

gccataagaacaggtacagacattgtca-FITC
 HHV8
 F-agccgaaaggattccacat
 R-tccgtgtgtctacgtccag
 LCRed640-tgatctatataaccaccaatgtgtcattatg-p
 ccgatgatgtaaatatggcggaac-FITC
 ParvoB19
 F-ccgccaagtacaggaanaac
 R-cagctacactccacgca
 LCRed640-caccagggtagatcaaaaaatgcgtgga-p
 gcaaaagccattttaggcgggca-FITC
 BKV、JCV
 F-cacttttggggacctagt
 R-ctctacagtagcaagggatg
 LCRed705-agtagctgaaattgctgctggagaggctgct-p
 tctgaggctgctgctccacagatttt-FITC
 PCR反応：95°C2分処理後、95°C2秒、58°C15秒、
 72°C15秒の反応を50サイクル行った。
 検出操作：PCR反応終了後、メルティング解析
 を行ない、各ウイルスに対応したTm値のピー
 クの有無からウイルスゲノムの存否を判定し
 た（Tm値は以下の通り：A HSV-1;57°C,
 HSV-2;70°C, VZV 62°C, ParvoB19 65°C [LCRed
 640で検出], CMV;61°C, HHV-6;54°C, BKV66°C,
 JCV70°C [LCRed705で検出] B EBV 63°C
 [LCRed 640で検出], HHV-7 58°C, HHV-8 63°C
 [LCRed 705で検出], β -グロビン 52°C
 [LCRed 640で検出]

4. iPS細胞の培養

細胞株：201B7株 (RBRC-HPS0063)

培地：AK03 (味の素)

5. ウイルスストックの作成

1) HSV1:Vero細胞にHSV1 (Strain F)を感染
 し、37°Cで培養した（培養液；
 RPMI1640+2%FCS）。ほとんどの細胞にCPEが
 広がった時点で培養液を回収し、0.8 μ mのフ
 ィルターで細部成分を除去しウイルス液と

した。得られたウイルス液を10⁻¹~10⁻⁵まで
 段階希釈Vero細胞に加え、プラークアッセ
 イにより感染価を測定した。

2) CMV:ヒト正常胎児肺由来二倍体線維芽細
 胞株HFL-1細胞にCMV (Towne株)を感染し、
 37°Cで培養した(培地;Eagle MEM + 2%FCS)。
 15日目に培養上清を回収しCMVウイルス液
 とした。ウイルス感染価はHFL-1を用いてプ
 ラークアッセイにより測定した。

3. ウイルスゲノム定量系の作成

ウイルス遺伝子の定量：LightCycler 480
 (ロシュ)を用いたqPCRにより定量した。

PCR試薬：AccuPrime Taq DNA Polymerase
 System、Invitrogen社。

プライマー、プローブの配列は下記の通り。

HSV1

F Primer : cgcatcaagaccactctc

R Primer : gtcagctcgtgrttctg

Probe: 6FAM-agtacgacgacgacgacccgac-BHQ

CMV

F Primer : tcgcccgaagagg

R Primer : cggccgattgtggatt

Probe:

6FAM-Caccgacgaggattccgacaacgc-BHQ

6. ウイルスmRNA検出系の作成

1) mRNA検出の標的遺伝子

a. HSV1: ICP4, gB

b. CMV: IE1, UL89

2) RNA抽出 RNeasy mini kit (QIAGEN)に
 よりウイルス感染細胞からtotal RNA抽出を
 行い、その後DNase I (TaKaRa)処理を行っ
 た。

3) mRNAの定量 RT反応 50°C 30分 PCR
 反応 94°C15秒、54°C30秒、72°C30秒
 40cycleでRT-PCR反応を行った。

RT-PCR試薬はSuperScript III OneStep
 (Invitrogen)を使用した。

プライマー・プローブ配列以下の通り。

HSV1 (ICP4)

F Primer : cgtggggtccggatacg

R Primer : acgacgatgacggggac

Probe: 6FAM-agtacgacgacgcagccgac -BHQ

HSV1 (gB)

F Primer : cgcacgaagaccacctctc

R Primer : gtcagctcgtgtrttctg

Probe: 6FAM-agtacgacgacgcagccgac-BHQ

CMV1 (IE1)

F Primer : ccaaggtgccacggcc

R Primer : tgtaacctctctcaacatagtct

Probe: 6FAM-tgccaaggccacgacgttctg -BHQ

CMV (UL89)

F Primer : cagcagcaartggaagttttg

R Primer : ggcgcttttgccagttg

Probe: 6FAM-ctcggatgctgttggttgta-BHQ

7. ウイルスタンパク質の検出 (蛍光抗体法)

1) 使用抗体

HSV1 ICP4 抗体 (Santacruz)

HSV1 glycoprotein B 抗体 (Santacruz)

CMV pp65 抗体 (Santacruz)

CMV glycoprotein B 抗体 (Santa-cruz)

Anti-mouse Rabbit 抗体 (Dako)

2) 方法

a) メタノール固定 (-20°C10 分間)

b) ブロッキング液 (10%ウサギ血清) を加え室温 30 分静置

c) 1 次抗体液 (1 次抗体, 1%BSA, PBS) を加えて室温 2 時間静置

d) PBS で 3 回洗浄し、2 次抗体液を適量加えて暗所室温 1 時間静置

e) 蛍光顕微鏡で観察

(倫理面への配慮)

倫理面の配慮が必要な研究は行なっていない。

C: 結果

1. リアルタイムPCR法によりヒトに持続感染し、且つ血液中にウイルスゲノムが検出されるウイルスの検出頻度を調べた。データは、東京医科歯科大学医学部附属病院細胞治療センターで行っている研究的ウイルス検査により得られたデータを使用し分析した。検査対象ウイルスは、HSV-1, -2, VZV, CMV, HHV-6, ParvoB19, BKV, JCV B: EBV, HHV-7, HHV-8, AdV. 検査を行った検体は、末梢血: 112名より得られた640検体である。検査結果を以下に示す。

末梢血640検体中50検体以上から検出されたウイルスは、EBV, CMV, HHV6. 49~10検体から検出されたウイルスは、VZV, JCV, BKV, AdV. 9~1検体から検出されたウイルスは HSV1, HHV7, PVB19. 検出されなかったウイルスは、HSV2, HHV8, HBVだった。

2. ウイルス液の感染価測定結果

HSV1 は Vero 細胞、CMV は HFL-1 細胞に作成したウイルスストックを段階希釈して接種し、CPE を指標にウイルス感染価を測定したところ、下記の値が得られた。

