

表 2. 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

	低速遠心上清		スーパー超速遠心上清	
	タイター(log LD50 /g 組織)		タイター(log LD50 /g 組織)	
フィルター	means+/-SEM	LRF	means+/-SEM	LRF
100nm	6.6 +/- 0	2.3	5.0 +/- 0.1	0.9
75nm	6.4 +/- 0.1	2.5	4.5 +/- 0.2	1.4
35nm	6.3 +/- 0.2	2.6	4.5 +/- 0.3	1.4
ミリポア NFP	4.9 +/- 0.4	4	4.1 +/- 0.3	1.8
アサヒ化成 20nm	4.8 +/- 0.5	4.1	4.2 +/- 0.3	1.7
Pall DV20				
1 回目	4.7 +/- 0.3	4.2	4.2 +/- 0.4	1.7
2 回目	4.2 +/- 0.3	4.7	4.0 +/- 0.2	1.9
アサヒ化成 15nm				
1 回目	4.5 +/- 0.4	4.4	3.8 +/- 0.1	2.1
2 回目	3.6 +/- 0.1	5.3	3.6	2.3

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

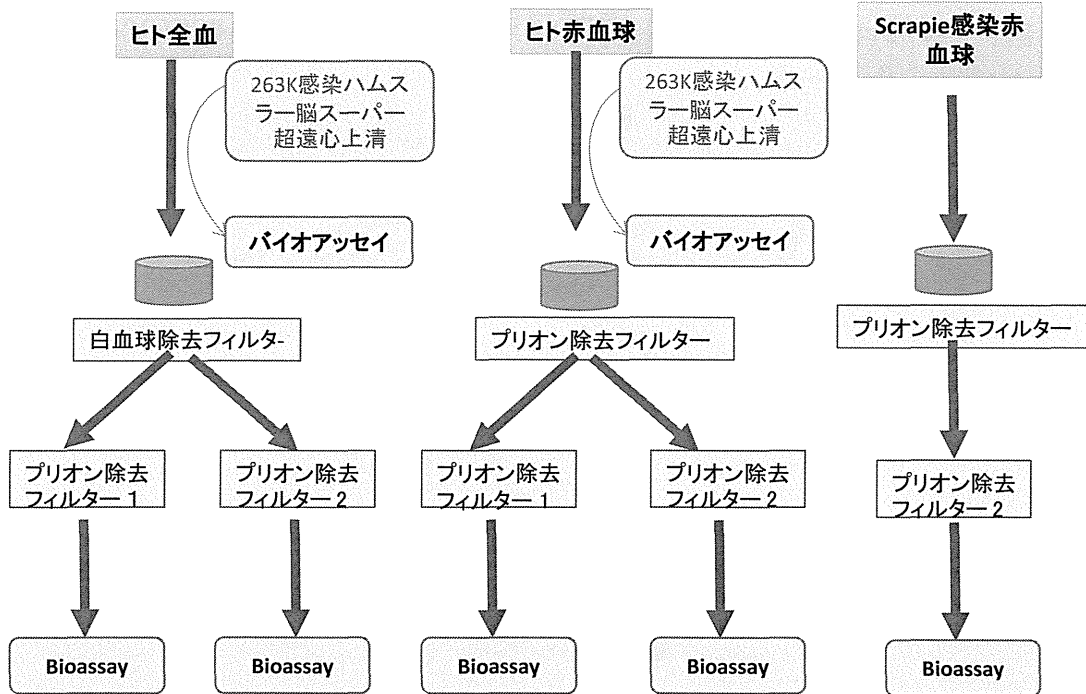
136	154	158	171	Successibility
V	R		Q	+
A	R		Q	+
A	H		Q	-
A	R		R	-
A	R	P	Q	+
A	R	L	Q	-

