

厚生労働科学研究費補助金
肝炎等克服緊急対策研究事業

血液中でのプリオンタンパクの存在様式の
解析と血液製剤からのプリオン除去の研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 岡田 義昭

平成15（2003）年3月

目次

I. 総括研究報告書

血液中でのプリオンタンパクの存在様式の解析と 血液製剤からのプリオン除去の研究	P1 - P3
主任研究者	岡田 義昭

II. 分担研究報告

1. 血液中でのプリオンタンパクの存在様式の解析と in vitro 感染系の確立	P4 - P9
	岡田 義昭
2. ヒト血液成分における正常プリオンタンパクの 分布に関する研究	P10 - P16
	水沢 左衛子
3. 実験動物を用いたプリオンタンパクの存在様式 及び動態についての病理学的解析	P17 - P23
	永田 典代

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	P-24
---------------------	------

IV. 研究成果の刊行物・別冊	P25 - P45
-----------------	-----------

総括研究報告書

血液中でのプリオンタンパクの存在様式の解析と血液製剤からの除去の研究

主任研究者 岡田義昭 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 室長

研究要旨 血液を介したプリオン病の感染を防ぐための基礎的検討として、血液中での正常プリオンタンパクの存在様式を解析した。血液を血漿と細胞成分、さらに細胞を CD3、CD19、血小板に精製してプリオンタンパクを検出したところ、主に血小板に存在していることが明らかになった。また、megakaryocyte 様の細胞株からも PrP^c が検出された。一方、マウスリンパ球の一部の subset は FDC (follicular dendritic cells) が産生する BLC に対して遊走性を示した。感染早期において FDC に PrP^{sc} が検出されることからリンパ球のプリオン病の感染における何らかの役割が示唆された。また、診断に必須なパラフィン切片での免疫組織染色を検討し抗体の選択、非特異的反応の抑制条件等を検討した。in vitro 感染系確立のために N2 細胞から神経細胞様の形態を持つサブクローン株を選択した。今年度得られたこれらの知見を来年度の感染実験で証明する予定である。

分担研究者

水沢 左衛子 国立感染症研究所
血液・安全性研究部
主任研究官
永田 典代 国立感染症研究所
感染病理部
研究員

PrP^c の分布の解析を試みた。また、感染初期に FDC に PrP^{sc} が蓄積することから、プリオン除去の評価や早期診断に FDC での PrP^{sc} 検出を行う必要があり、マウス、ラット、カニクイザルの 2 次リンパ組織や脳での正常 PrP^c の発現の検討を実施した。また、これまでの研究がマウスを使った in vivo の研究であったので、結果が得られるまで長期間を要した。時間の短縮と簡便性、動物福祉の立場から培養細胞を用いた in vitro 感染系の確立も目指した。

B. 研究方法

1. in vitro 感染系に関する研究

これまでの報告からマウス由来の神経芽細胞種 N2 が PrP^{sc} に感受性を示すことが明らかになっている。N2 細胞からより高感受性のクローンを選択するために 10cm ディッシュに N2 細胞を薄く播き、様々な形態をとる細胞のクラスターをペニシリンカップを用いて分離・培養してクローンを得た。これ

A. 研究目的

英国における牛海綿状脳症(BSE)の発生後にヒトにおいて初めて確認された variant CJD は、臨床上的特徴の他に末梢リンパ組織から PrP^{sc} が容易に検出されることから輸血や血漿分画製剤を介して感染する危険性が警告された。そのため輸血や分画製剤の安全性確保の上で PrP^{sc} の混入を防ぐことが緊急課題となった。感染を防ぐためには血液のどの成分に多く存在するのか、どのようにして体内に侵入してきた PrP^{sc} が脳に達するのか等を明らかにすることが重要である。そこで、血液中での