HSV1 の感染価: 7.8×10^5 pfu/ml

CMV の感染価: 7.0×10^5 pfu/ml

3. iPS 細胞への CMV スパイク試験

iPS 細胞 (201B7 株) に感染価測定結果をもとに moi=0.1 で CMV を感染した。

感染後 10 日目まで観察したが、細胞増殖への影響も認められず、細胞の形態変化も観察されなかった (図 1)。同様に、ウイルス mRNA (IE1, UL89) とウイルスタンパク質 (pp65, glycoprotein B) 発現も検出されなかった (図 2、3)。

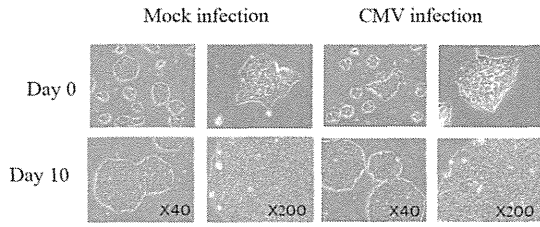


図 1. iPS 細胞への CMV 感染 (細胞形態変化) : 10 日間観察したが CMV 感染による細胞形態への変化は観察されなかった。

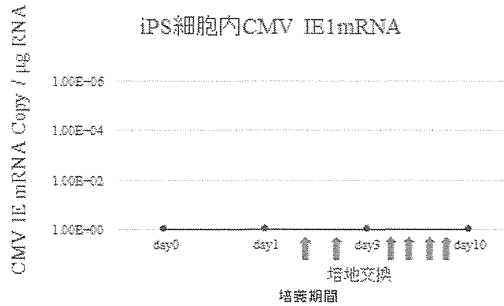


図 2. iPS 細胞への CMV 感染 (ウイルス mRNA 発現) : 10 日間観察したが CMV タンパク質発現は観察されなかった (IE1)。

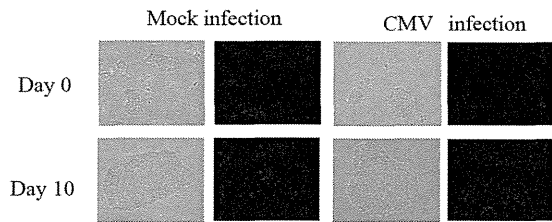


図 3. iPS 細胞への CMV 感染 (ウイルスタンパク質発現) : 10 日間観察したが CMV タンパク質発現は観察されなかった (pp65 発現)。

4. iPS 細胞への HSV1 スパイク試験

iPS 細胞 (201B7 株) に感染価測定結果をもとに $moi=0.1$ で HSV1 を感染した。感染後 3 日後には細胞増殖が著しく阻害され (図 4)、強い CPE により細胞は死滅した (図 5)。また、ウイルス mRNA 発現 (図 6)、ウイルスタンパク質発現 (図 7) も検出された。

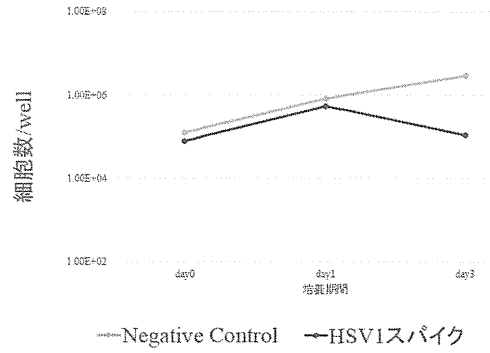


図 4. iPS 細胞への HSV1 感染 (細胞増殖に対する影響) : 感染 3 日後には顕著な細胞増殖抑制効果が観察された。

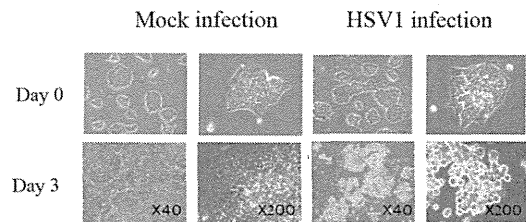


図 5. iPS 細胞への HSV1 感染 (細胞形態変化) : 感染 3 日後には強い CPE が観察され、細胞は死滅した。

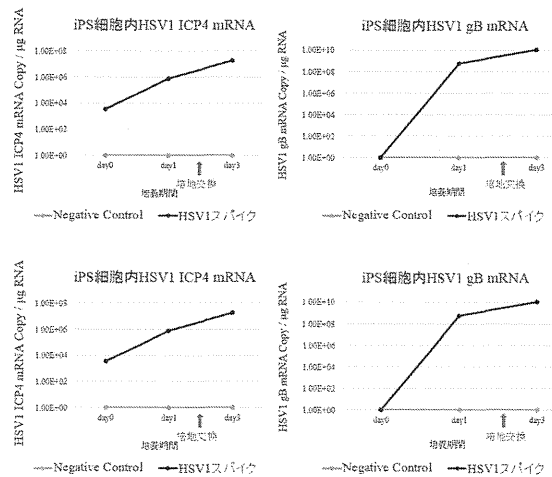


図 6. iPS 細胞への HSV1 感染 (ウイルス mRNA 発現) : 感染直後に ICP4、感染翌日には gB 遺伝子の mRNA が検出された。

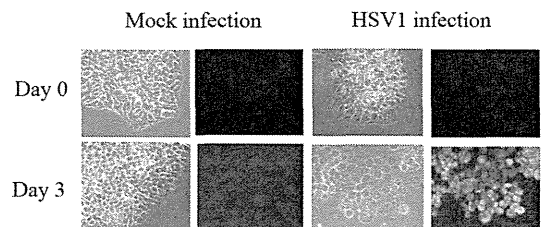


図 7. iPS 細胞への HSV1 感染（ウイルスタンパク質発現）：感染 3 日後の ICP4 発現。

以上の結果より、iPS 細胞は HSV1 には感受性があるが CMV に対する感受性は持たないことが示された。

D: 考察

1. 網羅的ウイルス検査法による検査結果を解析したところ、EBV, CMV, HHV6, PVB19 が生体材料に混入する危険性が高いことが示された。EBV, CMV, HHV6 はヘルペスウイルス科に属し、初感染後は持続感染状態が成立し、終生ウイルス陽性となることが知られている。これらの成人の陽性率は EBV:90%程度、CMV:80%程度、HHV6:ほぼ100%と非常に高く、しかも血液細胞に持続感染することから細胞組織医薬品の原材料となる生体材料への混入の可能性が非常に高いと考えられる。今回行ったデータ解析でも多くの検体からこれらのウイルスが検出されており、これまでの知見が裏付けられた。また、PVB19 も持続感染するケースが報告されており血液とともに、骨髄液に混入することが多い。骨髄細胞を使用した再生医療は多数計画されており、原材料への PVB19 混入の有無や培養に与える影響を計画段階で十分に評価する必要がある。

