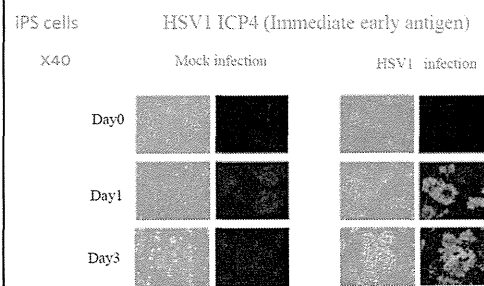
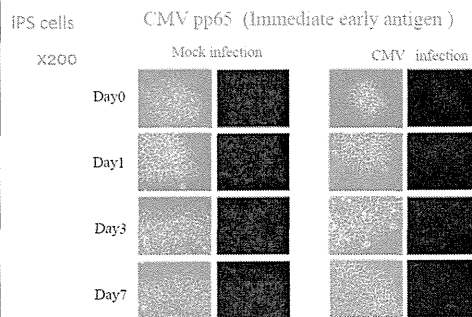
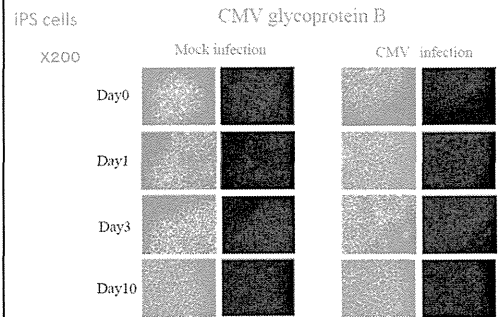
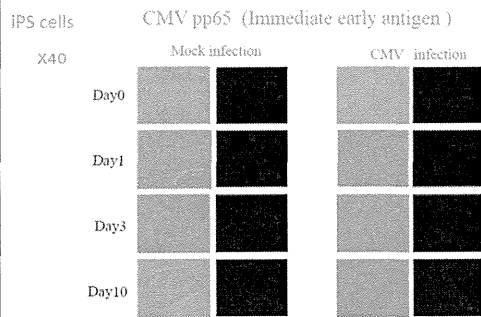
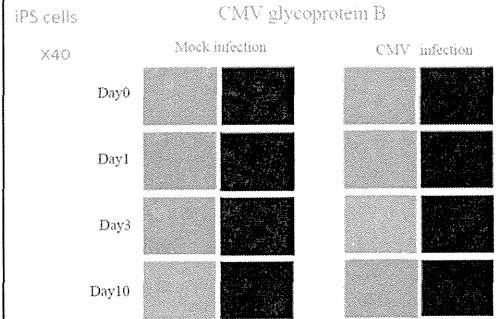
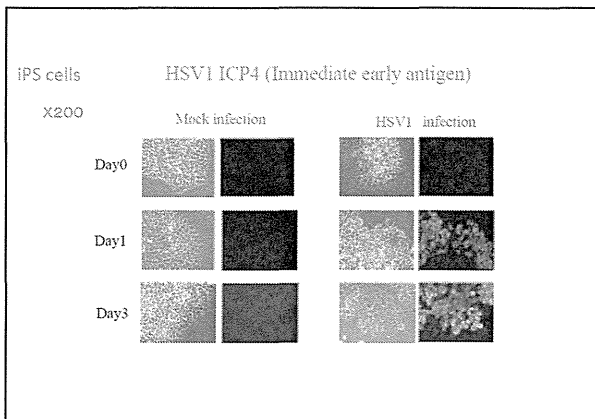


蛍光抗体法によるウイルスタンパク質の検出

	Target protein
CMV	1) pp65(Immediate early antigen ) 2) Glycoprotein B
HSV1	1) ICP4(Immediate early antigen ) 2) Glycoprotein B





これまでの研究結果から特定された注意すべき病原体

活性化T細胞: 原材料 EBV, HHV6, HHV7, CMV, HTLV1, PVB19, HCV, HBV

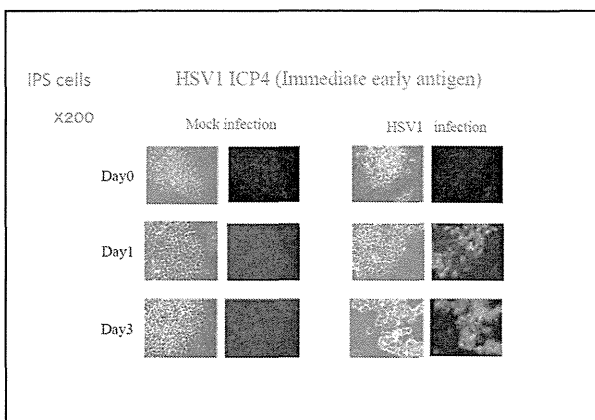
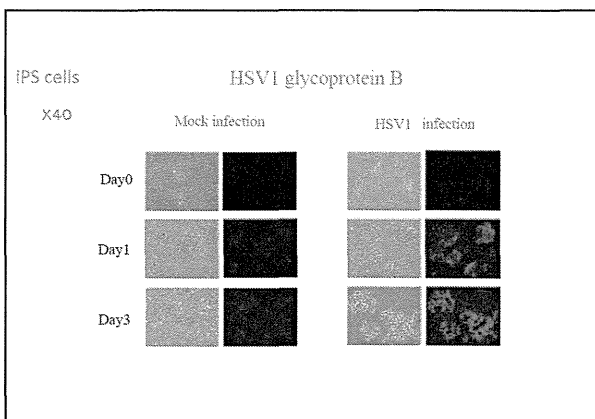
細胞裂剤 EBV, HHV6, HHV7, HTLV1


滑膜細胞: 原材料 PVB19, EBV, HTLV1, VZV

iPS由来RPE細胞: 培養細胞 HSV1, CMV

CD34陽性細胞: 培養細胞 PVB19

iPS細胞: 培養細胞 HSV1 皮膚・末梢血からの汚染は?




 平成26年度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  
 「ウイルス等感染性因子安全性評価に関する研究」  
 2015年1月14日（水）国立衛研セミナー室

細胞組織加工医薬品及びバイオ医薬品のウイルス安全評価に関する研究  
**再生医療等製品における  
 ウイルス感染リスク低減に関する提言案**

国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部  
 小林哲

## 1. はじめに

再生医療等製品の製造では製品のウイルス汚染による重大な感染事象が生じるリスクを考慮する必要がある。

有害事象の発生を最小限に抑えるためには、健康被害を引き起こすウイルスを特定し、その感染頻度や健康への影響に基づくリスク分析を行うこと、そのリスクが許容可能か否かのリスク評価を行うこと、さらにはウイルスごとに感染リスクの低減策を明らかにしておくことが重要である。

再生医療等製品による安全で有効な治療の実現に向けて、ウイルスに関する科学的知見とリスクマネジメントの考えに基づく、再生医療等製品のウイルス安全性確保のための方策を提案する。

## ウイルス感染リスクマネジメント 目標設定

目標

**ウイルス感染リスクが可能な限り低減された再生医療等製品を供給する。**

## 2. 適用範囲

- ▶ ヒト（同種）由来細胞や組織を加工した製品（細胞組織加工製品）を対象とする。
- ▶ ヒト（自己）由来細胞や組織を加工した製品についても本提言が参考になることがある。

## 再生医療等製品における ウイルス感染リスク低減に関する提言案 項立て案

1. はじめに
2. 適用範囲
3. 基本的要件
4. リスクアセスメント
  - ・ リスク特定 リスク分析 リスク評価
5. リスク低減策（管理戦略）
  - ・ 原材料となる細胞・組織由来のウイルス
  - ・ 細胞・組織の加工等の製造に使われる細胞・組織以外の原材料や製造関連物質、フィーダー細胞由来のウイルス
  - ・ 採取や製造工程での飛び込みウイルス
6. 参考資料
7. 用語解説

## 3. 基本的要件

- ▶ 再生医療等製品の製造管理及び品質管理の基準に関する省令（GCTP省令）を遵守する。
- ▶ 細胞加工製品等の品質及び安全性に関する原則及び手法についてはヒト幹細胞を用いた細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する5指針（平成24年9月）等が参考になる。
- ▶ 5指針で示されているHBV、HCV、HTLV及びB16については最優先で管理すべきである。本提言では、5指針でケースバイケースとされているCMV等に対するリスク管理を中心に述べる。
- ▶ 再生医療等製品がウイルス汚染される場合に想定されるリスク源としては（1）原材料となる細胞・組織由来のウイルス（ドナーの選択基準・適格性）（2）目的とする細胞・組織以外の原材料や製造関連物質、フィーダー細胞由来のウイルス（3）採取や製造工程での飛び込みウイルスが挙げられる以上、3つのグループに対してリスクの低減策を提案する。

#### 4. リスクの特定

想定されるウイルスによる感染をその経路から3つのグループに分けることができる。

- ①原材料となる細胞・組織由来のウイルス
- ②細胞・組織の加工等の製造に使われる細胞・組織以外の原材料や製造関連物質、フィーダー細胞由来のウイルス
- ③採取や製造工程での飛び込みウイルス (adventitious virus)

#### 4.1. リスク特定

日本薬局方, FDAガイダンス, ICHのQ5Aその他の資料を参考に, ヒトをドナーとする細胞・組織を原材料とする場合に感染が想定されるウイルスを選択した。

主にヒト由来と考えられるウイルスを配布資料の表1, 主にウシ由来, プタ由来, 齧歯類由来と考えられるウイルスを配布資料の表2にまとめた。

#### 4. リスクの特定

想定されるウイルスによる感染をその経路から3つのグループに分けることができる。

- ①原材料となる細胞・組織由来のウイルス
- ②細胞・組織の加工等の製造に使われる細胞・組織以外の原材料や製造関連物質, フィーダー細胞由来のウイルス
- ③採取や製造工程での飛び込みウイルス (adventitious virus)