らのクローンの細胞表面の正常プリオンタンパクの発現をフローサイトメトリーで解析し、同時にウエスタンブロットで細胞のプリオンタンパクの発現を解析した。

2. 血液製剤からの除去の研究

vCJD や遺伝的 CJD のマウス馴化株を用いた実験から白血球に感染性が証明されている。バツフィーコートには好虫球、リンパ球、単球などが含まれており、これらの細胞が感染又はキャリアとしてプリオンを運ぶ可能性がある。北本らが報告している感染初期に FDC (follicular dendritic cell) に PrP^{sc} が検出できることに注目し、FDC が産生しているケモカイン、BLC (B lymphocyte chemoattractant) に対するリンパ球の遊走性を解析した。

3. 血液成分における正常プリオンタンパクの分布に関する研究

ヒトの血液から CD45、CD3、CD19、血小板、血漿などを分離、精製し PrP^c の発現をフローサイトメトリーとウエスタンブロット法で解析した。また、Megakaryocyte 様の性質を持つ細胞株も同様に PrP^c の発現を解析した。

4. 実験動物を用いたプリオンタンパクの存在様式及び動態についての病理学的解析

感染実験を実施し、感染の程度を評価する上で必要なプリオンタンパクを認識する抗体の検討を凍結切片やパラヒン切片を用いて検討した。また、免疫組織染色で問題となる非特異的反応を抑えるためトリプシン処理を行い、特異性を検討した。

C. 研究結果

1. N2 細胞は形態的に種々のクローンを含んでおり、様々な形態をとる細胞株が得られたが神経

突起様の突起を出す細胞株と胞体が大きな細胞株の 2 つに分けられた。どのクローンも細胞表面にプリオンタンパクを発現していたがクローンによって発現量は異なっていた。

2. FDC が BLC を産生することから脾細胞と PEC (peritoneal exudative cell) の BLC に対する遊走性を検討したところ、脾細胞にも遊走性が認められたが、PEC に高い遊走性が認められた。

3. CD45、CD3、CD19、血小板での PrP^c の発現が確認されたが、主に血小板画分から検出された。血小板を除いた血漿中の PrP^c は検出感度以下になった。Megakaryocyte 様の性質を持つ細胞株からも同様の PrP^c の発現が確認できた。

4. マウス、ラット、カニクイザルにおいてヤギ由来の C-20 及び M-20 抗体が免疫組織染色では有効であることが示された。また、トリプシン処理によって非特異的反応が減少し、良好な結果が得られることが明らかになった。

D. 考察

今年度は感染性の PrP^{sc} を使用せず、正常なプリオンタンパクを発現する細胞や血液中での分布などを検討した。他の報告と同様に血小板が血液中では発現が多かった。興味深いのは megakaryocyte 様性質を持つ細胞株においても正常プリオンの発現が認められた。ヨーロッパでは貯留前白血球除去がプリオン病の予防のために導入されているが効果について議論がある。効果がないと考えている主な理由は、フィルターによっても血小板を取り除くことができないことによる。一方で、効果があると考えている人たちは正常なプリオンタンパクは確かに血小板に存

在するが、感染性のプリオンは白血球に存在していると言う説を持っているヒトたちである。PrP^{sc}が血液のどの部分に存在しているのか詳細に解析することは科学的にも行政的にも重要である。また、マウスを使った *in vivo* の実験はこれまでプリオン病解析に貢献してきたが、結果が得られるまで長期間かかること、飼育する施設等の制約があり *in vitro* の感染系の確立が切望されてきた。マウス神経芽腫由来の N2 細胞は PrP^{sc} に感受性があると報告され、我々も神経細胞類似のクローンを多数選択した。この評価は来年度に実施する予定でいる。

E. 結論

ヒト血液中での PrP^c 血小板から主に由来することが明らかになった。さらに、マウスでは FDC が産生するケモカイン BLC に遊走性する細胞が存在することが示され、感染の成立に何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。ヤギ由来の C-20 及び M-20 によってマウス、ラット、カニクイザルの PrP^c がホルマリン固定のパラフィン切片で染色されることが示された。