2. 従来、HIV, HTLV, HBV, HCV が混入した原材料を使用しないことで細胞組織医薬品の安全性を担保を図ってきたが、上記 4 種類のウイルスは陽性率が高く、しかも健康人から採取した原材料にも混入する可能性が高いため、一律に陽性者から原材料を採取することを制限することは不可能である。さらに、オーダーメイド医療である自己の細胞・組織を原材料として使用する再生医療の場合、持

続感染していた EBV, CMV, HHV6, PVB19 が検出されたからといって治療を行わないことは難しい。しかし、培養中にこれらのウイルスが増殖する場合、大量のウイルス・ウイルス感染細胞が混入した製剤を投与することになり、治療の安全性を担保できない。したがって、これらのウイルスに関し事前に培養系での動態を十分に検討しておくことが望ましいと考えられる。

3. 現在、京都大学 iPS 細胞研究所では、医療用 iPS 細胞ストックを作成する「再生医療用 iPS 細胞ストックプロジェクト」が実施されている。このプロジェクトは健康人から HLA (Human Leukocyte Antigen: ヒト白血球型抗原) ホモ接合体のボランティアの末梢血から iPS 細胞を作製・保存するプロジェクトで、予め品質の保証された iPS 細胞を保存し必要に応じて国内外の医療機関や研究機関に迅速に提供可能にすることを目的とするものである。一方、すべての成人には複数の持続感染ウイルスが持続感染していることが明らかとなっており、その多くは末梢血中に検出されるため、医療用 iPS 細胞ストックを作成する際にはそれらのウイルスが混入するリスクが避けられない。本研究は細胞組織医薬品のウイルス感染リスクの評価を目的として具体的なウイルス感染リスクに関するデータ蓄積を目的に iPS 細胞へのウイルススパイク試験を実施した。その結果、少なくとも今回用いた iPS 細胞株 (201B7 株) は HSV1 には感受性があるが CMV に対する感受性は持たないことが示された。この結果を一般化できるかどうか、今後他の iPS 細胞株を用いて検証する予定である。

4. HSV 1 の細胞への侵入にはウイルス表面に存在する 5 つのエンベロープ糖タンパク質 (gB, gC, gD, gH, gL) が関与するこ

とが知られている。細胞への吸着には gB と gC が関与し、その後 gB と gD が宿主細胞受容体に結合することによりウイルスエンベロープと宿主細胞膜が融合してウイルスの細胞への侵入が開始される。宿主細胞受容体として、NM-IIA、PILR α および MAG が、gD 受容体として nectin、CD270 (HVEM) およびヘパラン硫酸が同定されている。今後これらの HSV1 に対する宿主細胞受容体の発現の有無を解析し、iPS 細胞への感染機構に特殊性があるか否か検討していきたい。

3. 現在、細胞由来医薬品の製造にあたっては厚生労働省からの通知（「ヒト（同種）由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保について」など 5 指針）に従い、5 種類のウイルス (HIV, HTLV, HBV, HCV, ParvoB19) の検査が義務づけられている。今回得られた研究結果は、iPS 細胞を樹立する際、上記 5 ウイルスに加え持続感染ウイルス (少なくとも HSV1) の検査が必要なことを示しており、すでに我々が開発した代表的な持続感染ウイルス 13 種類を網羅的・迅速に検出可能な検査系 (HSV1, 2, CMV, EBV, VZV, HHV6, 7, 8, JCV, BKV, AdV, PVB19, HBV) が有用と考えている。今後本検査系を実用化するための取り組みを加速させる予定である。

E: 結論

生体材料を採取する際には必ず血液が混入することから、血液中に存在する持続感染ウイルスに関し、注意すべきウイルス種やその血液中での存在量を予め評価し、リスト化することを目的に研究を行った。本学で開発した網羅的ウイルス検査により 112 名からの 640 検体の検討を行ったところ、EBV, CMV, HHV6 が高頻度に、頻度は低いが HSV1, HHV7, VZV, JCV, BKV, AdV,

ParvoB19 が検出され、これらのウイルスの検査を検討する必要性が示された。一方、iPS 細胞へのウイルススパイク試験の結果、iPS 細胞 HSV1 に感受性を持つことが示された。したがって、厚生労働省通知に記載の、5 種類のウイルス (HIV, HTLV, HBV, HCV, ParvoB19) の検査に加えてヒトに持続感染するウイルス (少なくとも HSV1) の検査が必要と考えられる。

F: 健康危険情報

なし

G: 研究発表

論文発表

1. Ng SB, Ohshima K, Selvarajan V, Huang G, Choo SN, Miyoshi H, **Shimizu N**, Reghunathan R, Chua HC, Yeoh AE, Quah TC, Koh LP, Tan PL, Chng WJ. EBV-associated T/NK-cell lymphoproliferative disorder in children and young adults has similar molecular signature to extranodal nasal NK/T-cell lymphoma but shows distinctive stem cell-like phenotype. *Luek Lymphoma* 10:1-27, 2014
2. Yoshimori M, Imadome K, Komatsu H, Wang L, Saitoh Y, Yamaoka S, Fukuda T, Kurata M, Koyama T, **Shimizu N**, Fujiwara S, Miura O, Arai A. CD137 Expression Is Induced by Epstein-Barr Virus Infection through LMP1 in T or NK Cells and Mediates Survival Promoting Signals. *PLoS One* 9:e112564, 2014.
3. Tachikawa R, Tomii K, Seo R, Nagata K, Otsuka K, Nakagawa A, Otsuka K, Hashimoto H, Watanabe K, **Shimizu N**. Detection of herpes viruses by multiplex and real-time polymerase chain reaction in bronchoalveolar lavage fluid of patients with acute lung injury or acute respiratory