#### 4.2. リスク分析

公開されている以下のデータをもとに, ウイルスが感染したときの健康への影響の大きさと感染頻度よりリスクマトリックスを作成し, 感染リスクスコアを算定した。重篤度と頻度ランクの定義と尺度は別添表1と3のとおり。

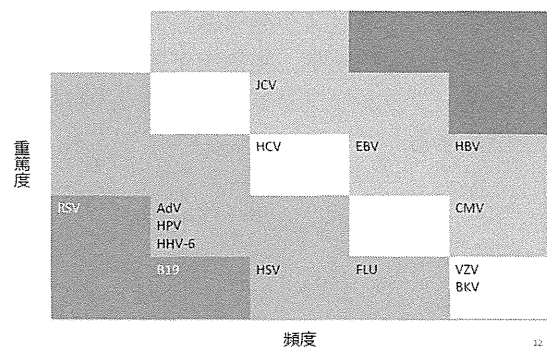
- ・PMDAの副作用データベース (JADER)
- ・感染症研究所の感染症週報 (IDWR) 及び病原微生物検出情報 (IASR)

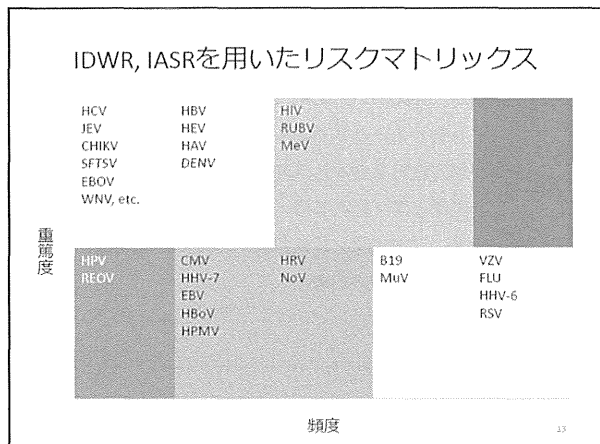
#### 4. リスクアセスメント

ウイルス感染リスク低減策を構築するためには, 以下の3つのプロセスが必要である。

- 1) ヒトへの感染が知られているウイルスや感染可能性のあるウイルスを特定すること
- 2) それらのウイルスの感染リスクレベルを感染頻度や健康被害への大きさから分析すること
- 3) そのリスクレベルをこれまでの知見と比較し, 受容可能か否かを評価すること

#### JADERを用いたリスクマトリックス





### 5.1. 原材料となる細胞・組織由来のウイルス

ドナーの選択が倫理的に適切に行われ、かつ適切な手続きで行われたことを示す。病歴、健康状態、採取細胞・組織を介して感染する可能性がある各種感染症に関する検査項目、免疫適合性等を考慮してその妥当性を明らかにする。これらに加え、ウイルス感染症の国内発生患者数、慢性感染者の頻度、感染症の重篤度等を勘案し、ドナーの感染の有無を調べる。

ドナーのHBV、HCV、HIV、HTLV、ヒトパルボウイルスB19の感染症を問診及び検査によって否定すること。HBV、HCV、HIV、HTLVのウィンドウピリオドを否定できず、製造工程で増殖させる可能性がある場合は、中間製品、最終製品で増殖可能性のあるウイルス試験をPCR法で行う。必要に応じてCMV、EBV、WNV感染の否定をすること。加えて細胞・組織にHSV-1、HSV-2、VZV、HHV-6およびHHV-7の感染があるかどうか検査を行い、治療後の影響について考慮すること。

### 4.3. リスク評価

に示したスコアと持続感染性を考慮した結果、一般にリスク管理が必要なウイルスとしては、以下の18種類があると考えられた。ドナーに海外渡航歴がある場合と患者が妊娠可能な女性である場合に注意すべきウイルスについて表1中に\*及び\*\*をつけて示した。

レベル	ウイルス種別
レベル1	HBV, HCV, HIV-1, HIV-2, HTLV-1, HTLV-2, B19
レベル2	CMV, EBV, WNV, VZV, HSV-1, HSV-2, HHV-6, HHV-7, JCV, BKV, AdV
レベル3	表1のうち、レベル1と2を除いた77種類

### PCRについて

DNAの一部(標的領域)の前後に2種類のプライマーを設定し、DNA合成酵素によるプライマーからの伸長反応を利用して標的領域を増幅する方法である。

1時間程度で標的領域を2の40乗倍以上に増幅することができるため、極微量のウイルスを電気泳動法などにより可視化して検出することが可能になる。しかし、増幅した標的領域は次の増幅反応の良いターゲットになるため、増幅産物の混入による偽陽性反応を防止するための適切な処置が必要となる。

そのため、電気泳動を行うことなく増幅産物を検出可能な蛍光プローブを利用したリアルタイムPCR法の使用が推奨される(増幅産物が標的配列か否かの検証も同時にできる)。

また、RNAを逆転写酵素でDNAに変換したあとにPCR反応を行うRT-PCR法を利用すれば、RNAウイルスの検出も可能である。

### 5. リスク低減策(管理戦略)

優先管理すべきリスクを考慮して、ドナーからの摘出組織や細胞、生物由来原料(ウシ胎児血清・ブタトリプシン等)の受け入れ規格を設定する。

### 5.2. 細胞・組織の加工等の製造に使われる細胞・組織以外の原材料や製造関連物質、フィーダー細胞由来のウイルス

目的とする細胞・組織以外の原材料及び製造関連物質については、その適格性を示すとともに、必要に応じてウイルスに関する規格を設定し、適切な品質管理を行うことが望ましい。

生物由来製品又は特定生物由来製品を原材料として使用する場合は、その使用量を必要最小限とし、「生物由来原料基準」(平成15年厚生労働省告示第210号)をはじめとする関連法令及び通知を遵守すること。

ウイルス不活化及び除去に関する情報を十分に評価するほか遡及調査等も確保する。

### 5.2.1. ウシ由来のウイルス

ウシ胎児血清は、米国連邦規則 9CFR [113.47/53]に従ったウイルス試験が行われる。このウイルス試験では、アフリカミドリザル腎臓由来 VERO細胞ないしウシ鼻甲介由来BT細胞を用いて感染後21日培養を行って細胞変性効果を観察し (BHV-1等の検出)、赤血球凝集反応も行う (BPIV-3等の検出)。またBluetongue virus等、7種類のウイルスについては、感染の有無を免疫蛍光法で調べる。

実際には、9CFR113.47/53によるウイルス試験では感染の有無を調べるできないウシ-ヒト共通感染性ウイルスがある。現在ウシ胎児血清は、海外からの輸入品に依存している上、バイオ医薬品と異なり製造工程に効果的なウイルス不活化・除去工程を組み込むことが難しい。より安全性の高いウシ胎児血清の供給のためにγ線照射が奨励されている (CPMP/BWP/1793/02)。通常20-25kGyだが、γ線抵抗性のウイルスを考慮し、35kGyを照射することが望ましいとされている。

### 5.3. 採取や製造工程での飛び込みウイルス

再生医療等製品の製造管理及び品質管理の基準に関する省令 (GCTP省令) を順守する。

とくに製造工程での飛び込みウイルスのリスクを低減するためには、製品の種類、構造、特性及び製造工程に応じ、清浄の程度を維持管理できる施設の構造及び設備を有すること。

塵埃又はウイルスによる汚染を防止するために必要な構造及び設備を有すること。

飛び込みウイルスに対するとどのようなリスクがあるのか、そのリスクは管理可能か、受入れ可能かという視点から達成レベルを設定すること

記録管理・バリデーションを含む清浄空調設備・無菌更衣・動線設計等によって、作業によるコンタミネーションリスクを低減させること。

### 5.2.2. ブタ由来のウイルス

ブタ由来のトリプシンは、Vero細胞、ブタ腎臓由来PK細胞、ブタ精巢由来細胞ST細胞を使ってウイルス検出が行われる。トリプシンは多くのウイルスを不活化するので、一番重要なのはブタパルボウイルスである。培養14日目には、培養細胞を免疫蛍光法によってブタパルボウイルスの有無を調べる。

ブタ由来ウイルスに関しては、ロタウイルスワクチンにPCV-1、PCV-2 DNAが汚染していたことが報告されていることから、PCV-1、PCV-2のウイルス試験も考慮すべきである。

### 6. 参考資料

- 第十六改正日本薬局方 厚生労働省告示第65号 平成23年3月24日
- 生物由来原料基準 厚生労働省告示第210号
- 厚生労働省医薬食品局長通知
- ヒト(自己)体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について(薬食発0907第2号 平成24年9月7日)
- ヒト(同種)体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について(薬食発0907第3号 平成24年9月7日)
- ヒト(自己)ipS細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について(薬食発0907第4号 平成24年9月7日)
- ヒト(同種)ipS (株) 細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について(薬食発0907第5号 平成24年9月7日)
- ヒト-es細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針(薬食発0907第6号 平成24年9月7日)
- 厚生省医薬安全局審査管理課長通知
- 「ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウイルス安全性評価」について (ICH Q5A) 医薬審第329号 平成12年2月22日
- 厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知
- 生物医薬品(バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品)製造用細胞基剤の由来、調製及び特性解析 医薬審第873号 平成12年7月14日
- 厚生労働省医政局研究開発課長通知
- 異種移植の実施に伴う公衆衛生上の感染症問題に関する指針 医政研発第0709001号 平成14年7月9日
- 「異種移植の実施に伴う公衆衛生上の感染症問題に関する指針」に基づく3T3J2株及び3T3NIH株をフィーダー細胞として利用する上皮膚の再生医療への指針 医政研発第0702001号 平成16年7月2日
- Marcus-Sekura C, Richardson JC, Harston RK, Sane N, Sheets RL, *Biologics* 2011 39(6) 359-369.