F. 健康危機情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

岡田義昭、奥山堅司、水沢左衛子：パルボウイルス B19 の感染系の確立とその応用。
第 50 回日本ウイルス学会。2002 年。

H. 知的所有権の取得状況

なし

分担研究報告書

血液中でのプリオン存在様式の解析と in vitro 感染系の開発

主任研究者 岡田義昭 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 室長

研究要旨 体内に侵入した PrP^{sc} が中枢神経に達する機構の解析として、FDC に注目し FDC が産生するケモカインである BLC に対する遊走性を脾細胞や腹腔内に存在する PEC (peritoneal exudative cells) を用いて解析し、PEC に高い遊走性が認められた。PEC を介して FDC にプリオンタンパクが運ばれる可能性が示唆された。また、N2 細胞から形態的に神経系に近い細胞株を多数分離し、1 部の細胞は神経細胞様の形態を呈した。

A. 研究目的

英国における牛海綿状脳症(BSE)の発生後にヒトにおいて初めて確認された variant CJD は、臨床上的特徴の他に末梢リンパ組織から PrP^{sc}が容易に検出されることが明かとなった。従来の CJD (古典的 CJD) が末梢リンパ組織から PrP^{sc}が検出されないことや発症前に供血した血液を輸血されたヒトが CJD に感染しなかったことなどから血液を介した感染はない、と考えられていたので、vCJD の発生によって輸血や血漿分画製剤を介して感染する危険性が警告された。また、BSE に感染したヒツジから採血し、非感染のヒツジに輸血する感染実験によって BSE 発症前のヒツジの血液によっても BSE が伝播されることが示された。そのため輸血や分画製剤の安全性確保の上で PrP^{sc}の混入を防ぐことが緊急課題となった。混入を防ぐためには血液のどの成分に多く存在するのか、どのようにして体内に侵入してきた PrP^{sc}が脳に達するのか等を明らかにすることが重要である。また、これまでの研究がマウスを使った in vivo の研究であったので結果が得られるまで長期間を要したので、時間の短縮と簡便性、動物福祉の立場から培養細胞を用いた in vitro 感染系の確立を目指した。

B. 研究方法

1. in vitro 感染系に関する研究

これまでの報告からマウス由来の神経芽細胞種 N2 が PrP^{sc} に感受性を示すことが明らかになっているので、N2 細胞からより高感受性のクローンを得ることにした。10cm ディッシュに N2 細胞を薄く播き、様々な形態をとる細胞のクラスターをペニシリンカップを用いてクラスター毎に分離・培養してクローンを得た。これらのクローンの細胞表面の正常プリオンタンパクの発現をフローサイトメトリーで解析し、同時にウエスタンブロットで細胞のプリオンタンパクの発現を解析した。

2. 血液製剤からの除去の研究

今までの報告ではヒトの vCJD 患者の白血球から感染性は証明されていないが、vCJD や遺伝的 CJD のマウス馴化株を用いた実験から白血球に感染性が証明されている。所謂バツフィーコートには好虫球、リンパ球、単球などが含まれており、これらの細胞が感染又はキャリアーとしてプリオンを運ぶ可能性がある。我々はどのような細胞が感染に関与しているか解析するために、北本らが報告している感染初期に FDC (follicular dendritic cell) に PrP^{sc} が検出できることに注目し、FDC が産生し

ているケモカイン、BLC (B lymphocyte chemoattractant) に対するリンパ球の反応を遊走性と産生している臓器に関して解析した。

C. 研究結果

N2 細胞は形態的に種々のクローンを含んでおり、様々な形態をとる細胞株が得られたが神経突起様の突起を出す細胞株と胞体が大きな細胞株の 2 つに分けられた。どのクローンも細胞表面にプリオンタンパクを発現していたがクローンによって発現量は異なっていた。継代によってこれらの形態的特徴は消失したがジブチリル c AMP 刺激によってこれらの形態的特徴を誘導することが出来た (fig.1 と 2)。