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

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

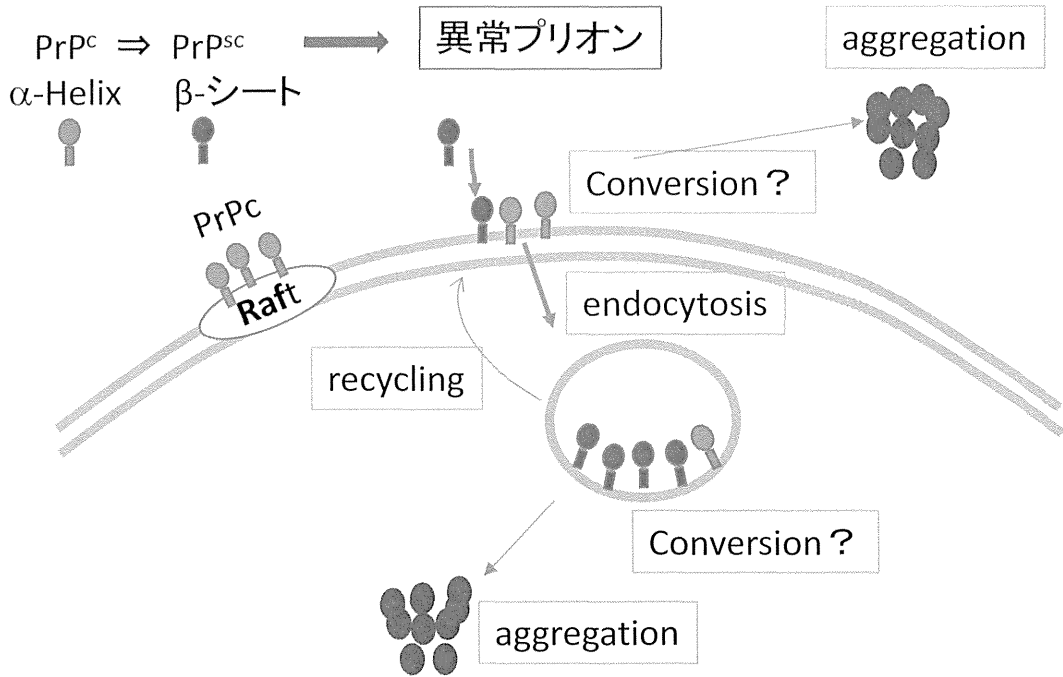
3) Goldmann, W. et al.: J. Gen. Virol. 87, 3741 (2006)

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



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25-26年度 総合分担研究報告書

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

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) 国内で市販されているエンドトキシン測定キットについて調査を行った。市販キットは大量製造される通常の医薬品を対象としており、テイラーメイド製品である再生医療製品への適用を想定されていない
- 2) 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。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、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。
- 3) 試験法設定に際して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評価しておくことにより、製品の出荷判定としてはこれらの試験を省略してもよいとする
- 4) 迅速試験キット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ものもある。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になる
- 5) 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。
- 6) 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。
- 7) 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を塩溶液等に懸濁し、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対象として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性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生き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、リポド A とよばれる資質の糖鎖が結合したリポポリサッカライド (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

い点などの特性からエンドトキシン試験の適用においても従来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の適用にあたっての課題を明らかにした。さらに、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べきかについても考察した。

B. 方法

B.1. 市販キットの調査と再生医療等製品への適用における課題

国内で局方<4.01>に準拠しているキットやその測定に用いる機器のパフォーマンス(検体量、測定時間、操作性)について調査し、再生医療等製品への適用に当たってどのような点が課題になるか調査した。また局方への準拠はされていないものの迅速法として市販されている試薬・機器についても、再生医療等製品への適用の可能性についても調査した。

B.2. 再生医療等製品へのエンドトキシン測定キットの適用

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エンドトキシン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等について解析した。

B.1.分光法

分光法での測定には、LAL Pyrochrome™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、無血清培地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測定法