### 5.2.3. 齧歯類由来のウイルス

由来動物種に特異的なウイルスに関して合理的な試験法によって感染を否定することによりリスクを低減する。

マウス由来フィーダー細胞については、「異種移植の実施に伴う公衆衛生上の感染症問題に関する指針」に基づく3T3J2株及び3T3NIH株をフィーダー細胞として利用する上皮膚の再生医療への指針 (平成16年7月)、生物医薬品(バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品)製造用細胞基剤の由来、調製及び特性解析 (平成12年7月)、異種移植の実施に伴う公衆衛生上の感染症問題に関する指針 (平成14年7月) 等に従う。

厚生労働科学研究費補助金  
「ウシ等由来原料の基準の研究に係る分担研究」班

- ◎ 吉倉 庚 国立感染症研究所名譽所員
- 小野寺 節 東京大学大学院農学生命科学科 畜の安全研究センター
- 甲斐智恵子 東京大学医科学研究所附属実験動物施設教授
- 北本 節之 東北大学大学院医学系研究科教授
- 四方 靖 エーザイ・プロダクトクリエーションシステムズ
- 飛橋 実 国立感染症研究所感染症病理部第三室主任研究官
- 中村 好一 自治医科大学公衆衛生学教授
- 毛利 貴郎 東北大学客員教授
- 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
- 山本 茂貴 東海大学海洋学部水産学食品科学専攻教授

関連年表

	欧州	日本
1986	BSE (ウシ海綿状脳症) 報告	
1992	イギリスでのBSE発生ピーク	
1993	vCJD症例の発生	
2001		全頭検査開始、BSE撲滅
2002	欧州でのBSE発生ピーク	
2003	EFSAIによるGBR評価	原材料基準に対する通告 (平成15年告示第210号)
2008		日本での発生ピーク (10/36頭)
2007	EFSAI GBRからOIE Risk Statusへ移行	
2013		OIEによる「無視できるリスク国」認定

BSE: Bovine Spongiform Encephalopathy  
vCJD: Variant Creutzfeldt-Jakob disease  
EFSAI: European Food Safety Authority  
GBR: Geographical BSE Risk  
OIE: World Organisation for Animal Health

課題

生物由来原料に対する

- 1: 現在の原料国規制の見直し
- 2: 部位別のリスクの見直し
- 3: 最新の知見を踏まえたリスク低減法についての整理

OIEの規制を踏まえた  
生物由来原料基準改正の方向性について提言



**認定理由**

- 日本において輸入規制、動物検疫所での検査体制は、4段階評価制度(2009年11月)第1水準を達成している。
- 日本の検疫所・検査機関は、OIEのBSE検査方法(2008年)を2011年までに全頭検査に導入している。
- OIEのBSE検査方法(2008年)第1水準を達成している。
- OIEのBSE検査方法(2008年)第1水準を達成している。

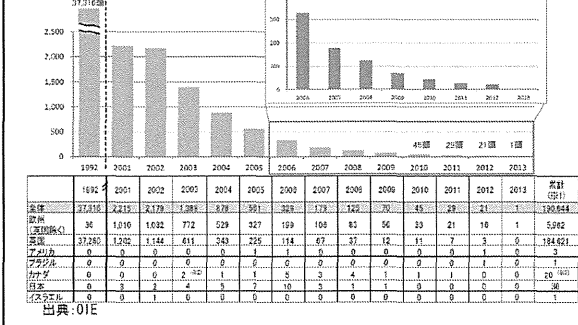
**関連法令**

- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第1号(食品衛生法第117条第1項第1号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第2号(食品衛生法第117条第1項第2号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第3号(食品衛生法第117条第1項第3号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第4号(食品衛生法第117条第1項第4号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第5号(食品衛生法第117条第1項第5号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第6号(食品衛生法第117条第1項第6号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第7号(食品衛生法第117条第1項第7号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第8号(食品衛生法第117条第1項第8号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第9号(食品衛生法第117条第1項第9号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第10号(食品衛生法第117条第1項第10号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第11号(食品衛生法第117条第1項第11号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第12号(食品衛生法第117条第1項第12号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第13号(食品衛生法第117条第1項第13号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第14号(食品衛生法第117条第1項第14号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第15号(食品衛生法第117条第1項第15号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第16号(食品衛生法第117条第1項第16号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第17号(食品衛生法第117条第1項第17号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第18号(食品衛生法第117条第1項第18号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第19号(食品衛生法第117条第1項第19号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第20号(食品衛生法第117条第1項第20号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第21号(食品衛生法第117条第1項第21号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第22号(食品衛生法第117条第1項第22号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第23号(食品衛生法第117条第1項第23号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第24号(食品衛生法第117条第1項第24号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第25号(食品衛生法第117条第1項第25号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第26号(食品衛生法第117条第1項第26号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第27号(食品衛生法第117条第1項第27号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第28号(食品衛生法第117条第1項第28号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第29号(食品衛生法第117条第1項第29号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第30号(食品衛生法第117条第1項第30号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第31号(食品衛生法第117条第1項第31号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第32号(食品衛生法第117条第1項第32号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第33号(食品衛生法第117条第1項第33号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第34号(食品衛生法第117条第1項第34号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第35号(食品衛生法第117条第1項第35号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第36号(食品衛生法第117条第1項第36号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第37号(食品衛生法第117条第1項第37号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第38号(食品衛生法第117条第1項第38号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第39号(食品衛生法第117条第1項第39号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第40号(食品衛生法第117条第1項第40号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第41号(食品衛生法第117条第1項第41号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第42号(食品衛生法第117条第1項第42号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第43号(食品衛生法第117条第1項第43号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第44号(食品衛生法第117条第1項第44号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第45号(食品衛生法第117条第1項第45号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第46号(食品衛生法第117条第1項第46号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第47号(食品衛生法第117条第1項第47号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第48号(食品衛生法第117条第1項第48号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第49号(食品衛生法第117条第1項第49号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第50号(食品衛生法第117条第1項第50号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第51号(食品衛生法第117条第1項第51号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第52号(食品衛生法第117条第1項第52号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第53号(食品衛生法第117条第1項第53号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第54号(食品衛生法第117条第1項第54号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第55号(食品衛生法第117条第1項第55号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第56号(食品衛生法第117条第1項第56号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第57号(食品衛生法第117条第1項第57号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第58号(食品衛生法第117条第1項第58号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第59号(食品衛生法第117条第1項第59号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第60号(食品衛生法第117条第1項第60号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第61号(食品衛生法第117条第1項第61号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第62号(食品衛生法第117条第1項第62号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第63号(食品衛生法第117条第1項第63号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第64号(食品衛生法第117条第1項第64号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第65号(食品衛生法第117条第1項第65号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第66号(食品衛生法第117条第1項第66号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第67号(食品衛生法第117条第1項第67号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第68号(食品衛生法第117条第1項第68号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第69号(食品衛生法第117条第1項第69号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第70号(食品衛生法第117条第1項第70号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第71号(食品衛生法第117条第1項第71号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第72号(食品衛生法第117条第1項第72号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第73号(食品衛生法第117条第1項第73号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第74号(食品衛生法第117条第1項第74号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第75号(食品衛生法第117条第1項第75号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第76号(食品衛生法第117条第1項第76号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第77号(食品衛生法第117条第1項第77号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第78号(食品衛生法第117条第1項第78号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第79号(食品衛生法第117条第1項第79号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第80号(食品衛生法第117条第1項第80号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第81号(食品衛生法第117条第1項第81号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第82号(食品衛生法第117条第1項第82号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第83号(食品衛生法第117条第1項第83号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第84号(食品衛生法第117条第1項第84号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第85号(食品衛生法第117条第1項第85号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第86号(食品衛生法第117条第1項第86号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第87号(食品衛生法第117条第1項第87号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第88号(食品衛生法第117条第1項第88号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第89号(食品衛生法第117条第1項第89号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第90号(食品衛生法第117条第1項第90号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第91号(食品衛生法第117条第1項第91号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第92号(食品衛生法第117条第1項第92号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第93号(食品衛生法第117条第1項第93号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第94号(食品衛生法第117条第1項第94号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第95号(食品衛生法第117条第1項第95号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第96号(食品衛生法第117条第1項第96号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第97号(食品衛生法第117条第1項第97号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第98号(食品衛生法第117条第1項第98号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第99号(食品衛生法第117条第1項第99号)
- 食品衛生法(昭和25年法律第117号)第117条第1項第100号(食品衛生法第117条第1項第100号)