FDC が BLC を産生することから遊走性を検討するために BLC をチャンバの外側に添加し、チャンバ内に脾細胞や PEC(peritoneal exudative cell) を入れ BLC への遊走性を解析した。脾細胞にも遊走性が認められたが、PEC に高い遊走性が認められた (fig.3)。腹腔の BLC 発現を RT-PCR で解析するとパイエル板に強いシグナルが検出された (fig.4)。

D. 考察

血液を介したプリオンの感染機構を考える上で、生体内に入ってきた PrP^{sc} が脳まで達する経路の解析は重要である。もし、血液が関与して感染が生じるならそのルートを遮断する処置を導入することによって、例えば PrP^{sc} が検出できなくとも、混入を防ぐことができるからである。我々は神経系と免疫系とを結び付ける生体分子や細胞を検索しているが、プリオンタンパクが腹腔からリンパ組織に存在している FDC に達する 1 つの機構を仮説ながら示すことができた。来年度はマウスにアダプトしたスクレイピーを用いて詳細に検討す

る予定である。また、FDC から神経系に至る経路に関与する生体分子や細胞も解析する予定である。また、in vitro での感染系確立のために N2 細胞からサブクローンを分離した。神経系に感染することから神経細胞様の突起を刺激なしに出している細胞や胞体の大きな細胞などが得られ、来年度には感染実験を予定している。

E. 結論

N2 細胞から神経突起様の突起を出す細胞株や胞体が大きな細胞株などの様々な形態をとる細胞株が得られた。また、FDC に PrP^{sc} が早期に蓄積する機構として FDC が産生する BLC と腹腔に存在しているリンパ球との関係が示唆された。

