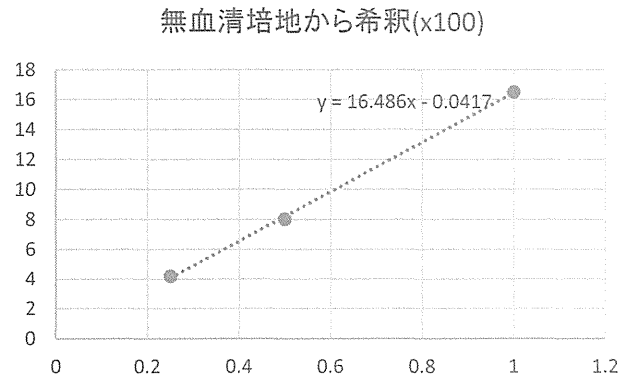
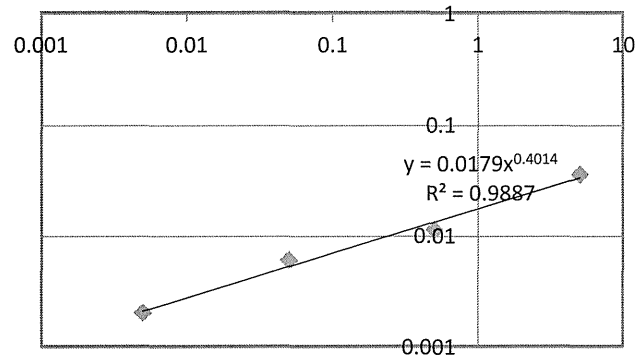
## H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1 特許取得 なし

H-2 実用新案登録 なし

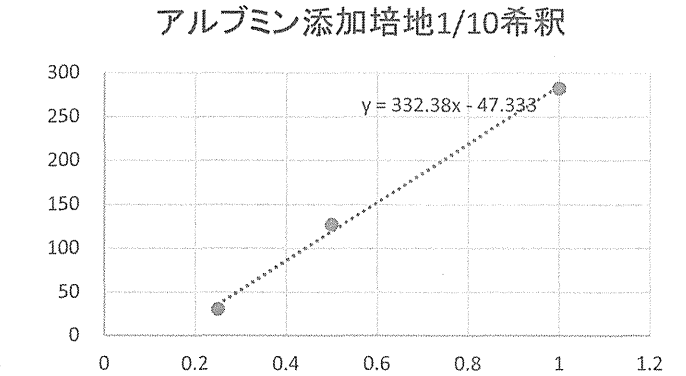
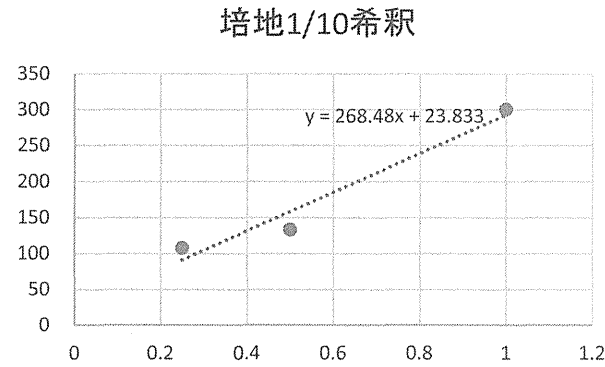
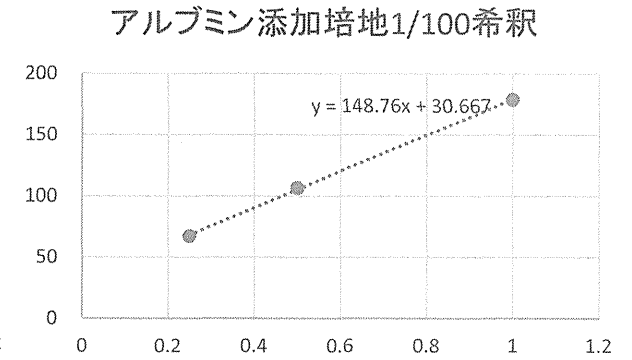
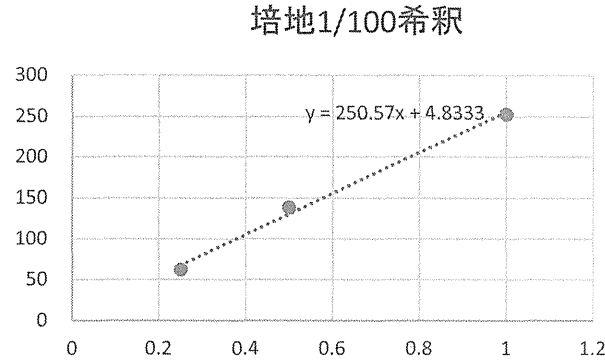
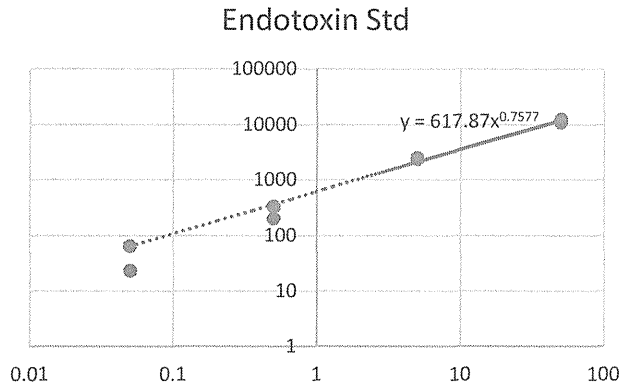
H-3 その他 なし