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

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。

カプトガニの血液凝固系は、複数のセリンプロテアーゼ前駆体と凝固タンパク質の前駆体であるCoagulogenからなり、エンドトキシンはファクターCを活性化し活性化ファクターCの生成を引き起こす。活性化ファクターCが生成されると、凝固カスケードが次々と活性化されゲル化物質の前駆体Coagulogenがゲル化物質Coagulinに変換される。一方、カプトガニの凝固カスケードはファクターGが活性化ファクターGに変換されることでも引き起こされ、この活性化ファクターGの生成は β -1,3-グルカンによっても引き起こされる。

ゲル化法と比濁法はCoagulinの生成を測定するものであり、比色法は凝固酵素（Clotting enzyme）の基質（発色基質）を用いる方法である。国内で入手可能なエンドトキシン試験キットの多くはカプトガニ血球抽出物を用いており、生物試料からの抽出物のためロット間差をなくし一定の感度に調整することが非常に困難とされ、キット販売業者のノウハウがあるといわれている。このために製品ごとにカプトガニ血球の凝固系因子の量比や他の因子の混入も異なるとされ、感度や直線性などに差異があるとされる。

一方、エンドトキシンは発熱作用の他、補体の活性化や白血球の活性化、細胞に作用し接着分子発現の誘導や抗体産生促進など多様な生理作用を示す。また、マクロファージなどの免疫細胞の細胞表面のToll様受容体(TLR)-4に結合して、NF κ B (Nuclear Factor κ B) やMAPキナーゼファミリー等のシグナル伝達系を活性化し、種々の炎症性サイトカインの放出を促進する。このような多様な生理作用を持つことから、エンドトキシンの測定にマクロファージの活性化を測定する方法も提唱されている。

1. 局方エンドトキシン試験法では、ゲル化法、濁度法、比色法の3法があり、3法の適用が可能か評価をした上で、いずれの試験法でも評価可能であればそのうちのいずれかの試験法を実施してよいとされている。また、試験結果に疑義がある場合においてはゲル化法での試験を最終判定とするとされている。
2. エンドトキシンの試験では多くの物質が試験の妨害や活性化を引き起こすことが知られている。エンドトキシン試験の実施に際しては、エンドトキシン標準品の希釈系列を作製して被検液に添加した予試験を行い、添加した標準品の十分な回収が得られることを確認することにより、活性化や妨害物質がないことを評価する必要がある。妨害物質や活性化物質が含まれている場合にはエンドトキシンを含まない注射用水等の適切な液を用いて十分な希釈を行う必要がある。
3. エンドトキシン試験の実施に際してはエンドトキシン標準品の希釈系列を作製し、同時に試験を行うことが求められる。
4. 局方参考情報ではエンドトキシンの規格として、静脈注射においては患者の体重あたりの限度値として5 EU/Kg 以下であることを求めている。エンドトキシンの混入がこれ以下にコントロールされていれば発熱などの副作用は起きないとされる量であり、リスク管理として一応の目安となる。

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後述するようないくつかの課題が存在する。

その前に局方で規定されて試験法で再生医療等製品に適用する際の課題を整理しておく。まず、<4.01>では、ライセート試薬の表示感度の確認では、エンドトキシン標準品の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エンドトキシン標準品を用いる必要がある。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感度や妨害物質の有無を求めるのは合理的とはいえない。

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^(1,2)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⁽³⁾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⁽⁴⁾。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、細胞をコーラ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。

C.3. 市販キット製品のエンドトキシン試験への適用についての評価

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、局方試験法には沿っていないことになる。また、3法以外のライセート試験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、タ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することができないか検討した。

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し、さらにエンドトキシンフ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よりも高くなかった。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

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。テイラーメイドとしての特徴を有する再生医療等製品に対して、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と考えられる。

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試験法の適用に関して十分な評

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、局方エンドトキシン試験で試験ごとに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。

市販のエンドトキシンキットを利用する場合に局方への適合させるためには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に関する予試験が必要とされるが、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は時間的制約もあり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ことを考慮する必要がある。

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っ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。

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いその課題を検討した。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を示された。ただ、あらかじめどの程度希釈すれば測定に影響が出ないかあらかじめ評価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じっしされていれば市販キットの使用も可能と考えられる。