世界のBSE発生件数の推移

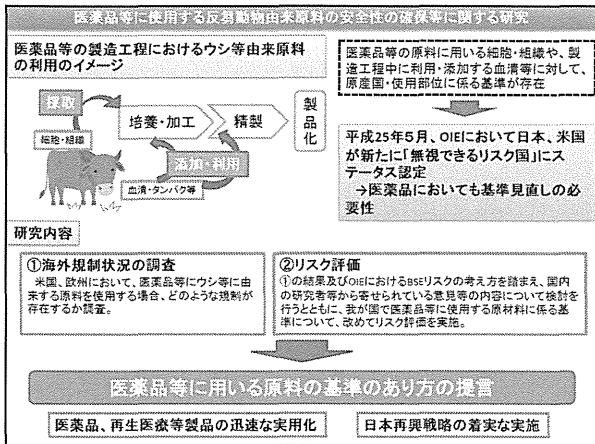
・発生ピークは1992年

・BSE対策の進展により、発生頭数は減少



生物由来原料基準 (平成15年告示第210号) について

- 薬事法第42条に基づき、保健衛生上特別の注意を要する医薬品、医薬部外品、化粧品及び医療機器について設けられた基準。
- 医薬品等に使用される人その他の生物由来する原料又は材料について、製造に使用される際に講ずべき必要な措置に関する基準を定めることにより、医薬品等の品質、有効性及び安全性を確保することを目的とするもの。
- 具体的には、生物由来の原料又は材料について、その製造段階においてウイルス、細菌等による汚染が無いことの確認(原産地、使用部位、コンタミネーションの有無、ドナーの健康状態、除去工程の有無等)を義務づけているもの。



EFSA GBR とOIE status 評価項目比較

		EFSA GBR	OIE
サーベイランスによる検証	サーベイランス	○	○
	母集団の構造	○	
	と畜前検査（高リスク牛の排除）		○
と畜処理の全プロセス	と畜場でのBSE検査（スクリーニング）		○
	スタンニングの方法		○
	ピッシング		○
	BSE プリオンを生体内分布		○
食肉等のリスク	食肉及び先進的機械回収肉（AMR）		○
	内臓		○
	関係者を対象とした周知プログラム		○
	認定機関での検査実施		○

OIEの定めるBSEステータスごとの主な要件(2013年)

ステータス	リスク評価	サーベイランス	リスク削減措置	認定を受けた国 (2013年現在) 2009年認定(2009年認定) 2010年認定(2011年認定) 2013年認定
無視できるリスク (22カ国)	英語	B型サーベイランス*を実施中	BSE発生なし輸入中のみで食品(飼料・飼育等)が7年以上かつ(飼料規制が)6年以上実施され、他のBSE感染源の懸念による感染リスクが可能なサーベイランス(例:日本のBSE監視調査)により100%の検出率を確保していること (BSE発生が検出された場合)動物への給与禁止 (国内発生あり) 上記1かつ2 過去11年以内に自国内で発生した年が発生がないこと	アルゼンチン、ウルグアイ、オーストラリア、シンガポール、ニュージーランド、フィンランド、アイスランド、ノルウェー、スウェーデン、パラグアイ ギリ インド、ペルー ボリビア、イタリ オーストリア、ベルギー、ブラジル、コロンビア イスラエル、イタリア、日本、オランダ、スロベニア、英国
管理されたリスク (27カ国)	英語	A型サーベイランス*を実施中 ①100%に達するBSE監視調査の検出可能なサーベイランス(例:日本のBSE監視調査)を実施中 ②50%以上の検出率	飼料・飼育等が行われており、また飼料の適切な規制が実施され、他のBSE感染源の懸念による感染リスクが可能なサーベイランス(例:日本のBSE監視調査)を実施中 又は 飼料規制が実施済み	カナダ、スイス、台湾 キプロス、チェコ、エストニア、フランス、ドイツ、ギリシャ、ハンガリー、アイルランド、ラトビア、リトアニア、ルクセンブルグ、マルタ、ポーランド、ポルトガル、スロバキア、スペイン、英国、リトニシユスタイン、メキシコ 台湾 クアチマ、ニカラガ ブルガリア、コスタリカ ※ 以下はBSE監視では継続しているがOIEステータスでは不明とされているもの エルサルバドル、ケニア、コスタリカ、スワジランド、ナイジェリア、ニカラガ、ニュージーランド、パキスタン、バハマス、ボリビア、モーリシャス
不明なリスク (その他の国)			無視できるリスク、管理されたリスクのいずれにも該当しない場合	

- 1: 原産国規制の見直し
- 1: SSC/EFSA GBRの2007年の再評価により、GBR評価手法の妥当性が確認されている
  - 2: EFSA GBR からOIE status認証への移行に伴うリスク増大は認められない
  - 3: OIE未評価国であるが、EFSA GBRを基に原材料の原産国として認められてきた国のリスクの増大因子は認められない
- OIE基準に沿った原産国規制への移行。
  - OIE未評価国(平成15年告示第210号では認証)のリスク増大因子は認められず、使用制限の必要はない(いずれは切り替えられるべき)

EFSA GBR とOIE status 評価項目比較

		EFSA GBR	OIE
	生体牛の輸入	○	○
	肉骨粉の輸入	○	○
	輸入された動物飼料及び飼料原料		○
侵入リスク	牛に給与された可能性がある、反芻動物由来する輸入製品		○
	牛の体内(in vivo)利用に供される、反芻動物由来の輸入製品		○
	上記物品の処分に対する疫学的調査結果		○
暴露・増幅リスク	飼料規制	○	
	自国産反芻動物群由来の肉骨粉又は獣脂が牛の生産		○
	遵守状況と交差汚染の可能性	○	○
	特定危険部位(SRM)の利用(レンダリング)	○	○
	BSEの暴露・増幅リスクシナリオ(モデル)		○

- 2: 部位別のリスクの見直し
- ア ゼラチン(コラーゲンを含む)  
これまで得られた科学的知見等から、皮及び骨由来ゼラチン(コラーゲンを含む)については、アルカリ処理等の高度処理工程を経て製造されるため、その原産国にかかわらずBSEの感染リスクは極めて低いと考えられ、低リスク原材料として使用可能と考える。なお、危険部位である骨髄や頭骨については、引き続き原材料として用いるべきではないと考える。
- イ ワン乳及び乳由来成分  
ワン乳については、海外の規制状況、最近の科学的知見等を踏まえると、現時点において、BSEの感染リスクは極めて低いと考えられ、低リスク原材料として使用可能と考える。さらに乳糖など乳由来成分については、既に海外で長年にわたり広く使用され、製品として流通しているものであることから、BSEの感染リスクは十分無視し得ると考える。
- ウ 骨炭  
骨炭は熱処理(800℃以上)により製造されるものであり、その製法条件が守られる限り、骨炭中にタンパク質成分が存在しないことから、BSEの感染リスクは十分無視し得ると考える。



3： 最新の知見を踏まえたリスク低減法についての整理

- 1： 原料として使用可能な原産国、使用部位の指定
- 2： ウシ化マウスを用いたバイオアッセイデータを基にした希釈値の指標： $10^{-9}$   
(ウシ化マウスへのc-BSE由来プリオン接種における検出限界希釈値： $10^{-5}$ ~ $10^{-6}$ 、リスクマージン： $10^{-3}$ )
- 3： 非定型BSEに対するリスクは、現行のc-BSEに対する規制によりクリアされる  
(フランスでの発生頻度(100万頭あたり)  
H-BSE: 0.41、L-BSE:0.35、発症年齢: 6.3~18歳  
(日本での23か月齢を除く))

おわりに

ウシ由来原料に係るリスクに関する科学的知見は、日々集積しており、それらの知見等を踏まえ、医薬品等の医療におけるリスク・ベネフィットを考慮の上、時代に合った原料規制の見直しを今後も進めるべきである。

平成26年7月、パブリックコメント募集

生物由来原料基準の一部を改正する件(案)に関する意見の募集について

平成26年7月  
厚生労働省医薬品部医薬品課  
厚生労働省医薬品部医薬品課

生物由来原料基準(平成19年厚生労働省令第210号)は、薬事法(昭和35年法律第145号)第42条第1項(第45条の4において準用する場合を含む。)及び第2項の規定に基づき、医薬品、医薬部外品、化粧品及び医療機器に使用される人その他の動物に由来する原料等について、製造に使用される際に満たすべき必要な措置に関する基準を定めたものです。

今回、平成25年11月に薬事法等の一部を改正する法律(平成25年法律第84号)が成立し、新たに再生医療等製品が医薬品、医療機器と併列し、法律上位置付けられることとなったこと等を踏まえ、本基準の一部改正を予定しております。

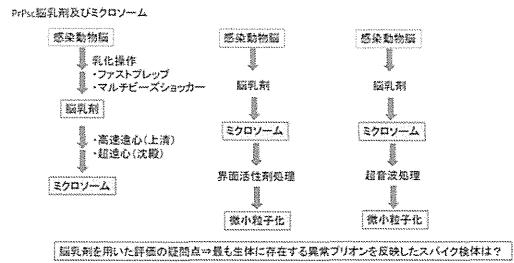
つきましては、生物由来原料基準の一部を改正する件(案)の概要に関して、御意見のある場合には、下記より御提出をお願いいたします。

平成26年11月、薬事法の一部改正施行

### バイオ医薬品の異常プリオンに対するリスク評価

- 原材料のプリオン安全性評価
  - 生物由来基準反芻動物基準
  - 原材料の異常プリオン検査は限界がある
- 工程のプリオンクリアランス能評価
  - 不活化工程はほぼ不可能
  - 除去工程としてクロマトグラフィーやナノフィルトレーション
  - 工程前後での異常プリオンの定量評価が求められる
  - 感染性評価と物理的定量法
- 製品の検査
  - ほぼ不可能