図1. LAL Pyrochrome™によるエンドトキシン測定



	1/100希釈	1/10希釈
無血清培地の希釈	62 ± 4	63 ± 13
アルブミン添加培地	69 ± 8	101 ± 47

図2. EndoLisaを用いたエンドトキシン測定



	1/100希釈	1/10希釈
無血清培地の希釈	39 ± 10	31 ± 7
アルブミン添加培地	53 ± 24	31 ± 21

図3. Endosafeを用いたエンドトキシン測定

無血清培地 1/100希釈	無血清培地 1/10希釈
51.2 EU/ml RT-CV 2.6% Spike 1.78EU/ml Recovery 123%	57.9 EU/ml RT-CV 2.6% Spike 2.11EU/ml Recovery 157%
無アルブミン添加培地 1/100希釈	無アルブミン添加培地 1/10希釈
<10.1 EU/ml RT-CV 0.5% Spike 2.04 EU/ml Recovery 151%	25.8 EU/ml RT-CV 0.9% Spike 1.6 EU/ml Recovery 120%

厚生労働科学研究費補助金（医薬品等規制調和・評価研究事業）  
（平成 26 年度分担研究報告書）

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  
－WB 法を用いたウイルス除去膜（平均孔径 15nm）による vCJD 除去評価－  
－vCJD を用いた Cell-based infectivity assay の検討－

分担研究者 大阪大学微生物病研究所 助教 黒須 剛  
一般社団法人日本血液製剤機構 柚木 幹弘、坂井 薫、上平 崇

平成 26 年度研究要旨：

これまでに確立した mo-vCJD（感染マウス脳由来）を用いた Western Blotting (WB)法を用いて、平均孔径 15nm のウイルス除去膜による除去能力を評価したところ、mo-vCJD を検出限界以下にまで除去できる能力を有する事が確認された。

マウス PrP<sup>sc</sup> 強発現細胞（RK13mol）を用いて、mo-vCJD 感染マウス脳材料を感染させたところ、感染は成立するものの不安定な結果が得られた事から、更に実験条件を最適化する必要が有る事が判明した。