<謝辞>

本研究でエンドトキシ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: Angiogenic Cell Therapy for Severe Ischemic Diseases. *Chem. Pharm. Bull.* 36, 176-181 (2013)
- 4) 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)
- 5) 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
- 6) 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)
- 7) 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

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

- 9) 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-2 実用新案登録 なし

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

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）
－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－

分担研究者 大阪大学微生物病研究所 教授 生田 和良、助教 黒須 剛
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 24-26 年度研究要旨：

フィブリノゲン製剤の製造工程に導入されているウイルス除去膜（19nm）の mo-vCJD 除去能力について Western blot（WB）法にて実施したところ、効果的な vCJD 除去能力を示した。更に、mo-vCJD 除去デバイスの探索として、Qyu Speed D（陰イオン交換能を有するフィルター）について、Fibrinogen を共存蛋白として用いて mo-vCJD 除去能力を評価したところ、効果的な vCJD 除去能力を示した。マウス PrP^{sc} 強発現細胞（RK13mo1）を入手し、mo-vCJD 感染マウス脳材料をこの細胞に感染させたところ、感染は成立するものの不安定な結果が得られたことから、更に実験条件を最適化する必要が有る事が判明した。RK13mo1 細胞を用いた感染実験系は WB 法を代替する感染価測定系として利用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。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）法による評価系の確立及び工程評価への応用を目的として以下の検討を行った。

血漿分画製剤である、アンチトロンビン製剤に導入されているウイルス除去膜（平均孔径 15nm）及び Fibrinogen 製剤の製造工程の製造工程に導入されているウイルス除去膜（平均孔径 35nm 又は 19nm）の vCJD 除去能力をウエスタンブロット（WB）法により評価した。また、mo-vCJD 除去デバイスの探索として、Qyu Speed D（陰イオン交換体、QSD）について検討した。更に、マウス PrP^{sc} を強発現する RK13mo1 細胞株を入手し、動物を用いた感染価測定法に代わる Cell-based infectivity assay の確立をめざして感染価測定法を検討した。

B. 研究方法

(1) 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 35nm, 19nm 又は 15nm）の vCJD 除去能力評価（図 1）

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 のシリジフィルターでろ過し、sMF とした。アンチトロンビン製剤に導入されているウイルス除去膜（平均孔径 15nm）、フィブリノゲン製剤のウイルス除去膜（平均孔径 35nm 又は 19nm）の工程直前液に sMF を加え、ろ過前後の PrP^{sc} 総量（総 WB-titer = non-detectable end point dilution titer に液量を乗じたもの）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。WB 法はサンプルに 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℃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℃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 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。

(2) Qyu Speed D (陰イオン交換体、QSD) 検討：

新規のプリオン除去能力を有する膜の探索として、陰イオン交換能を有する Qyu Speed D を評価した。PBS 又はフィブリノゲン溶液に sMF を添加し、ろ過前後の PrP^{res} 総量 (総 WB-titer) を WB 法より求め、前後の総量の差を除去係数 (LRV) として求めた。

(3) 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^{res} 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、フィブリノゲン製剤の製造工程に導入されている平均孔径 15nm, 19nm, 35nm のウイルス除去膜工程における除去能力を WB 法で評価したところ、15nm の除去膜はこれまでに実施したスクレイピー263K と同様に mo-vCJD (PrP^{res}) を検出限界以下にまで除去する事を確認した (表 1、図 2)。また、19nm も同様に検出限界以下にまで除去したが、35nm は一部のプリオン蛋白が膜を通過し、検出限界以下にまでろ過できなかった (表 2)。

粒子径と膜孔径の差を利用してプリオンをろ過するウイルス除去膜に加え電氣的にプリオンを吸着すると考えられる膜 (QSD) を評価したところ、PBS 及びフィブリノゲン溶液中でもプリオン