### プリオン除去工程評価のための試料調製



### 異常プリオンの定量的検出法

- プロテイナーゼK抵抗性プリオン蛋白質のWB検出
  - インビボ法に比べて1/1000ほどの感度
- 動物接種実験
  - プリオンタンパク質を過剰発現したマウス脳内への接種(1年間)
  - 定量的評価には膨大なリソースが必要
  - プリオンタンパク質の種の壁
- プリオン試験管内増幅 (PMCA)
  - 反応条件の不安定性(検体ごとに最適化が必要)
  - プリオンタンパク質の種の壁
- プリオン高発現細胞を用いたインビトロプリオン増幅による検出法
  - 細胞でのプリオン増幅は生体でのPrPcからPrPScの変換を反映している可能性
  - 現時点では十分に確立された方法とはいえないが、プリオン除去能を感染性を指標として最も迅速に評価可能な方法として期待されている
- その他の方法

### スパイク検体の作製法によってプリオンクリアランスが大きく異なる

フィルター	低速遠心(上清)		高速遠心(上清)	
	タイター(log LD50/g組織)	LFU	タイター(log LD50/g組織)	LFU
100nm	6.6 +/- 0	2.5	5.0 +/- 0.1	0.9
75nm	6.4 +/- 0.1	2.5	4.9 +/- 0.2	1.4
35nm	6.3 +/- 0.2	2.8	4.5 +/- 0.3	1.4
2μm PAF	4.9 +/- 0.4	4	4.1 +/- 0.3	1.6
4μm PAF	4.5 +/- 0.5	4.1	4.2 +/- 0.3	1.7
2μm CV20				
1層目	4.7 +/- 0.3	4.2	4.2 +/- 0.4	1.7
2層目	4.2 +/- 0.3	4.7	4.0 +/- 0.2	1.9
3層目				
4層目				
5層目				
6層目				
7層目				
8層目				
9層目				
10層目				
11層目				
12層目				
13層目				
14層目				
15層目				
16層目				
17層目				
18層目				
19層目				
20層目				
21層目				
22層目				
23層目				
24層目				
25層目				
26層目				
27層目				
28層目				
29層目				
30層目				
31層目				
32層目				
33層目				
34層目				
35層目				
36層目				
37層目				
38層目				
39層目				
40層目				
41層目				
42層目				
43層目				
44層目				
45層目				
46層目				
47層目				
48層目				
49層目				
50層目				
51層目				
52層目				
53層目				
54層目				
55層目				
56層目				
57層目				
58層目				
59層目				
60層目				
61層目				
62層目				
63層目				
64層目				
65層目				
66層目				
67層目				
68層目				
69層目				
70層目				
71層目				
72層目				
73層目				
74層目				
75層目				
76層目				
77層目				
78層目				
79層目				
80層目				
81層目				
82層目				
83層目				
84層目				
85層目				
86層目				
87層目				
88層目				
89層目				
90層目				
91層目				
92層目				
93層目				
94層目				
95層目				
96層目				
97層目				
98層目				
99層目				
100層目				

### BSEのリスク評価と検出手法の妥当性

- FDA: 米国における赤血球製剤のvCJDリスク評価
  - イギリスにおいて手術で除去された扁桃腺のプリオン陽性比率から推定されるvCJD発症リスク(WB)による検出が高リスク評価)
  - 感染部位のインビボアッセイに基づくリスク評価(低リスク)
  - vCJD感染ウシ由来神経等、これまでにPrPc-Tgマウスを用いたアッセイからは陰性とされてきた臓器に関してもPMCAで陽性反応が見られている(e.g. 唾液)
  - これらの部位についてはインビボアッセイ法では感染性が無い
- WB法やPMCA法で検出されている陽性部位から推定したリスクに基づけば英国でのvCJD発症は非常に多数に上るはず
- また、英国滞在歴のある米国人のvCJD発症件数も低リスクとする予想と一致
- プリオンの製造工程でのクリアランス能の評価には、高精度で、迅速性のあるプリオン感染能を定量評価できる手法が必要

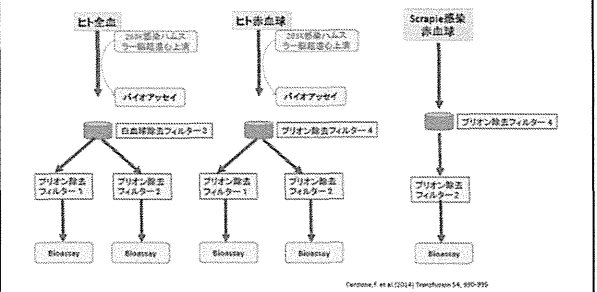
### プリオンクリアランス評価を行うために最も適したスパイク検体と感染性の評価法

汚染原の特性を考慮したスパイク材料を調製する必要  
 例えばウシ血清由来プリオンの混入が懸念される場合⇒血中でのプリオンの存在状態を想定  
 プリオンタイターの測定  
 PMCA  
 プロテアーゼK耐性プリオンのWB  
 インビトロ細胞培養系  
 マウス脳内接種

ナノフィルターを用いたプリオンタンパク質除去能の評価

Spine	膜厚	孔径	材料	評価	アッセイ	備考
75k 膜厚	25nm	15nm	膜	4.9	エンドポイント	Tanaka(2001)
	25nm	15nm	膜	4.9	エンドポイント	Tanaka(2001)
	25nm	15nm	膜	4.9	エンドポイント	Tanaka(2001)
	25nm	15nm	膜	4.9	エンドポイント	Tanaka(2001)
140k スパイク	25nm	15nm	膜	1	エンドポイント	Fischer(2002)
	25nm	15nm	膜	1	エンドポイント	Fischer(2002)
	25nm	15nm	膜	1	エンドポイント	Fischer(2002)
	25nm	15nm	膜	1	エンドポイント	Fischer(2002)
127k スパイク	25nm	15nm	膜	4.4	細胞培養アッセイ	Yoo(2002)
	25nm	15nm	膜	4.4	細胞培養アッセイ	Yoo(2002)
	25nm	15nm	膜	4.4	細胞培養アッセイ	Yoo(2002)
	25nm	15nm	膜	4.4	細胞培養アッセイ	Yoo(2002)
91k 90k	25nm	15nm	膜	2.3	エンドポイント	Kim(2007)
	25nm	15nm	膜	2.3	エンドポイント	Kim(2007)
	25nm	15nm	膜	2.3	エンドポイント	Kim(2007)
	25nm	15nm	膜	2.3	エンドポイント	Kim(2007)
61k 60k	25nm	15nm	膜	0.7	バイオアッセイ	Tanaka(2001)
	25nm	15nm	膜	0.7	バイオアッセイ	Tanaka(2001)
	25nm	15nm	膜	0.7	バイオアッセイ	Tanaka(2001)
	25nm	15nm	膜	0.7	バイオアッセイ	Tanaka(2001)
41k 40k	25nm	15nm	膜	0.1	バイオアッセイ	Tanaka(2001)
	25nm	15nm	膜	0.1	バイオアッセイ	Tanaka(2001)
	25nm	15nm	膜	0.1	バイオアッセイ	Tanaka(2001)
	25nm	15nm	膜	0.1	バイオアッセイ	Tanaka(2001)
21k 20k	25nm	15nm	膜	0.1	バイオアッセイ	Tanaka(2001)
	25nm	15nm	膜	0.1	バイオアッセイ	Tanaka(2001)
	25nm	15nm	膜	0.1	バイオアッセイ	Tanaka(2001)
	25nm	15nm	膜	0.1	バイオアッセイ	Tanaka(2001)

### 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





## 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

大阪大学微生物病研究所  
生田 和良、黒須 剛

日本血液製剤機構研究開発本部  
袖木 幹弘、上平 崇、坂井 薫

### 課題

- Scrapie 263Kを用いた評価
  - WB法及びBA法の確立
  - 工程評価用プリオンサンプル調製法の最適化
  - 工程評価の実施
- Prion除去デバイスの検索
  - 新規でデバイスの探索
- Mouse adapted vCJDを用いた評価
  - WB法及びBA法の確立
  - 工程評価用プリオンサンプル調製法の最適化
  - 工程評価の実施
  - Scrapie 263Kとの比較
- PrP<sup>Res</sup>持続感染細胞を用いた検討
  - 細胞由来PrP<sup>Res</sup>の性状解析
  - 工程評価の実施
  - MFとの比較
- Cell based infectivity assayの検討
  - Detector cellの探索、接種実験の実施

## 背景・目的

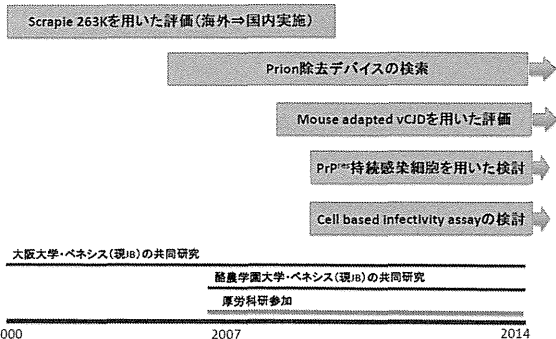
- バイオ医薬品へのプリオン混入リスクの顕在化
- バイオ医薬品の製造工程におけるプリオン安全性の確立
- プリオン除去評価手法の最適化と問題点の整理
- 除去工程の評価
- 除去デバイスの検索