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。工程評価は一般的にスクレイパー 263K 株を用いて行われているが、私たちはマウス馴化 vCJD（mo-vCJD）株を用いた Western Blotting (WB)法による評価系を確立し、血漿分画製剤の製造工程に導入されている平均孔径 35nm 及び 19nm のウイルス除去膜工程をこれまでに評価した。本年度はこれまでとは異なる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（平均孔径 15nm）工程の評価を実施した。また、動物を用いた感染価測定法に代わる Cell-based infectivity assay の確立をめざし、マウス PrP<sup>sc</sup> を強発現する RK13mol 細胞株を用いた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 super sonicated microsomal fraction (sMF) の調製

mo-vCJD 感染マウス脳を PBS に 10% (w/v) となるよう混合し、シャフトジェネレータを用いて脳乳剤を調製した。脳乳剤を超遠心分離 (150,000 x g, 1 時間) を行い、沈殿を元液量の二倍量の PBS にて再懸濁し、Microsomal Fraction (MF) とした。次に MF を高出力超音波処理 (200 W、1 分×10 回) 後、0.22 μm のシリンジフィルターでろ過し、sMF とした。

(2) ウイルス除去膜による除去効果の評価

アンチトロンビン製剤のウイルス除去膜（平均孔径 15nm）工程直前液に sMF を加え、ろ過前後の PrP<sup>sc</sup> 総量（総 WB-titer = non-detectable end point dilution titer に液量に乗じたもの）を求め、前後の総量の差を除去係数 (Log Reduction Value, LRV) として求めた (図 1)。

(3) WB 法

サンプルに Proteinase K (PK) をあらかじめ決定していた濃度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、1/5 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 1/5 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 1 時間、二次抗体反応は 0.25 μg/ml の HRP-conjugated anti-mouse IgG 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 West Pico あるいは、Super Signal West Femto 発光基質 (Thermo) に浸し、5 分間振盪後、X 線フィルムあるいは、Amersham Imager 600 にて露光・検出した。

#### (4) 細胞を用いた感染実験法：

RK13mol 株を 5% ウシ血清を含む Opti-MEM GlutaMax 培地で培養した。プリオン接種前の継代時に Doxycycline を終濃度 1 µg/ml になるように培地に添加して、3 日後に 12 well plate に播種した。翌日、sMF を接種し、そのまま更に 1 週間培養した。また細胞への導入効率を上げることを目的に、sMF と磁気ビーズ (ViroMag) を混合し、磁石板を下に敷いたプレートに 20 分置くことにより細胞へ導入した。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 lysis buffer 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、4 週間目まで週毎に上記同様に細胞溶解液を回収し、WB 法に供した。

倫理面への配慮。プリオンを用いた実験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

mo-vCJD を用いてアンチトロンビン製剤の製造工程に導入されている平均孔径 15nm のウイルス除去膜工程における除去能力を評価したところ、mo-vCJD (PrP<sup>res</sup>) はこれまでに実施した 263K と同様に検出限界以下にまで除去される事を確認できた (表 1、図 2)。

mo-vCJD 感染マウス sMF の希釈サンプルを RK13mol 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。sMF を感染させた典型例では 3 週目に初めて PrP<sup>res</sup> が検出されたが、安定した結果は得られなかった (図 3)。また、感染効率を上げるために磁気ビーズを用いて検討したが、検出効率の増強には至らなかった。Cell based infectivity assay の確立には実験条件の更なる最適化検討が必要である。

#### 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おいて、mo-vCJD は

従前の 263K を用いた評価試験と同様の結果を示したことから mo-vCJD を用いた WB 評価方法は安全性評価に利用可能であることが確認された。一方、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。そこで、簡便な感染性検出方法として cell based infectivity assay の開発を試みたが、現時点で培養細胞 RK13mol を用いた方法は検出感度が動物実験よりも悪く、安定な結果が得られなかった。これはアッセイ系が不確定な要因の影響下にあるためと考えられ、更に検討が必要である事がわかった。

#### E. 結論

mo-vCJD を用いた WB 評価系は工程評価試験に適用可能であり、15nm 及び 19nm のウイルス除去膜は mo-vCJD を効果的に除去できる事を確認した。Cell-based infectivity assay については、実験条件の最適化により、より安定した系になると考えられた。