を除去できる事を確認した (表 3)。

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^{res} 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^{res} 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。平均孔径 19nm 及び 15nm のウイルス除去膜は vCJD を WB レベルで検出限界以下にまで除去できる事を確認した。また、電氣的吸着能を有する膜もこれまでの検討からデプスフィルターが有効である事を示したが、これに加え QSD もプリオンを吸着除去する事を確認した。これらの事から、バイオ医薬品の製造工程におけるプリオン除去をより堅牢にするにはこれらの機作の異なる膜を組み合わせる事が有効である事が明らかになった。

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応用可能であり、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。また、電氣的特性を有する膜もプリオン除去に有効である事がわかった。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 21st 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

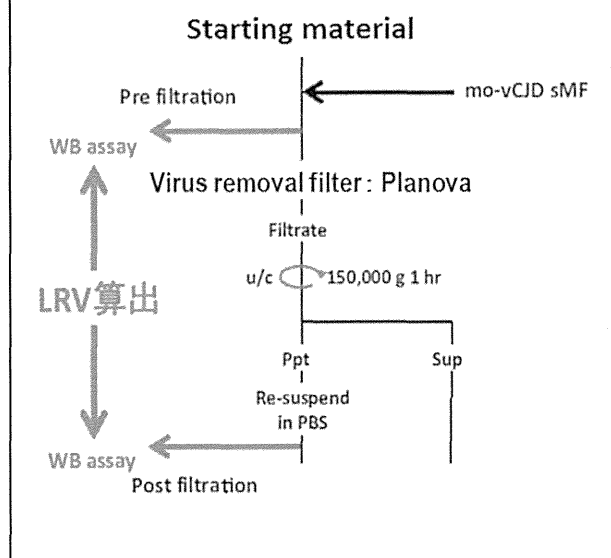


表1

	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

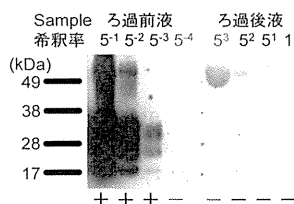


表2

膜孔径によるろ過

Filter	35 nm	19 nm	15 nm	
Preparation	Fibrinogen		Antithrombin	
Titer	Before filtration	2.7	2.6/2.6	2.5
	Filtrate	1.5	<0.9/<0.9	<0.3
LRV	1.2	≥3.5	≥2.8	

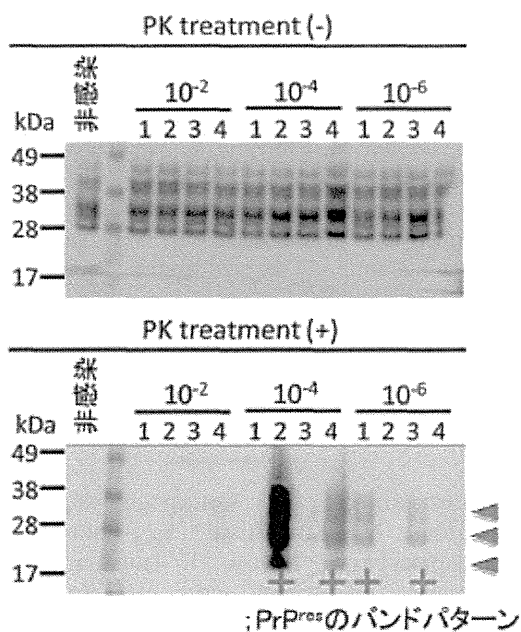
表3

電荷による吸着除去

Filter	Qyu Speed D		
Preparation	PBS	Fibrinogen	
Titer	Before filtration	4.6	3.9
	Filtrate	1.1	<0.3
LRV	3.5	≥4.2	

図3

感染3週後の細胞中のプリオン (WB 結果)



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 年度分担総合研究報告書)

ウイルス等感染性因子安全性評価に関する研究 (H24-医薬品-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、久保 純、大久保 祐士