## 使用するプリオン株の特性

	優位点	改善点
Scrapie 263K	<ul style="list-style-type: none"> <li>一般的に使用されている</li> <li>高Titerのプリオンが得られる</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>国内では農水省の許可が必要</li> <li>In vitroでもP3相当の施設が必要</li> </ul>
mo-vCJD	<ul style="list-style-type: none"> <li>よりvCJDに性状が近い</li> <li>農水省などの許可が不要</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>使用実績がない(BBが唯一使用実績)</li> </ul>

## これまでの研究経緯

(主に大阪大学は*in vitro*、酪農学園大学は*in vivo*を分担)



## 工程評価用プリオンサンプルの特性

	優位点	改善点
Brain Homogenate (BH)	<ul style="list-style-type: none"> <li>高Titerのプリオンが得られる</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>不均一で巨大な粒子径(除菌フィルターより大きな中央値)</li> </ul>
Microsomal Fraction (MF)	<ul style="list-style-type: none"> <li>精製度が比較的高い</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>不均一で大きな粒子径(除菌フィルターより大きな中央値)</li> </ul>
Detergent treated MF (dMF)	<ul style="list-style-type: none"> <li>安定した粒子径分布で除菌フィルターを通過</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Detergentを除く必要あり</li> </ul>
Super sonicated MF (sMF)	<ul style="list-style-type: none"> <li>安定した粒子径分布で除菌フィルターを通過</li> </ul>	
超遠心上清*	<ul style="list-style-type: none"> <li>より小さな粒子径</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>高Titerのものが得られない</li> </ul>
NEXT GENERATION	<ul style="list-style-type: none"> <li>より現実に入用するプリオンの性状に近い</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>高Titerのプリオンの取得</li> </ul>
PrP <sup>Res</sup> 持続産生細胞		<ul style="list-style-type: none"> <li>使用実績がない</li> </ul>

\*: 私たちの検討実績なし

現在は多くの評価機関で界面活性剤処理又は超音波処理したMFが使用されている

### プリオン検出法の特性

	優位点	改善点
WB	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 手技が容易で結果がでるまでの期間が短い</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 検出感度が低い</li> <li>• 感染性(病原性)で評価していない</li> </ul>
BA(動物実験)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 感染性(病原性)で評価</li> <li>• 現時点でもっとも感度が高い</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• テクニクを要し、結果が出るまでの期間が非常に長い</li> </ul>
PMCA*	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 比較的高感度で、結果が出るまでの期間も短い</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 不安定</li> <li>• 被検検体の組成毎に最適化が必要</li> </ul>
NEXT GENERATION Cell based infectivity assay	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 感染性で評価</li> <li>• WBよりも感度が高い</li> <li>• 結果が出る期間も動物実験に比べると短い</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 一部報告が有るものの、系が樹立していない</li> </ul>

\*: 私たちの検討実績なし

WB法で一次評価し、検出限界以下にまで除去できたものについてBAを実施するのが良い

### 今回の発表内容

1. vCJDを直接用いた評価系の確立
2. Bio Assay法に替わる Cell-based infectivity assayの検討

10

### プリオン除去デバイスの特性

	優位点	改善点
ウイルス除去膜 (Planova)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 現時点でもっとも優れたSize exclusion filter</li> <li>• 膜の品質は安定</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 15nmのろ過膜といえどもろ液に感染性が認められるケースがある</li> </ul>
デブスフィルター	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 膜孔径が大きいにも関わらず電気的にプリオンを吸着</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 膜の品質が不安定</li> <li>• 液組成によってその除去能力が大きく変化する</li> <li>• 吸着容量が大きくない</li> </ul>
バイロジェン除去フィルター (Mustang)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 膜孔径が大きいにも関わらず電気的にプリオンを吸着</li> <li>• 膜の品質は安定</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 液組成によってその除去能力が大きく変化する</li> <li>• 吸着容量が大きくない</li> </ul>
Que Speed D	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 膜孔径が大きいにも関わらず静電的にプリオンを吸着</li> <li>• 膜の品質は安定</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 液組成によってその除去能力が大きく変化する</li> <li>• 吸着容量が不明</li> </ul>

粒子径によるろ過と電気的吸着によるろ過の組み合わせが良い

### 背景と目的

1. vCJDを直接用いた評価系の確立
- 263Kに替わるvCJDを用いた評価系の確立 -

- 263KとvCJD/BSEでは性状が異なる
- よりNatural formに近いと考えられるmo-vCJDを用いた評価系をつくる

11

### これまでの成果

- Scrapie 263K及びmo-vCJDを用いた評価法を確立した
- この手法を用いてプリオン除去デバイス・工程の除去能力を評価した
- 異常型プリオン持続産生細胞由来のプリオンの特性を評価中
- Cell based infectivity assayを評価中

### 評価法の設定

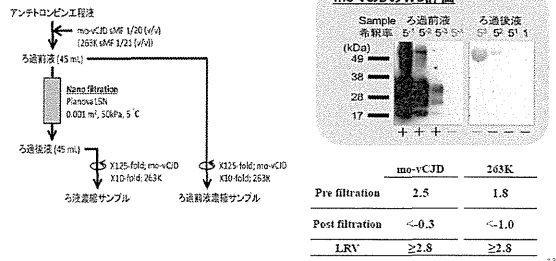
#### WB法による評価の為の条件設定

- Proteinase K (PK)処理の条件設定 (PrP<sup>res</sup>検出)
    - 脳乳剤を用いて最適化に成功
    - 例) 1%脳乳剤では5 µg/mLのPK処理
  - 抗体の選択と抗原抗体反応の最適化
    - マウスPrPを高感度で検出できる抗体を選定
    - WB反応の最適化にも成功
- 1次抗体: anti-mouse PrP clone. 6D11 (covance)

12

## 製剤への応用 (1)

アンチトロンビン製剤 (ATIII製剤)  
平均孔径15 nmのウイルス除去膜工程への応用



## 背景と目的

### 2. Bio Assay法に替わる Cell-based infectivity assayの検討

- ・プリオン除去評価におけるWB法の限界  
→WBにて検出限界以下のろ液でもBio Assayにて感染性を認めた例がある (感度の違い)
- ・Bio Assayは高感度だが、期間 (長)、コスト (高)

➔ 動物実験ではなく、培養細胞を用いた高感度感染性評価法の確立を目指す

## 製剤への応用 (2)

アンチトロンビン製剤、フィブリノゲン製剤への応用  
1. 膜孔径によるろ過 (ウイルス除去膜)  
2. 電荷による吸着除去 (Qyu Speed D)の検討

膜孔径によるろ過				電荷による吸着除去		
Filter	P25	P20	P15	Filter	Qyu Speed D	
Preparation	Fibrinogen	Fibrinogen	Antifibrinogen	Preparation	PBS	Fibrinogen
Before filtration	2.7	2.6/2.6	2.5	Before filtration	4.6	3.2
Titer				Titer		
Filtrate	1.5	<-0.9/<-0.9	<-0.3	Filtrate	1.1	<-0.3
LRV	1.2	≥3.5	≥2.8	LRV	3.5	≥3.5

1. 平均孔径19、15 nmのウイルス除去膜では効果的に除去できる
2. 電荷による除去もフィブリノゲン組成では有効

## 材料

1. RK13 mo1細胞株 (Dr. Didier Viletteより分与)
  - Doxycycline (Dox)の添加により、マウスPrP<sup>C</sup>を安定に強発現する (Tet/on system)
  - 培地交換のみで長期間の生育を維持することが可能
2. 感染材料; mo-vCJD感染マウス脳由来  
Super sonicated Microsomal Fraction (sMF)
  - 脳乳剤調製後、超遠心法にて膜画分を分離し、高出力超音波処理を行い、凝集をほぐしたもの

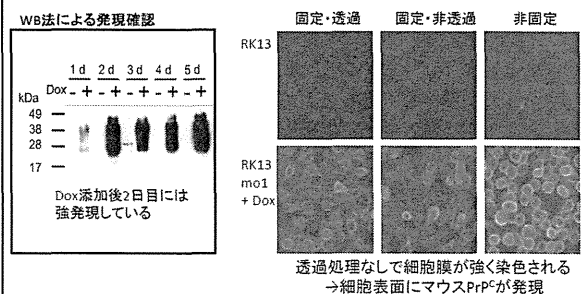
## 小括

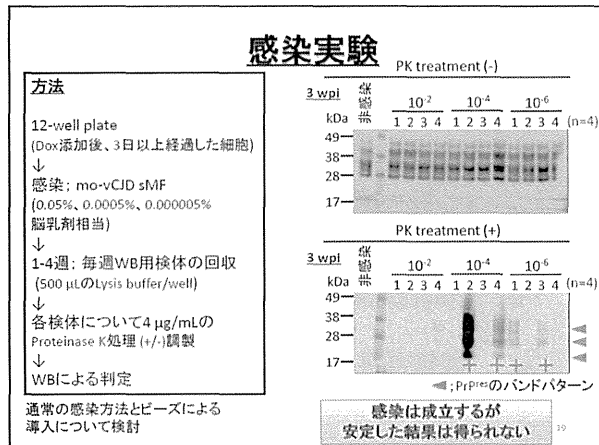
- 263Kとmo-vCJDの評価系には平行性を認めた
- これまでの263Kの結果は利用可能
- 膜孔径によるろ過、電荷吸着除去の有効性を確認 (製剤製造工程での評価が可能)