#### 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) Kurosu T, Chaichana P, Phanthanawiboon S, Khamlert C, Yamashita A, A-nuegoonpipat A, Ikuta K, and Anantapreecha S. Sequence Variation of Dengue Type 2 Virus from clinical cases in Thailand. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 67(2):132-134. (2014)
- 2) Omokoko MD, Pambudi S, Phanthanawiboon S, Masrinoul P, Setthapramote C, Sasaki T, Kuhara M, Ramasoota P, Yamashita A, Hirai I, Ikuta K, and Kurosu T. A Highly Conserved Region between Amino Acids 221-266 of Dengue Virus Nonstructural Protein 1 Is a Major Epitope Region in Infected Patients. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. Jul;91(1):146-155. (2014)
- 3) Sasayama M, Benjathummarak S, Kawashita N, Rukmanee P, Sangnukdanun S, Masrinoul P, Pitaksajakul P, Wuthisen P, Kurosu T, Maneekan P, Ikuta K, Ramasoota P, Okabayashi T, Singhasivanon P, Luplertlop N. Chikungunya virus was isolated in Thailand, 2010. *Virus Genes*. Dec;49(3):485-489. (2014)

- 4) Phanthanawiboon S, A-nuegoonpipat A, Panngarm N, Limkittikul K, Ikuta K, Anantapreecha S, Kurosu T\* Isolation and propagation of Dengue virus in Vero and BHK-21 expressing stably human DC-SIGN. *J. Virol. Methods.* Dec;209:55-61. (2014)
- 5) Boonsathorn N, Panthong S, Koksunan S, Chittaganpitch M, Phuygun S, Waicharoen S, Prachasupap A, Sasaki T, Kubota-Koketsu R, Yasugi M, Ono K, Arai Y, Kurosu T, Sawanpanyalert P, Ikuta K. A human monoclonal antibody derived from a vaccinated volunteer recognizes heterosubtypically a novel epitope on the hemagglutinin globular head of H1 and H9 influenza A viruses, 2014 *Biochemical and Biophysical Research Communications.* Sep 26;452(3):865-870. (2014)
- 6) Phanthanawiboon S, A-nuegoonpipat A, Panngarm N, Limkittikul K, Ikuta K, Anantapreecha S, Kurosu T. Isolation and propagation of Dengue virus in Vero and BHK-21 expressing stably human DC-SIGN. *J. Virol. Methods.* 209: 55-61. (2014)
- 7) Okabayashi T, Kurosu T. et. al. Detection of chikungunya virus antigen by a novel rapid immunochromatographic test. *J. Clin. Microbiol.* 2014. Accepted.

## 2. 学会発表

- 1) Speaker: Mikihiro Yunoki  
Co-authors: Katsuro Hagiwara, Kazuyoshi Ikuta.  
Pathogen inactivation in plasma derivatives. Significant differences of properties between model viruses and target viruses (wild type) in HAV, HEV and B19 during liquid heating steps of plasma derivatives. IPFA/PEI 21<sup>st</sup> International Workshop on "Surveillance and Screening of Blood Borne Pathogens". 2014, Rome.
- 2) Speaker: Mikihiro Yunoki

Co-authors: Katsuro Hagiwara, Kazuyoshi Ikuta.  
Experiences of HEV elimination during the manufacturing process steps and the suitable model viruses. Workshop on Viral safety of plasma-derived medicinal products with respect to hepatitis E virus. 13 October 2014. CHMP/BWP/196177/2014 Biologics Working Party (BWP)). 2014, London.

- 3) ○加藤 (森) ゆうこ、上平崇、坂井薫、柚木幹弘、岡本実、萩原克郎。変異型クロイツフェルトヤコブ病 (vCJD) 持続発現細胞プリオン蛋白のマウスへの伝達性。第 62 回日本ウイルス学会学術集会。2014, 横浜。
- 4) 池川礎令、皆木隆男、井手野祥次、坂井薫、柚木幹弘、宮本尚、大場徹也、川浪雅好、脇坂明美。日本血液製剤機構(JB)における原料血漿の HEV 陽性率。第 38 回日本血液事業学会。2014, 広島。
- 5) ○上平 崇、久保 純、大久保祐士、坂井 薫、加藤 (森) ゆうこ、萩原克郎、柚木幹弘。マウス馴化 vCJD を用いた血漿分画製剤工程のプリオン除去。第 38 回日本血液事業学会。2014, 広島。