- destress syndrome. *Respiration* 87:279-286, 2014.
4. Yagasaki H, Shichino H, **Shimizu N**, Ohye T, Kurahashi H, Yoshikawa T, Takahashi S. Nine-year follow-up in a child with chromosomal integration of human herpesvirus 6 transmitted from an unrelated donor through the Japan Marrow Donor Program. *Transpl Infect Dis.* 17(1):160-1. 2015.
5. Endo A, Watanabe K, Ohya T, Matsubara T. **Shimizu N**, Kurahashi H, Yoshikawa T, Katano H, Inoue N, Imai K, Takagi M, Morio T, Mizutani S. Molecular and virological evidence of viral activation from chromosomally integrated HHV-6A in a patient with X-SCID. *Clin.Infect.Dis.* 59:545-548, 2014.
6. Fujiwara S, Kimura H, Imadome K, Arai A, Kodama E, Morio T, **Shimizu N**, Wakiguchi H. Current research on chronic active Epstein-Barr virus infection in Japan. *Pediatr.Int.* 56:159-66, 2014.
7. 関矢一郎、**清水則夫**、森尾友宏、宗田大、滑膜間葉系幹細胞を用いる軟骨再生医療の手順. *日本整形外科学会雑誌* 88:212-215, 2014
8. 木村秀樹、池 裕明、岡正朗、鈴木弘行、谷憲三朗、徳久剛史、中面哲也、森尾友宏、山口佳之、阿曾沼元博、河上裕、紀ノ岡正博、澤芳樹、**清水則夫** 免疫細胞療法細胞培養ガイドライン 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 45:411-433, 2014
9. Kobayashi Z, Akaza M, Numasawa Y, Ishihara S, Tomimitsu H, Nakamichi K, Saijo M, Morio T, **Shimizu N**, Sanjo N, Shintani S, Mizusawa H. : Failure of mefloquine therapy in progressive multifocal leukoencephalopathy:Report of two Japanese patients without human immunodeficiency virus infection. *Journal of the Neurological Sciences* 324, 190-194(2013)
10. Yan J, Ng SB, Tay JL, Lin B, Koh TL, Tan J, Selvarajan V, Liu SC, Bi C, Wang S, Choo SN, **Shimizu N**, Huang G, Yu Q, Chng WJ. : EZH2 overexpression in natural killer/T-cell lymphoma confers growth advantage independently of histone methyltransferase activity. *Blood* 121:4512-4520(2013)
11. Tachikawa R, Tomii K, Seo R, Nagata K, Otsuka K, Nakagawa A, Otsuka K, Hashimoto H, Watanabe K, **Shimizu N**. : Detection of Herpes Viruses by Multiplex and Real-Time Polymerase Chain Reaction in Bronchoalveolar Lavage Fluid of Patients with Acute Lung Injury or Acute Respiratory Distress Syndrome. *Respiration*, [Epub ahead of print] (2013)
12. Ito K, **Shimizu N**, Watanabe K, Saito T, Yoshioka Y, Sakane E, Tsunemine H, Akasaka H, Kodaka T, Takahashi T. : Analysis of viral infection by multiplex polymerase chain reaction assays in patients with liver dysfunction. *Internal Medicine.* 52(2):201-11 (2013)
13. Ogawa M, et al. Broad-range real-time PCR assay for detection of bacterial DNA in ocular samples from infectious endophthalmitis. *Jpn J Ophthalmol.* 56(6):529-535, 2012.
14. Sugita S, et al. Virological analysis in patients with human herpes virus 6-associated ocular inflammatory disorders. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 12;53(8):4692-8, 2012.
15. Ogawa M, et al. Novel diagnosis of fungal endophthalmitis by broad-range real-time PCR detection of fungal 28S ribosomal DNA. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 250(12):1877-1883, 2012.
16. Sugita S, et al. Detection of Candida & Aspergillus species DNA using broad-range real-time PCR for fungal endophthalmitis. *Graefes*

著書

1. 北條浩彦、清水則夫(分担執筆). 原理からよくわかるリアルタイム PCR 完全実験ガイド 最強のステップUP シリーズ. 北條浩彦編 「基本編—原理と基本知識—リアルタイム PCR を使った解析の基本 10 プライマー/プローブの設計手順②マルチプレックスの場合」 p72-74 羊土社, 2013
2. 清水則夫、渡邊健、外丸靖浩(分担執筆). 原理からよくわかるリアルタイム PCR 完全実験ガイド 最強のステップUP シリーズ. 北條浩彦編 「実践編—プロトコールを中心に—IV章 遺伝子量解析 15 ウイルス感染症を診断する ウイルスゲノムの定性的検査と定量的検査」 p192-202 羊土社, 2013

国内学会発表

1. 廣瀬千紘 他 9 名 成人 EBV 陽性 T/NK リンパ増殖症に対する同種造血幹細胞移植成績の後方視的解析 造血幹細胞移植学会 平成 27 年 3 月 (神戸)
2. 渡邊 健 他 9 名 iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞を利用した再生医療の安全性確保: ウイルススパイク試験 日本再生医療学会 平成 27 年 3 月 (横浜)
3. 外丸靖浩 他 6 名 再生医療の微生物安全性検査: ウイルス・マイコプラズマ同時検出系の開発 日本再生医療学会 平成 27 年 3 月 (横浜)
4. 今留謙一 他 8 名 難治性 EB ウイルス関連 T/NK リンパ増殖性疾患モデルマウスを用いた新規治療薬 3 剤の評価研究 日本ウイルス学会 11 月 (神戸)
5. 清水則夫 再生医療におけるウイルス・マイコプラズマ安全性検査系の開発 第 14 回日

本医薬品等ウイルス安全性研究会 9 月 (東京)

6. 吉山裕規 他 3 名 EBV 遺伝子 BNL2a と BNL2b は溶解感染初期と潜伏期に発現し、腫瘍化に關与する 第 60 回日本ウイルス学会 2012 年 11 月 (大阪)
 7. 松田剛 他 15 名 ヒト化マウスを用いた EB ウイルス関連リンパ増殖性疾患に対する免疫細胞治療のモデル実験 第 60 回日本ウイルス学会 2012 年 11 月 (大阪)
 8. 清水則夫 網羅的ウイルス検査法の開発と臨床ウイルス学的検査への応用 第 30 回日本染色体遺伝子検査学会学術集会 2012 年 11 月 (東京)
 9. 清水則夫 移植医療・細胞治療におけるウイルス検査系の開発 輸血学会関東甲信越支部会 2012 年 9 月 (東京)
 10. 今留謙一 他 4 名 細胞表面抗原マーカー解析による EBV 特異的 CTL 誘導の検討 第 27 回ヘルペスウイルス研究会 2012 年 6 月 (名古屋)
 11. 小川学 他 4 名 真菌 28S rRNA 領域定量 PCR の真菌性眼内炎診断における有効性の検討 第 116 回日本眼科学会総会 2012 年 4 月 (東京)
 12. 今留謙一 他 10 名 EB ウイルス関連血球貧食症候群モデルマウスの作成と解析、第 21 回 EB ウイルス感染症研究会 2012 年 3 月 (東京)
 13. 今留謙一 他 8 名 EBV 関連血球貪食リンパ組織球症モデルマウスの作製と病態発現解析 第 21 回 EB ウイルス感染症研究会 2012 年 3 月 (東京)
- ## 国際学会発表
1. Imadome K, Matsuda G, Kawano F, Kodama E, Arai A, Shimizu N, Fujiwara S. Applications of mouse models of EBV-associated diseases for the

evaluation of novel therapies. The 16th
International symposium on Epstein Barr Virus &
Associated Diseases. 16-19 July, 2014 Brisbane
2. Imadome K, Matsuda G, Kawano F, Kodama E,
Arai A, Shimizu N, Fujiwara S. Preclinical studies
of novel therapies for Epstein-Barr virus-associated
diseases in humanized mouse models.
The 39th Annual International Herpesvirus
Workshop. 19-23 July, 2014. Kobe