新たにmo-vCJDでの評価系を確立した

## PrP<sup>C</sup>発現確認





### 小括

- sMFを培地に添加する感染方法では、感染後4週目にPr<sup>Pres</sup>のシグナルを検出した
- すべての細胞で感染が成立とはならない
- シグナルが弱く安定した結果は得られていない

安定した結果を得るためには  
更なる条件検討が必要である

### 総括

vCJDを直接用いた評価系の確立

mo-vCJDを用いたWB評価法は製剤の工程評価への応用が可能であり、平均孔径19、15 nmのウイルス除去膜はmo-vCJDを効果的に除去できることを確認した

Cell-based infectivity assayの検討

RK13 mo1細胞を用いたmo-vCJDの感染性評価系の検討は、感染は認められたが安定した結果が得られるまではいかなかった

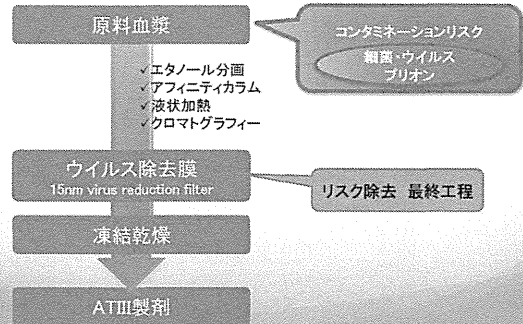
⇒更なる条件設定が必要である

平成26年度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  
ウイルス等感染性因子安全性評価に関する研究 全体班会議  
H27.1.14

## 異常型プリオンの *in vivo*検出系の評価に関する研究

酪農学園大学  
萩原克郎、森ゆうこ、岡本実  
日本血液製剤機構  
上平崇、坂井薫、柚木幹弘

## 血漿分画製造工程概略 例: アンチロトビン(ATIII)



## これまでの研究経緯

Scrapie 263Kを用いた評価(海外⇒国内実施)

Prion除去デバイスの検索

Mouse adapted vCJDを用いた評価

PrP<sup>Sc</sup>持続感染細胞を用いた検討

Cell based infectivity assayの検討

大阪大学・ベネクス(現JB)の共同研究

酪農学園大学・ベネクス(現JB)の共同研究

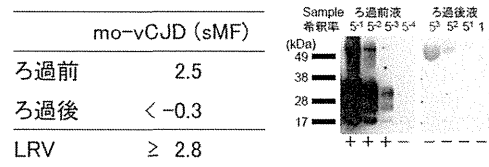
厚労科研参加

2000

2007

2014

## ウイルス除去膜(15nm)を用いた プリオン(mo-vCJD)除去能評価

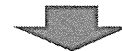


\* 数値表記はWestern Blot法によるタイターの log<sub>10</sub>  
\* sMF; super-sonicated microsomal fraction  
\* LRV; Log reduction value

## バイオ医薬品製造工程における 異常型プリオン検出評価

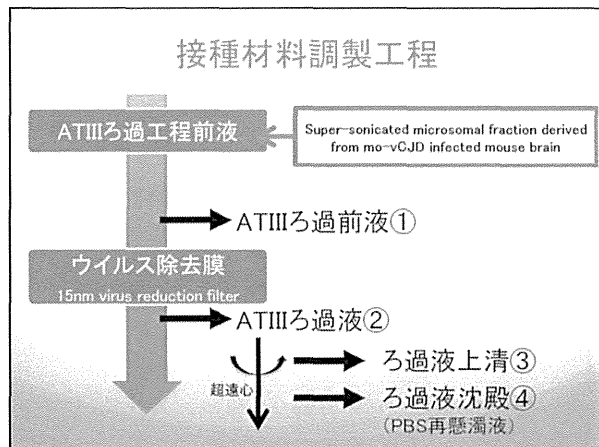
## WB法とBio Assay法

- Western Blotting (WB)法による接種材料のPrP<sup>Sc</sup> 検出
  - 125倍希釈まで検出可、625倍以上の希釈は検出不可
- WB法によるPrP<sup>Sc</sup> 除去能力評価(Log reduction value: LRV)
  - LRV ≥ 2.8



mo-vCJD感染モデルマウス(BA法)により  
ウイルス除去膜のPrP<sup>Sc</sup> 除去効果を評価した





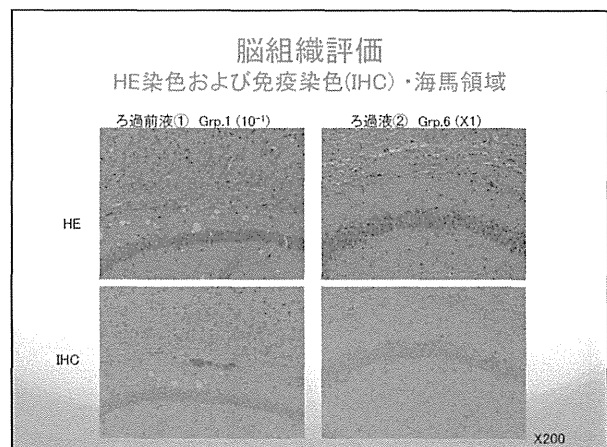
### 臨床評価スコアの推移

Grp.	Inoculum		dpi									
	dilution		28	55	84	112	140	168	175	189	>200	
1	$10^{-1}$		0.0	0.0	1.0	1.8	1.7	2.0	2.8	-	-	
2	$10^{-2}$		0.0	0.0	1.0	0.0	1.5	1.5	1.0	3.2	-	
3	ろ過前液①	$10^{-3}$	0.0	0.0	1.0	0.3	1.7	1.8	2.0	1.6	2.3	
4		$10^{-4}$	0.0	0.0	1.0	1.0	2.0	2.0	2.0	2.0	1.7	
5		$10^{-5}$	0.0	0.0	1.0	2.0	2.0	2.0	2.3	-	-	
6		X1	0.0	0.0	1.0	0.0	1.5	1.2	1.8	1.0	1.7	
7	ろ過液②	$10^{-1}$	0.0	0.0	1.0	0.0	1.5	1.8	1.8	1.5	1.5	
8		$10^{-2}$	0.0	0.0	1.0	0.0	2.2	2.0	2.0	1.7	1.4	
9	ろ過液上清③	$2^{-1}$	0.0	0.0	1.0	1.0	0.8	1.2	1.7	1.2	1.5	
10	ろ過液沈殿④	100倍濃縮	0.0	0.0	1.0	2.0	1.8	2.2	2.6	-	-	

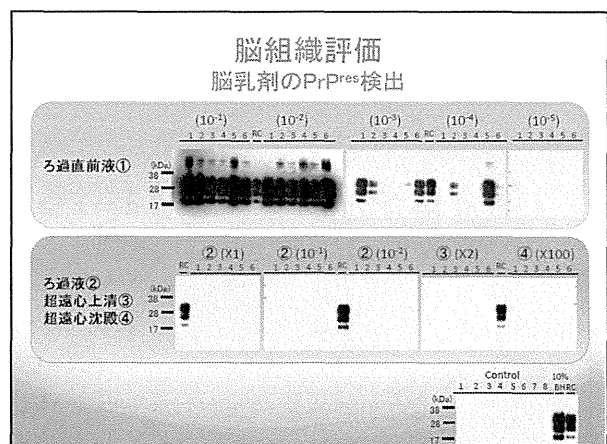
異常有→1、傾向有→0.5、異常無→0、としてスコア化した群の平均値  
赤字はTerminal illにおける評価

### 試験群内訳

group No.	接種材料	希釈
1		$10^{-1}$
2		$10^{-2}$
3	ATIII ろ過前液①	$10^{-3}$
4		$10^{-4}$
5		$10^{-5}$
6		X1
7	ATIII ろ過液②	$10^{-1}$
8		$10^{-2}$
9	ATIII ろ過液上清③	$2^{-1}$
10	ATIII ろ過液沈殿④	100倍濃縮
CN	ATIII 直前液(vCJD添加無)	X1



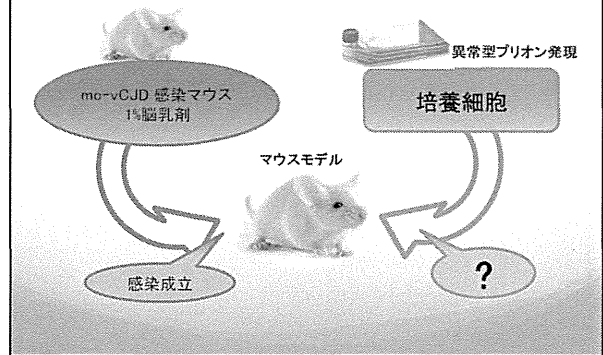
- ### 接種および評価法
- マウス: FVB/NJcl(4週齢、6頭/群)
    - 接種: 右脳、 $30 \mu\text{L}$ /頭
  - 臨床評価
    - 体重
    - 状態+行動 評価 ;12項目
    - End point 約200dpi
    - 臨床評価3ポイント以上でTerminal ill (TI)
  - 組織評価 (End point)
    - HE染色 (大脳、視床下部・間脳、脳幹、小脳)
    - 免疫組織化学染色 (Mab: 6D11)
    - Western Blot法 (Mab: 6D11)
- 