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/ENVIT 1225 Interactions Hôtes- Agents Pathogènes Pathologie du bétail, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse の Dr. Didier ViletteE より分与された。



図 1

工程評価試験フロー

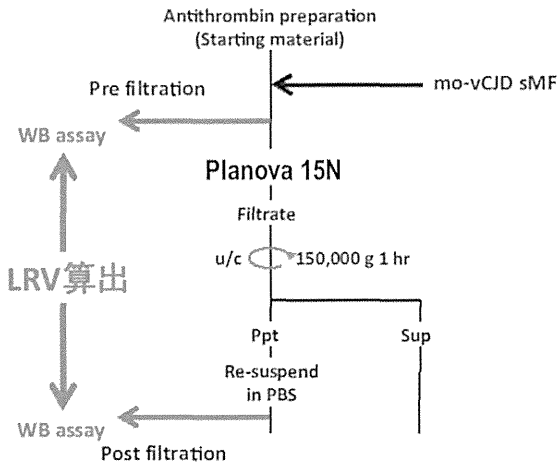


表 1

Prion removal using 15nm virus reduction filter

	mo-vCJD (sMF)	263K (sMF)
Pre filtration	2.5	3.6
Post filtration	<-0.3	<0.8
LRV	≥2.8	≥2.8

sMF: super-sonicated microsomal fraction

LRV: Log reduction value

図 2

WB 結果

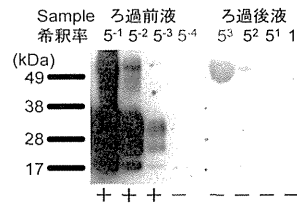
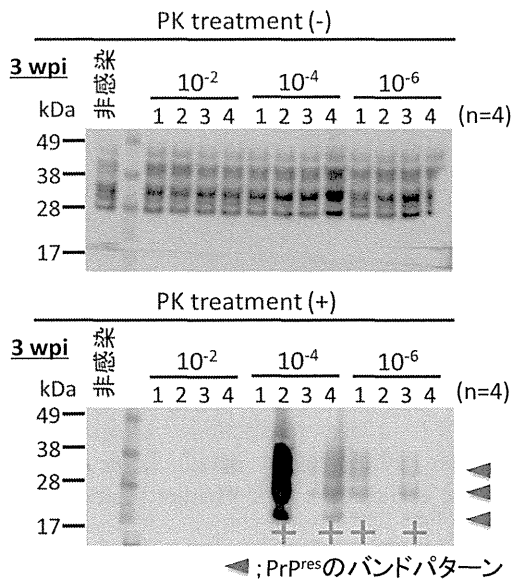


図 3



細胞懸濁液の WB 結果 (感染第 3 週目)

10<sup>-2</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-6</sup> は感染材料 (mo-vCJD sMF) の希釈倍率

+ : Protease K 耐性バンドを確認

厚生労働科学研究費補助金（医薬品等規制調和・評価研究事業）  
（平成 26 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（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 PD 加藤（森）ゆうこ、准教授 岡本 実  
一般社団法人日本血液製剤機構 柚木 幹弘、坂井 薫、上平 崇

平成 26 年度研究要旨：

これまでにマウス馴化 vCJD (mo-vCJD) 株感染脳及び vCJD 持続感染細胞株 (MV63) を接種材料として、マウスモデルを用いた *in vivo* 評価手法の確立を行ってきた。本年度は確立された高感度 *in vivo* 評価法 (Bio Assay, BA) により、mo-vCJD を人為的に混入させたバイオ医薬品 (アンチトロンビン製剤, ATIII) 製造工程モデルを用い、製造工程におけるウイルス除去膜 (平均孔径 15nm) のプリオン除去能について検討した。ウイルス除去膜処理前液を BA 評価したところ感染性が認められ、その感染価は 5.2 Log ID<sub>50</sub>/ml であった。一方、処理後液にはプリオン感染は確認されなかった (<1.0 Log ID<sub>50</sub>/ml)。プリオン除去能 (Log Reduction Value, LRV) を算出したところ  $\geq 4.2$  という結果となり、このウイルス除去膜処理は効果的に感染性プリオン (mo-vCJD) を除去することが示された。