H : 知的財産権の出願・登録状況
なし

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(医薬品等規制調和・評価研究事業))
平成24-26年度 総合分担研究報告書

細胞組織加工医薬品及びバイオ医薬品の異常型プリオンの
検出・リスク評価に関する研究に関する研究

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

再生医療等製品やバイオ医薬品等の原料への異常プリオンタンパク質(PrP^{Sc})の混入/迷入リスクの低減するためにPrP^{Sc}の検出手法や製造工程でのクリアランス工程の評価法について最新の状況を調査した。特に製造工程で反芻動物由来原料を使用する場合に製造工程のクリアランスを定量的に評価するためにPrP^{Sc}検出に用いられている現行の手法の問題点と今後の目指すべき方向性について検討した。工程評価に用いるPrP^{Sc}のスパイク検体についても評価を行い以下の結果を得た。

- 1) PrP^{Sc}の感染性の検出にはマウス脳内に摂取するin vivo法が最も高感度とされているが時間がかかりすぎるという欠点があり、そのためにPrP^{Sc}のみを検出するウェスタンブロット(WB)法や試験管内で人工的なストレスを負荷するPrP^{Sc}増幅法(PMCA)などが開発されてきたが、定量性や特異性、増幅条件の最適化などの課題があり、満足のいく方法とはなっていない。
- 2) プリオンタンパク質を高発現している細胞を用いる培養細胞系は生体でのPrP^{Sc}のコンバージョンを反映した迅速な感染性の定量法として開発が進められている。
- 3) 細胞培養系で得られたPrP^{Sc}は、脳内摂取により感染性が確認されており、PrP^{Sc}のスパイク検体として有用である。

以上の点から、今後細胞培養法が検出手法やクリアランス評価に用いる検体の調製法としても有用性が高いと考えられる。

A. 研究目的

我が国では、伝達性ウシ海綿状脳症(BSE)を主とする伝達性海綿状脳症(TSE)のリスク評価に関して、ウシ等由来原材料の原産国の地理的なリスク及び原材料部位のリスクを基本に、予防的なBSE対策を進めている。英国等でのBSEの発症は沈静化

してきているが、一方で非定型BSE発生がEU、カナダ、米国、日本等で相次いで報告されている。このような非定型BSEの発生が、変異型クロイツフェルト・ヤコブ病(vCJD)の増加につながることを懸念されている。非定型BSEの発生は、これまで非発生国として一定の安全性が担保されてい

るとされたオーストラリ等でも vCJD の発生が起こる可能性が指摘されている。従って、BSE 発生が沈静化してきているとはいえ、血清等を用いる医薬品製造において vCJD の原因物質となりうる異常型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) の混入/迷入を否定するための試験の実施は、医薬品の安全性を確保するために不可欠となっている。

一方で、世界中の獣畜・家禽等の疾病の透明性の保証や世界の獣畜・家禽等の疾病の制御に関する国際的協力の促進、動物と動物由来の生産品の国際取引に関する衛生基準の作成を行っている国際獣疫事務局 (OIE) が、昨年度 5 月の会議で、日本を始め、米国、イスラエル、イタリア、オランダ及びスロベニアを BSE リスクの無視できる国に認定した。これにより、新たに清浄国に指定された国で新たにウシ成分等を用いた医薬品製造を行う場合に、特にウシ血清などに使用が可能となってきた。

海外でもヨーロッパ医薬品長庁が 2011 年に血液製剤における vCJD のリスク評価に関するポジションペーパーを出しており、vCJD のリスク評価において最も重要な点はドナーの特定期間における英国滞在歴であり、ついで滞在歴のあるドナーの排除と PrP^{Sc} のクリアランス能のある製造工程の重要性が指摘されている。

以上のように BSE をめぐるリスクの推定やウシ由来原材料の使用に関する規制要件は刻一刻と変化しつつある。一方で、万が一新たな BSE の発症 (特に非定型プリオン由来など) があった場合に、反芻動物を用いた製造方法を採用している場合に、あらたに PrP^{Sc} リスクがどの程度あり、かつ採用している精製方法等によりどの程度 PrP^{Sc}

がクリアランスできる能力があるのかを検討しておく必要が出てくる可能性がある。そのためにも PrP^{Sc} のクリアランス能を評価しておくことが有用である。しかし、PrP^{Sc} の検出方法がいまだ検出感度や時間、精度等に関してコンセンサスの得られている方法はないと考えられる。

そこで本年度は PrP^{Sc} の検出手法の全体的な評価を行うと共に、工程での PrP^{Sc} のクリアランスを評価するためのスパイクに用いられる PrP^{Sc} の要件についても調査検討した。

B. 研究方法

公表文献や海外のガイドライン、国際学会での PrP^{Sc} の検出系の報告について調査を行うと共に、それぞれ検出手法ごとの有用性や限界について評価を行った。またスパイク検体について文献等より、どのような課題があるのかを調査すると共に、工程評価に用いるスパイク検体についての要件について調査した。

〈倫理面への配慮〉

本研究では、ヒトないしは動物を対象とした実験ではなく、主として国内外のガイドラインや公表文献等を対象として調査研究を行った。したがって倫理的問題は生じていない。

C. 結果

C.1. PrP^{Sc} の検出手法に関する評価

PrP^{Sc} の検出法としては、感染性を最も反映した方法としてマウス脳内接種法やさらにそれを高感度化した方法としてプリオンタンパク質トランスジェニック (Tg) マウ

スへの感染系などが用いられてきている。しかし、このような系でも発症まで長期にわたる時間経過が必要であることから、その代替法として異常プリオンを免疫学的手法で検出する方法やプロテアーゼ K 耐性プリオンタンパク質の検出法（ウエスタンブロット法）などが用いられてきている。このような免疫学的手法は必ずしも異常プリオンの感染性を反映していないという懸念も指摘されてきている。そこで感染性の代替法をかねた方法として、異常プリオン(PrP^{Sc})が正常プリオンをミスフォールディングさせる能力をもつことを利用したタンパク質ミスフォールディング循環増幅法（PMCA）などが用いられるようになってきている。PMCA 法は Castilla らにより開発された方法⁽¹⁾であり、核酸増幅法である PCR に類似した原理でタンパク質のミスフォールディングを誘導するサイクルを繰り返して行うことにより試験管内で異常プリオンを形成させ、高感度に検出しようとするものである。PMCA 法はいくつかの改良法⁽²⁾も提案され、異常プリオンの感染性の推定に用いられている。