### Bio Assay 結果一覧

group No.	Inoculum dilution	T1 or Endpoint dpi	WB		HE		IHC	
			positive rate(%)		positive rate(%)		positive rate(%)	
1	10 <sup>-1</sup>	177	8/8	100	6/6	100	8/8	100
2	10 <sup>-2</sup>	189-194	6/6	100	6/6	100	6/6	100
3	ろ過前液①	203	4/8	67	6/6	100	8/8	100
4	10 <sup>-4</sup>	203	3/8	50	2/6	33	4/8	67
5	10 <sup>-6</sup>	177	0/8	0	0/6	0	0/8	0
6	X1	206	0/6	0	0/6	0	0/6	0
7	ろ過液②	10 <sup>-1</sup>	206	0/6	0	0/6	0	0/6
8	10 <sup>-2</sup>	206	0/6	0	0/6	0	0/6	0
9	ろ過液上清③	2 <sup>-1</sup>	204	0/6	0	0/6	0	0/6
10	ろ過液沈殿④	100倍濃縮	151-176	0/6	0	0/6	0	0/6
CN		203	0/6	0	0/6	0	0/6	0

### 目的

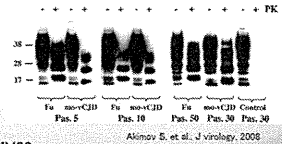
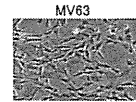
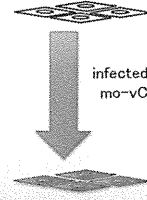


### Bio Assay による バイオ医薬品製造工程のPrP検出評価

- Bio Assay法→Western Blot法よりも高感度評価可能
- 接種材料PrP<sup>res</sup>検出
  - Western Blot法→625倍希釈まで
  - Bio Assay法→10000倍希釈まで
- Bio Assay法 ウイルス除去膜(15nm)ろ過後のID<sub>50</sub>/ml
  - WB判定: 5.19 / <1.02 LRV: ≥4.17
  - HE判定: 5.36 / <1.02 LRV: ≥4.34
  - IHC判定: 5.69 / <1.02 LRV: ≥4.67
- LRV (Log reduction value) の比較
  - Western Blot法→ ≥ 2.8
  - Bio Assay法→ ≥ 4.2

### mo-vCJD 持続発現細胞株

マウス脾臓間質細胞 (SC-SP)

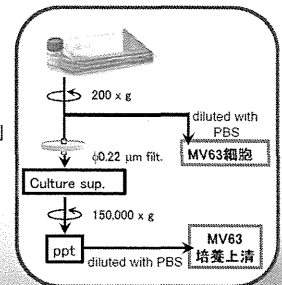


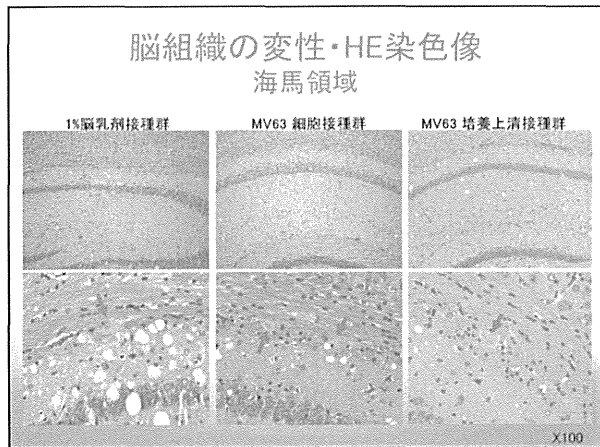
mo-vCJD tSC-SP; subclone MV63  
\* American Red Cross より分与

### PrP<sup>res</sup>持続発現細胞由来 プリオン蛋白の マウスへの伝達性

### 供試動物・接種材料

- マウス:
  - FVB/NJcl 4週齢(♀)
  - 6頭/群
- 接種材料:
  - mo-vCJD 感染マウス由来1% 脳乳剤
  - MV63細胞(抽出画分)
  - MV63細胞培養上清
- 接種部位:
  - 右脳、30 μL/head

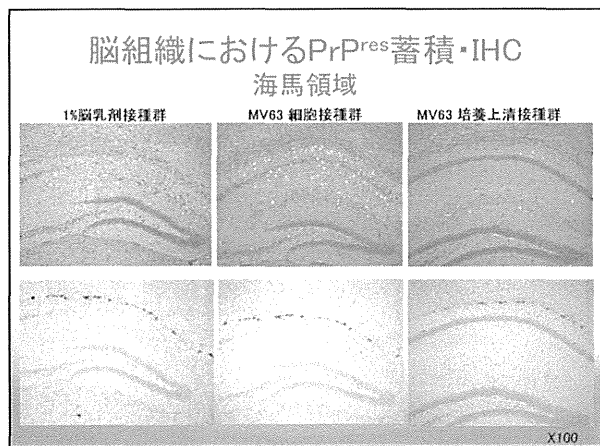




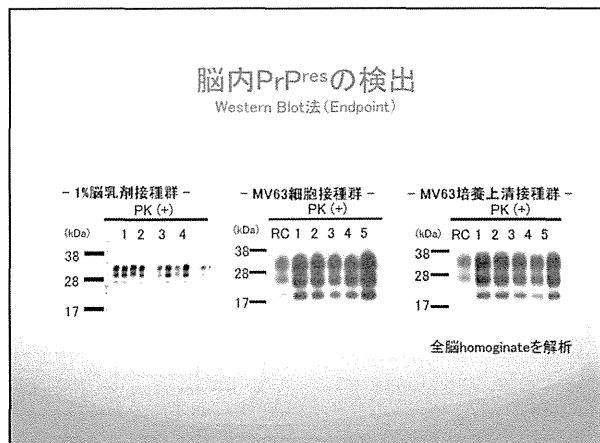
### mo- $\nu$ CJD持続発現細胞由来 プリオン蛋白の伝達性

	End point 平均dpi	臨床所見	脳組織			
			組織変性 (HE)	PrP <sup>res</sup> 蓄積(IHC)	WB(大脳) 陽性頭数	PrP <sup>res</sup> 陽性率(%)
1%脳乳剤	160	++	++	+	6/6	100
MV63 細胞	160	++	++	+	6/6	100
MV63 培養上清	200	±	+	+	6/6	100
Control	200	-	-	-	0/6	0

✓ $\nu$ CJD持続発現細胞(MV63)はマウスへの伝達性 有  
MV63を用いたプリオン感染評価が可能  
✓細胞培養上清画分も感染性因子が含まれる



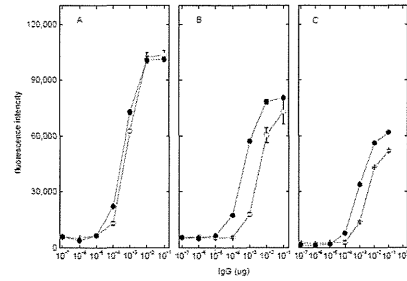
- ### 異常型プリオン*in vivo*検出評価系 総括
- Western Blot法よりも高感度に異常型プリオンを検出
  - 医薬品製造工程におけるウイルス除去膜のプリオン除去能評価
  - 異常型プリオン(PrP<sup>res</sup>)持続発現細胞由来プリオン
    - マウスモデル系(発症モデル)
    - PrP<sup>res</sup>持続発現細胞の培養上清中に感染性プリオン存在
  - 今後
    - PrP<sup>res</sup>発現細胞由来プリオンを用いた評価
    - PrP<sup>res</sup>発現細胞由来プリオン分子の感染特性





# 異常型プリオンの新規検出法に関する試験研究

平成27年1月14日  
国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部  
菊池裕



**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.



## 研究目的

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。

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) がヒト正常型プリオン蛋白質 (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)。

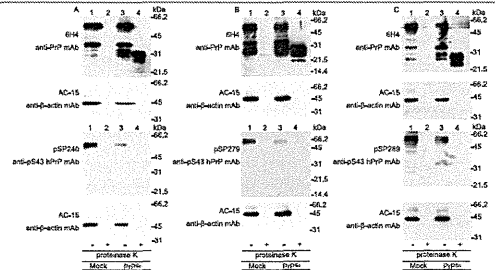
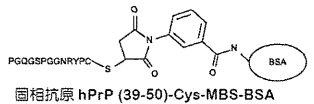
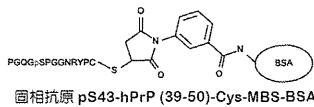
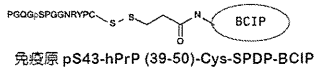
PrP<sup>Sc</sup>が形成される初期にリン酸化S43 (pS43) への変換が予測され、pS43を含む周辺のアミノ酸配列を特異的に認識する抗体は、プリオン病の早期診断への利用が期待される。これらの知見から、ヒトPrPのN端側43残基Serがリン酸化されたプリオンペプチドを特異的に認識するモノクローナル抗体 (mAb) を作製した。



Table 1. 抗リン酸化プリオン蛋白質抗体の特異性

抗体	アイソタイプ	抗体価*		比率
		リン酸化プリオンペプチド	プリオンペプチド	
pSP240	K, Y2b	2,941	2,000	1.5
pSP279	K, Y2b	2,500	294	8.5
pSP289	K, Y2b	1,111	233	4.8

\*IgG 200 µg/ml



## Immunoblot analysis of mouse PrP<sup>Sc</sup>.

The mock or PrP<sup>Sc</sup> inoculated mouse brain were prepared. (A) Formation of a protease-resistant form of PrP in mouse brain. Methanol-precipitated brain lysates (50 µg protein) were treated with proteinase K (50 µg/ml) for 30 min at 37°C (lanes 2 and 4) or left undigested (lanes 1 and 3). All lysates were subjected to immunoblot with the 6H4 (upper panel) or anti-pS43 hPrP mAbs (A, pSP240; B, pSP279; C, pSP289).