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、感染実験手法を確立している。今年度は、mo-vCJD 株感染マウス由来の脳サンプル (super-sonicated microsomal fraction, sMF) を人為的に混入させたバイオ医薬品製造工程モデルにおいて、ウイルス除去膜 (平均孔径 15nm) によるプリオン除去能を確認するため、確立した *in vivo* 評価手法 (Bio assay, BA) により感染実験を実施し、プリオン除去能について検討した。

B. 研究方法

(1) 接種材料の調製：

vCJD 材料として、mo-vCJD 株感染マウス脳由来 sMF を用いた。アンチトロンビン製剤 (ATIII) のウイルス除去膜工程直前液にそれを添加した (ろ過直前液)。その添加溶液をウイルス除去膜にて処理した (ATIII ろ過液) (図 1)。ろ過液は、さらにその一部を超遠心分離 (150,000 x g 1 時間) し、上清と沈殿 (PBS で再懸濁) に分取した。ろ過直前液及びろ過液は、PBS で希釈した後、マウス接種材料とした (表 1)。Western blotting (WB) 法による、ろ過直前液の総 WB titer (non-detectable end point dilution titer に液量を乗じたもの) は 2.5 log であるのに対してろ過液の

総 WB-titer は <0.3 log (検出限界以下) であり、除去係数 (Log Reduction Value, LRV) は  $\geq 2.8$  であった (表 2)。

(2) 感染実験：

前述により調製したろ過直前液、ろ過液、超遠心上清ならびに沈殿の感染性を確認するため、生後 4 週齢の FVB/n マウスに脳内接種 (30  $\mu$ L/head) し、瀕死状態 (Terminal ill, 以下 TI) 又は接種後約 200 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。

(3) 感染実験による感染価及び LRV の算出：

ろ過前後の試料における各希釈群の WB 感染陽性数と陰性数を用いて Karber 法にて ID<sub>50</sub> 値を算出した。感染が認められなかった試料については、階段希釈群の直近希釈群が全て感染陽性と仮定して ID<sub>50</sub> 値を算出した。また、ろ過直前液とろ過液の感染価の差を LRV とした。

\*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. 研究成果と考察

#### (1) ろ過直前液の BA による感染価：

WB 法解析により、ろ過直前液を接種したマウスの脳において、 $10^4$  接種群まで PrP<sup>res</sup> が検出されたが、 $10^5$  接種群で検出されなかった（表 3）。更に、病理学的評価においても、空砲変性及び異常型プリオン蛋白の蓄積が  $10^4$  接種群まで確認されたが、 $10^5$  接種群においては確認されなかった（表 3）。WB 解析の結果から感染価を Karber 法で算出したところ、5.2 Log ID<sub>50</sub>/ml であった。

#### (2) ろ過液の BA による感染価：

ろ過液を接種したマウスにおいては、原液接種群を含む全ての接種群において、WB 法および病理学的評価ともに、異常型プリオンの存在および脳組織変性所見は確認されなかった（図 2・表 3）。また、超遠心上清および超遠心沈殿を接種した群においても、同様に異常型プリオンの存在および脳組織変性所見は確認されなかった（表 3）。WB 解析の結果から感染価を Karber 法で算出したところ、 $<1.0$  Log ID<sub>50</sub>/ml であった。

#### (3) ウイルス除去膜によるプリオン除去能：

以上の結果から、ろ過直前液の感染価は 5.2 Log、ろ過液の感染価は  $<1.0$  Log であった。本工程における LRV は  $\geq 4.2$  と算出された。また、ろ過液を 100 倍濃縮した検体も感染性が認められず、LRV を単純に算出すると  $\geq 6.2$  であった。このことから、平均孔径 15nm のウイルス除去膜は効果的に mo-vCJD を除去することが示された（表 2）。