1) BSE 経口感染牛の臓器や排泄物の BSE リスク

PMCA 法を用いて異常プリオンを経口接種させたウシの各臓器における異常プリオンの検出が報告されている⁽³⁾。この報告では、従来法の PMCA 法プロトコルを用いて BSE を経口接種させた 4 頭のウシの各臓器を採取し、どの臓器や排出物に異常プリオンが含まれるかを推定している。インビトロ増幅での基質として用いられているのはウシプリオンを遺伝子導入した（Tg）マ

ウス由来のプリオンタンパク質を含む脳由来の均質な液を用いている。

BSE を経口投与したウシ脳から採取された臓器の中で、脳、脊髄、神経節、視神経、パイアー斑に異常プリオンが検出されている。さらに、腸間膜リンパ節、副腎に加えて、皺胃（第 3 胃）、瘤胃（第一胃）、直腸においても検出されている。さらに唾液についてもレベルは低いものの PMCA 反応が陽性となったとされた。唾液での PMCA 陽性反応が検出されたこと、さらに唾腺にも陽性反応が検出されたことより、このような体外排出される検体で陽性反応が検出されたことより水平伝播のリスクが高くなるのではとの懸念が指摘されている。

唾液の感染性については、BSE を経口接種させたウシを用いて PMCA 法により感染前に弱い反応ながらも陽性反応が検出されることが他の研究者によっても示されている。また、慢性消耗病のシカやスクレーパーを感染させたヒツジでも PMCA で陽性反応が認められるとする報告がある⁽⁴⁾。

唾液の感染性に関連して、これまで唾液、乳、血液等については異常プリオンの伝達性があるとの疫学的証拠は知られていない。執筆者らは体液や排泄物における潜在的な BSE 伝達のリスクを排除できないとしている。

2) プリオン高発現細胞を用いた異常プリオン検出系

in vitro 培養細胞を用いて異常プリオンを検出する系の開発は古くから実施されている。神経細胞や非神経細胞など多様な細胞

に異常プリオンが感染することが示されている。ただ、殆どのケースで持続感染するのみで細胞傷害性が認められることはまれである。一度細胞に感染すると、細胞の分裂に伴ってプリオン株が持続して増幅することが示されている。また、株化細胞のみならず初代細胞への感染系も開発されており、初代培養細胞を用いた場合、いくつかの感染系では細胞傷害性の効果が見られている。

表 1 にこれまで知られているプリオン細胞培養モデルを示している⁽⁵⁾。しかし、様々なプリオン株に対する感染系が試みられてきたが、感染がうまく成立しないことも多い。その原因としては、プリオンタンパク質の種の違いや内在性のプリオンが異常プリオンの感染を阻害するとされている点などと想定される。ヒト由来異常プリオンで感染が認められるのは、ヒト由来異常プリオンをマウスに馴化した場合であるとされている。

一方 *in vitro* 細胞内で持続感染している異常プリオンは、細胞の継代に従って元の性質を失っていると報告されている。

異常プリオンに感受性のある *in vitro* 細胞株は、特定の種由来のプリオンに感受性を持ち他の種の異常プリオンの感染に抵抗性を示すことが報告されている。さらに多くの細胞培養系は特定の PcP^{Sc} に対して感受性を有し、細胞ごとに特定の PcP^{Sc} ストレインに感受性を示し、種差とは異なるプリオン感染性の細胞生物学的特徴があると考えられている。

一方で、細胞工学的に他の種のプリオンを発現させることにより幅広いプリオン感受性を付与することが出来ることが知られ

ている。

PcP^{Sc} の細胞培養を利用した感染系での、最も重要な点は、*in vitro* で増幅した PcP^{Sc} の検出手法とされる。すなわち、異常プリオンのみを特異的に検出できるような抗体が無いために生成した PcP^{Sc} 検出のために工夫が必要な点である。ウイルスの感染系のように細胞傷害性 (CPE) を示すような感染系を確立することが出来れば、非常に簡便な手法となるが、幅広い異常プリオンに対して感受性があり、細胞傷害性が認められる細胞がない。多くの場合には異常プリオンの物理的抵抗性を利用して、例えばプロテアーゼ K 耐性のプリオンをウエスタンブロットティングや他の免疫学的検出法を用いて検出することが行われている。この場合にも生成した異常プリオンと投与した検体中に含まれる異常プリオンを分別する手段が必要となる。時間経過を追って異常プリオンが量的に変動することを示すことが必要となる。

3) 異常プリオン検出系の評価とマウス感染系の相関性

PMCS 法や細胞培養系で生成された異常プリオンとされる検体では、さらに感染性をマウス脳内接種モデルで確認することが望ましい。特に PMCS 系では従来異常プリオンの感染性がないとされた検体で陽性反応が認められており、従来の検出系との差異の要因を明らかにする必要がある。

C.2. PrP^{Sc} のクリアランス工程に関する調査

異常プリオン (PrP^{Sc}) のクリアランス工

程としてはナノフィルトレーションやカラムクロマトグラフィー工程が挙げられる。特にクリアランス能の高い工程としてナノフィルトレーションによる評価が行われている。これまで代表的なナノフィルトレーションでのクリアランス能についてまとめられた表3の結果を見ると、スパイクした PrP^{Sc} 検体により結果が大きく異なることがわかる。初期の検討では脳乳剤や超音波処理したマイクロソーム分画を用いた場合にはかなり口径の大きいフィルターを用いても 4-5log の低減率が得られている。しかし、スパイクする PrP^{Sc} を界面活性剤の添加等により粒子を小さくするような調製法を適用すると、そのクリアランス能は低下し、粒子の大きい調製法を適用した検体を用いると 20nm 以下の口径を用いた場合には口液中に感染性が検出されなかったにも関わらず、粒子が細くなる調製法では 10nm の口径のナノフィルトレーションでも口液中に感染性が検出される。このような結果は当初の PrP^{Sc} の調製法で得られていたクリアランス能は必ずしも生体由来の PrP^{Sc} の除去能を反映していない可能性を示唆している。