平成 24-26 年度研究要旨：

これまでにマウス馴化 vCJD (mo-vCJD) 株感染脳を接種材料としてマウスモデルを用いた *in vivo* 評価手法の確立を検討した。この脳由来のスパイク材料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ところ、ろ液には感染性は認められず、プリオン除去能 (Log Reduction Value, LRV) は、 ≥ 4.2 であった。この結果より、このウイルス除去膜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。さらに、vCJD 持続感染株 (MV63) を接種材料とした *in vivo* 評価手法を確立し、細胞抽出物、培養液の超遠心沈殿及び上清 (TCA で沈殿化) を用いて接種実験を行ったところ、細胞抽出画分と培養液の超遠心沈殿にプリオン伝達性が認められた。vCJD (感染脳及び感染細胞、培養上清) を用いた *in vivo* プリオン感染評価系を確立した。

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。これまでに、マウス馴化 vCJD (mo-vCJD) 株感染脳を用いた *in vivo* 評価系を確立した。今期はこの評価系を用いて 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について実用性を確認する事を目的として検討した。また、生体由来試料に類似した実験試料として vCJD 持続感染細胞に着目し、その細胞株 MV63 細胞由来の抽出物と培養上清の超遠心沈殿物及び上清の感染性を評価し、*in vivo* 評価系の確立を試みた。

B. 研究方法

(1) アンチトロンビン製剤に導入されているウイルス除去膜 (平均孔径 15nm) のプリオン除去能評価：

接種材料の調製：mo-vCJD 株感染マウス脳由来 sMF を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添加した (ろ過直前液)。その溶液の一部をウイルス除去膜により処理した (ATIII ろ過液)。ろ過液は、さらにその一部を超遠心分離 (150,000 x g 1 時間) により、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 により希釈した後、接種材料とした (図 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 ≥ 2.8 であった (表 1、図 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 μ 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^{res} 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。

感染実験による感染価及び LRV の算出：ろ過前後の検体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 ID₅₀ 値を算出した。感染が認められなかった検体については、段階希釈群の直近希釈群が全て感染陽性と仮定して ID₅₀ 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。

(2) vCJD 感染細胞を用いた *in vivo* 評価：

培養細胞からの PrP^{res} 調製法の検討：細胞はこれまでに株化した 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_148 を用いた。細胞培養は 5% CO₂、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。得られた細胞について、細胞破碎を目的とした凍結融解を 2 回繰り返す、超音波処理を行ったのち、PBS を用いて 5 x 10⁷ cells/ml 相当となるように調整し、細胞抽出画分とした。

vCJD 感染細胞抽出画分、培養上清の超遠心沈殿及び上清の TCA 沈殿を用いた動物接種実験：

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 回繰り返す、超音波処理を行ったのち、PBS を用いて 5 x 10⁷ cells/ml 相当 (1% mo-vCJD 脳乳剤相当) 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 3)。

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、生後 4 週齢の FVB/n マウス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、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^{res} 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。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) アンチトロンビン製剤に導入されているウイルス除去膜 (平均孔径 15nm) のプリオン除去能評価：

採取した脳サンプルを WB 法にて感染価を Karber 法で算出したところ、ろ過前液は 5.2 Log ID₅₀/ml、ろ液は <1.0 Log ID₅₀/ml (検出限界以下) であった。更に、病理学的評価 (HE, IHC) も実施し、WB 法と同様の結果を示した (表 2)。以上の結果から、本工程における LRV は ≥4.2 と算出された (表 3)。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 ≥6.2 であった (表 2、3)。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。

(2) vCJD 感染細胞を用いた *in vivo* 評価：

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 PrP^{res} 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 (図 4)。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 (表 4)。

D. 考察

バイオ医薬品の製造工程におけるプリオン除去効果の検討を行う場合 WB 法が一般的であったが、*in vivo* 評価系 (BA) が WB 法よりも高感度であることが改めて示された。

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その原料であり、そこに混入する性状と同等のプリオン材料を用いるのが現実的である。本研究より細胞由来のプリオン材料 (PrP^{res} 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。以上の結果より、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感染試料として使用できる可能性を示唆した。

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。また、評価に用いるプリオンは脳のみならず培養細胞由来の材料も利用可能である事が示された。