### D. 考察

これまでに確立した BA 評価系が WB 法よりも高感度であることが改めて示された。さらに、この評価系を用いて、バイオ医薬品の製造工程におけるウイルス除去ステップの効果検討が可能であった。

### E. 結論

バイオ医薬品や血漿分画製剤の製造工程におけるウイルス除去効果の評価には、BA 法を用いることが重要である。

### 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）

本研究に直接関係する論文なし

#### 学会発表

- 1) Speaker: Mikihiro Yunoki  
Co-authors: Katsuro Hagiwara, Kazuyoshi Ikuta. Pathogen inactivation in plasma derivatives. Significant differences of properties between model viruses and target viruses (wild type) in HAV, HEV and B19 during liquid heating steps of plasma derivatives. IPFA/PEI 21<sup>st</sup> International Workshop on “Surveillance and Screening of Blood Borne Pathogens”. 2014, Rome.
- 2) Speaker: Mikihiro Yunoki  
Co-authors: Katsuro Hagiwara, Kazuyoshi Ikuta. Experiences of HEV elimination during the manufacturing process steps and the suitable model viruses. Workshop on Viral safety of plasma-derived medicinal products with respect to hepatitis E virus. 13 October 2014. CHMP/BWP/196177/2014 Biologics Working Party (BWP)). 2014, London.
- 3) ○加藤(森)ゆうこ、上平崇、坂井薫、柚木幹弘、岡本実、萩原克郎。変異型クロイツフェルトヤコブ病 (vCJD) 持続発現細胞プリオン蛋白のマウスへの伝達性。第 62 回日本ウイルス学会学術集会。2014, 横浜。
- 4) 池川礎令、皆木隆男、井手野祥次、坂井薫、柚木幹弘、宮本尚、大場徹也、川浪雅好、脇坂明美。日本血液製剤機構(JB)における原料血漿の HEV 陽性率。第 38 回日本血液事業学会。2014, 広島。
- 5) ○上平 崇、久保 純、大久保祐士、坂井 薫、加藤 (森) ゆうこ、萩原克郎、柚木幹弘。マウス馴化 vCJD を用いた血漿分画製剤工程のプリオン除去。第 38 回日本血液事業学会。2014, 広島。

### 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 mo-vCJD 株は米国赤十字社 Dr. Larisa Cervenakova より分与された。

図1. ウイルス除去膜によるプリオン除去評価試験のフローチャート

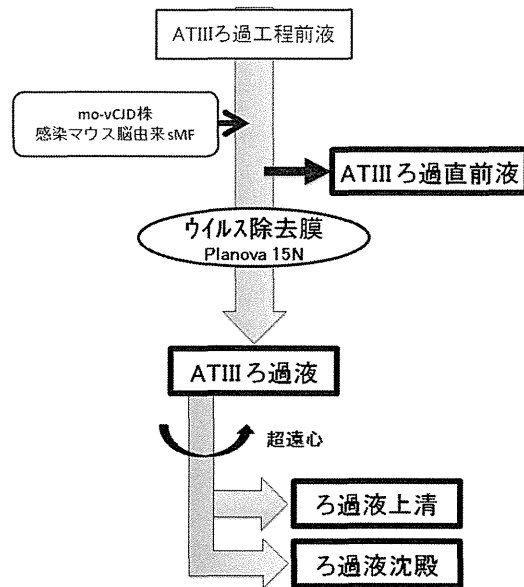


表1 バイオアッセイ接種群詳細

group No.	接種材料	希釈
#1	ATIII ろ過直前液	$10^{-1}$
#2	ATIII ろ過直前液	$10^{-2}$
#3	ATIII ろ過直前液	$10^{-3}$
#4	ATIII ろ過直前液	$10^{-4}$
#5	ATIII ろ過直前液	$10^{-5}$
#6	ATIII ろ過液	X1
#7	ATIII ろ過液	$10^{-1}$
#8	ATIII ろ過液	$10^{-2}$
#9	ATIII ろ過液 超遠心上清	X2
#10	ATIII ろ過液 超遠心沈殿再懸濁液	100倍濃縮
CN	ATIII 直前液 (vCJD添加無)	X1