上記のクリアランス評価においてスパイクした PrP^{Sc} は超音波処理したマイクロソーム分画であったり、あるいは界面活性化剤を添加して粒子を小さくした検体であった。一方血中に存在する PrP^{Sc} がどのような形態をしているか未だ明らかにはされていないが、このような脳膜分画を物理的ないしは化学処理によって微粒子化したものが適切なスパイク検体とはいえないかもしれないとされている。このような考え方から、このような物理的処理や化学処理した感染

動物の脳膜分画の通常より高速の超遠心の上清（スーパー超遠心上清）を用いて粒子をより微小化した PrP^{Sc} 検体をナノフィルトレーションでの工程にスパイクし、クリアランスがどのように変化するかが検討されている。

表2に示すように、通常の膜分画では 15nm や 20nm のナノフィルトレーションにより 4-5LRF が得られるが、「スーパー超遠心の上清」を用いた場合には2前後の LRF しかえられず、しかも口液中に感染性が検出されることが示された。

これらの結果は、「スーパー超遠心の上清」を用いた場合には、マイクロソーム分画と同様の PrP^{Sc} タイターを含有しているにも関わらず、ナノフィルトレーション工程で低い LRF しか得られていない。この結果は、「スーパー超遠心の上清」には非常に微小な粒子のみ PrP^{Sc} が分画されたためにトラップ効率が低下したと考えられる。

この微小化された PrP^{Sc} 分画を用いることにより血中での動態が評価できるのではないかという発想から、この分画を種々の血液検体にスパイクし、PrP^{Sc} の除去に有効とされる除白血球フィルターの評価を実施している。その結果、この分画が除白血球フィルターPrP^{Sc} の除去能の評価に有用である結果が得られている（図1）。

表2及び表3の結果は、ナノフィルトレーションによる PrP^{Sc} の除去能を評価する場合にはスパイクする PrP^{Sc} の形状や粒子径がその評価を過剰に推定することにつながることを示唆している。一方、これらの工程での PrP^{Sc} 除去の評価では複数の PrP^{Sc} の定量法が用いられている。この PrP^{Sc} のア

ッセイ法の特徴とその課題を表4にまとめてみた。

PrP^{Sc}の感染性を最も高感度に測定できるのは脳内接種により異常プリオンの発症を評価する *in vivo* 法である。定量評価においては限界希釈法により感染性が検出できなくなる希釈率からタイターを評価できるが、判定に半年以上の期間を要し、正確に定量するには多くの動物を必要するために代替となる方法が望まれている。

in vivo 法の代替法として、いくつかの方法が実施されている(表4)。ウエスタンブロット法は簡便であるが感度が低く、エンドポイント法で定量する場合にも測定可能範囲が小さい。PMCA 法や同様の試験管内での PrP^c から PrP^{Sc} への変換(コンバージョン)を引き起こすことにより検出する手法が開発されているが、検体ごとに反応条件を最適化する必要がある、また用いるプリオンタンパク質に種の壁があるとされてきている。非常に反応性の高い高いプリオンタンパク質の探索が行われてきており、ヒツジの遺伝子型として171番目のアミノ酸がグルタミン酸(Q171)のプリオンタンパク質を用いてPMCA法を行うと種々の異常プリオンの検出が可能との報告がある。しかし、別の報告ではQ171プリオンタンパク質であってもPMCAでの反応性が良くない遺伝子型(A136/R154/L158/Q171)も知られており必ずしも十分なデータが得られているわけではない。

さらに英国で患者から摘出された扁桃腺の異常プリオンの検出をウエスタンブロット法で検出した結果やBSE感染牛の唾液中での異常プリオンをPMCA法で解析した結果は *in vivo* 法と必ずしも一致していな

い。この結果は、PMCA法が *in vivo* 法よりも感度が高いことを示しているとも考えられるが、逆にPMCA法で検出された異常プリオンは試験管内でおきた artifact を含む可能性と考えることができる。

D. 考察

D.1. PrP^{Sc} の検出手法に関して

異常プリオンの検出系として開発が進むタンパク質ミスフォーディング循環増幅法(PMCA)と *in vitro* 細胞培養系について最近の動向とその有用性について調査を行うと共に、手法としての限界やリスク評価を行うにあたっての考慮について検討した。

異常プリオンの感染性についての判断はマウス脳内へ検体を接種し、海綿状脳症の発症を確認することが最も正確な検査法とされてきた。しかし、この検査法では非常に長期にわたる *in vivo* でのインキュベーションが必要であり、迅速な試験法の開発が望まれていた。

このような背景から、PMCA 細胞培養系での感染性評価法は迅速に判定が可能とされ、これらの検体を用いた検討が実施されてきた。特に、PMCA法は簡便性もあり、様々な検体について評価が行われてきている。

今回取り上げた、BSE陽性検体を経口投与したウシでの異常プリオンの出現を各種臓器や排出物などについて調査した研究は、異常プリオンの安全性を考える上で重要と考えられた。これまでマウスインビボ感染性を用いて陽性が検出されてきたウシ脳から採取された臓器の中で、脳、脊髄、神経節、視神経、パイアー斑でPMCA法でも陽性結果となることが確認された。

その一方で、これまで陽性反応を示すとはされてこなかった検体でも PMCA 法で陽性結果が得られている。当然この結果は、従来の検出法は感度が十分でなく、例えば唾液の感染性に関連して TSE 伝播の潜在的なリスクが存在すると結論されている。

一方で、PMCA 法の処理過程で人工的に生成された陽性反応である可能性も残されている。昨年度に報告したように英国において手術で除去された虫垂や扁桃腺の調査結果からは、英国人の vCJD の潜在的な感染者数は多いとする推計が出されている。これは、収集された検体を免疫学的な手法により陽性反応を示した結果に基づいている。しかし、この場合にも二つの可能性を考慮する必要があると考えられる。すなわち、実際に多くの英国人の BSE の潜在的な感染は非常に高く、ただ多くの場合に発症にまで至っていないか、あるいは感染暴露量が発症に至るには少ないとするものである。もう一つの可能性は、陽性結果が必ずしも異常プリオンの感染性を示さないとするものである。現時点でこれらの結論に明確な答えはないが、いずれの可能性もあることを念頭に感染性について更なる検討が必要であると思われる。

D.2. PrP^{Sc} のクリアランス工程に関する調査

バイオ医薬品の PrP^{Sc} 安全性評価のために精製工程でのクリアランス能の評価における PrP^{Sc} のアッセイ法の最新情報の総括と工程評価においてスパイク試料としての適格性について調査を行った。まず PrP^{Sc} の感染性を評価する基本的なスタンスとしては in vivo アッセイ法が最も高感度であり、

感染性の有無や限界希釈法による感染価の評価においてもいわばゴールドスタンダードとなると考えられる。但し、半年に亘る試験期間を要するという in vivo 法の欠点を克服するために様々な手法が開発されてきている。それぞれのアッセイ法の評価においては in vivo 法との相関性を示すことが基本となる。そこで今年度はいくつかの手法の in vivo 法との相関性を含めてその検証を行った。

PrP^{Sc} の工程での除去能を評価するためのスパイク検体としてはスクレイパーや BSE 感染マウス脳由来のマイクロソーム分画が用いられてきたが、粒子サイズが大きすぎるとの観点から超音波処理や界面活性化剤処理などにより粒子の低分子化が試みられ、その結果粒子を小さくすることにより当初はナノフィルトレーションでは感染性が口液に検出されないとされていたのが、20nm や 15nm の口径のフィルターを用いても口液に感染性が検出されることが明らかになり、粒子のサイズによってはこれまで出されていた PrP^{Sc} 除去能を再評価する必要があると指摘されてきている。特に血中での PrP^{Sc} の存在状態が不明であることから、ウシ血清由来の PrP^{Sc} の感染性を前提とする場合には、粒子径を含めてその適切性について十分検討する必要がある。

バイオ医薬品の PrP^{Sc} クリアランス能の評価においては、スパイクした検体及び工程終了後の検体の PrP^{Sc} 感染価ないしはその残存量の定量的評価が重要となる。また、その検出感度やそれに基づく定量可能領域がどの程度あるのかが十分な定量範囲を確

保するために必要となる。

このような点から *in vivo* アッセイ法の代替として用いられているプロテイナーゼ K 耐性プリオンタンパク質の WB による検出や PMCA 法に関してはその感染性を十分に取らえられているのか疑問が残る。特に WB より高感度な検出手法と言われている PMCA 法やその類似の試験管内でのプリオンタンパク質のコンバージョンを指標とする手法は検体の特性による最適化が必要である点や感染性検出の十分条件であるのが課題となっている。このような点からも感染性を定量的に評価できるアッセイの確立が急務と考えられる。

上記のような観点からプリオンタンパク質の高発現細胞を用いた *in vitro* 細胞培養系を用いたアッセイ法の開発が急速に進んでいる。これらのアッセイ法は細胞のラフトや細胞内で添加された PrP^{Sc} により正常プリオンが PrP^{Sc} にコンバージョンされるという原理(図 2)を利用しており、生体での PrP^{Sc} の発生機構に類似した反応と想定できる。現状の課題は培養細胞中でのコンバージョンの条件設定の難しさとそのコンバージョン率が必ずしも十分でない点である。ただこれらはプリオンタンパク質高発現細胞株の使用や培養条件で改善が期待できる。

また、*in vitro* 培養細胞系で製造した PrP^{Sc} をマウス脳内への投与により CJD の発症を引き起こすことから *in vitro* 法にて変換された PrP^{Sc} は異常プリオンとしての特性を有していること、さらに異常プリオンとしての生体での存在状況に類似していると想定されることから工程へのスパイク試料としての十分性を備えている可能性が高いこと

も注目すべき点であると考えられる。

今後この *in vitro* 培養法を用いてより高濃度の PrP^{Sc} の調製が可能になればより正確な PrP^{Sc} のクリアランス能の評価が可能になると期待される。

E. 結論

PMCA 法は人工的にプリオンタンパク質の変異を引き起こす手法と想定され、迅速性に優れている。2) *in vitro* 細胞培養系での感染性の評価は、PMCA に比較しよりインビボでのプリオンタンパク質が変異していく過程を再現している可能性がある。

BSE など PrP^{Sc} に対するバイオ医薬品の安全性確保のために PrP^{Sc} の製造工程でのクリアランス能の評価に、プリオンタンパク質を高発現している細胞を用いる培養細胞系の検出系は迅速に感染性を定量できる方法として開発が進められており、PrP^{Sc} の感染性を迅速に評価できる手法として期待される。細胞培養系で得られた PrP^{Sc} は、脳内摂取により感染性が確認されており、PrP^{Sc} のスパイク検体としても有用である。今後細胞培養法が検出手法やクリアランス評価に用いる検体の調製法としても有用性が高いと考えられる。

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)
- 5) 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)
- 6) 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
- 7) Yamaguchi T, Kanayasu-Toyoda T, Uchida E: Angiogenic Cell Therapy for Severe Ischemic Diseases. *Chem. Pharm. Bull.* 36, 176-181 (2013)
- G-2 学会発表**
- 1) 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
- 2) 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-2 実用新案登録** なし
- H-3 その他** なし

表 1. 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
1. 神経/脳由来細胞株			
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
2. 神経/脳由来初代分離細胞			
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			

C2C12	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

表1. 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

Spike		適用フィルター	残存感染価	低減率	アッセイ法	著者	
TSE 株	感染株の調製						
スクレイパーME7	脳乳剤/-Detergent	35nm	有	4.9	エンドポイント	Tateishi (2001)	
		15nm	無	>5.8			
	脳乳剤/0.5%ザルコシル	35nm	有	1.6			
		15nm	無	>4.2			
		10nm	無	>3.8			
	脳乳剤+超音波処理	220+40+25nm	有	2	エンドポイント	Pocchiari(1988)	
263K スクレイパー	脳乳剤+超音波処理	15nm	有	NA	バイオアッセイ	Rohwer UP	
	+detergent						
	マイクロソーム	75nm	有	3.2	エンドポイント	Flan (2007)	
		15nm	有	4.8			
	超音波マイクロソーム	15nm	有	NA	バイオアッセイ	Yunoki(2008)	
	超音波マイクロソーム+リ ゾレンチン	15nm	有	4.7/4.0		Yunoki(2010)	
	清澄化脳ホモジナイズ	100+30+20nm	無	>5.4	エンドポイント	Diez (2010)	
127S スクレイパー	脳乳剤	15nm	無	>4.6	細胞培養アッセイ	You (2010)	
BSE-6PB1	マイクロソーム	15nm	有	5.3	エンドポイント	Flan (2007)	
GSS-KFu	脳乳剤/-Detergent	75nm	有	0.7	バイオアッセイ	Tateishi (2001)	
		60nm	有	1.1			
		50nm	無	NA			
		40nm	有	2			
		35nm	無	NA			
		75+35nm	無	NA			
		60+35nm	無	NA			
		60+60nm	有	2.6			
		脳乳剤/+ザルコシル	40nm	有	-0.9		
		脳乳剤/-Detergent	10nm	無	NA	バイオアッセイ	Tateishi (2001)
	脳乳剤/+ザルコシル	10nm	有	2			