F. 健康危機情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

岡田義昭、奥山堅司、水沢左衛子：パルボウイルス B19 の感染系の確立とその応用。

第 50 回日本ウイルス学会。2002 年。

H. 知的所有権の取得状況

なし

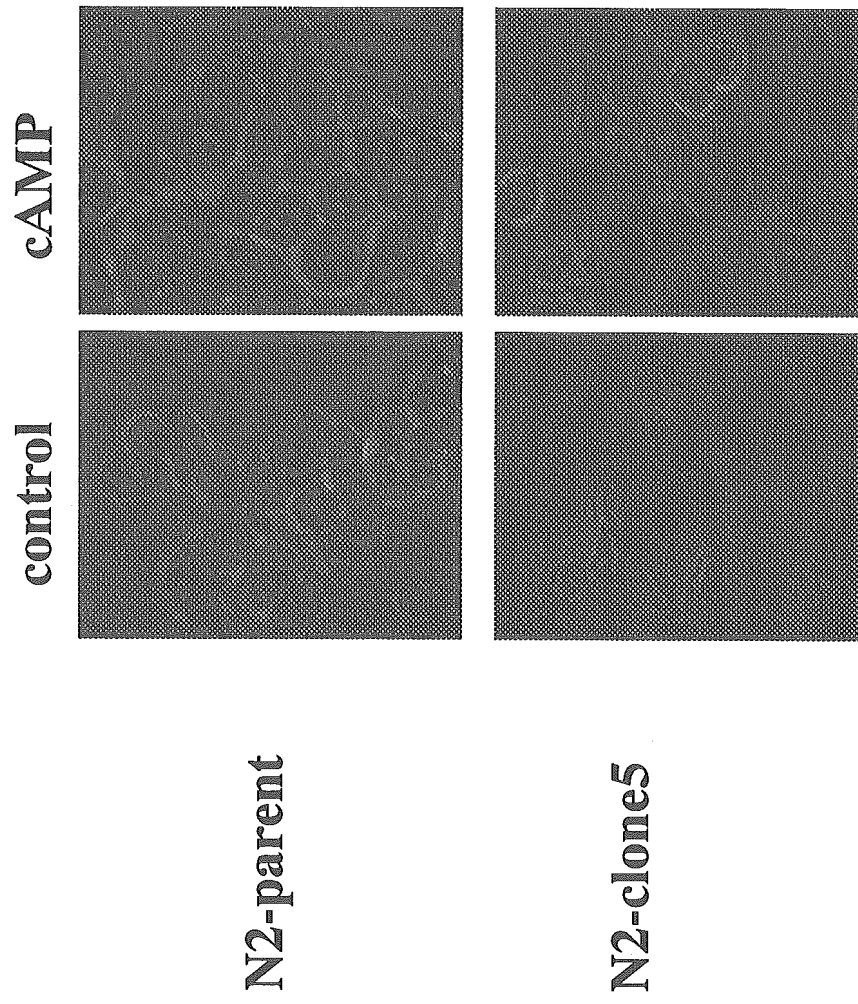


Fig.1 Characteristic of clone derived from N2

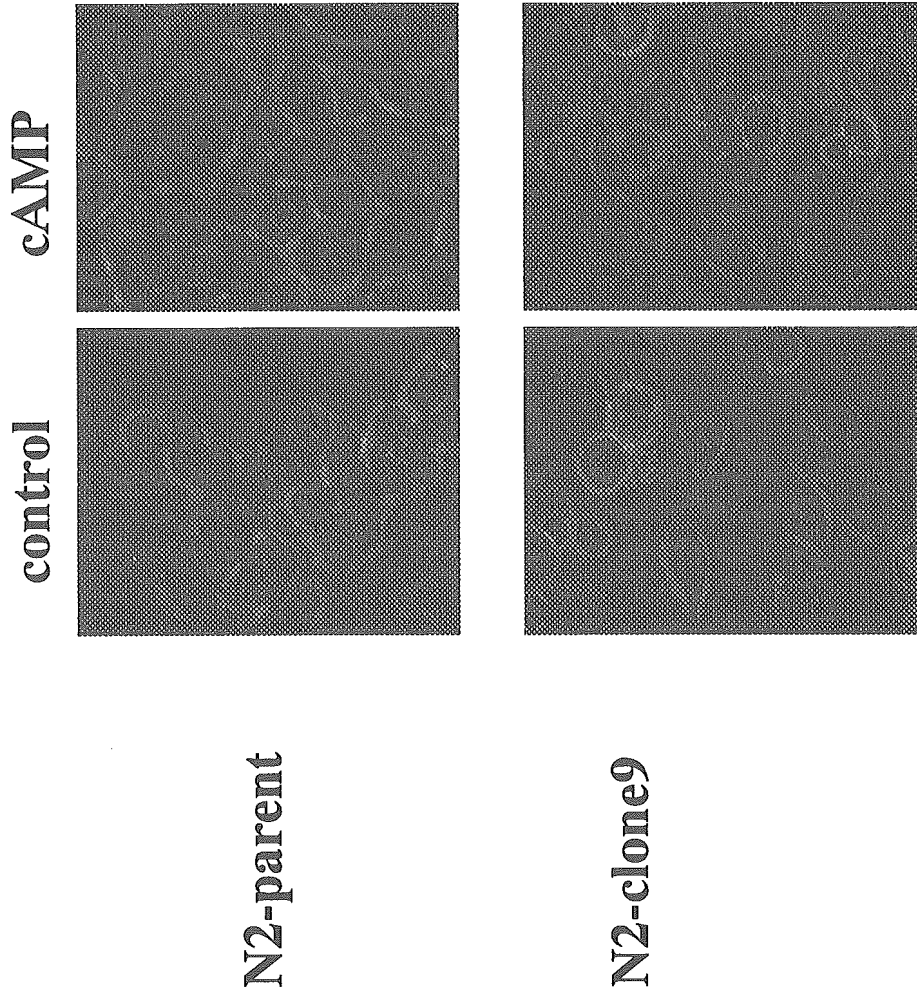


Fig.2 characteristic of clone derived from N2

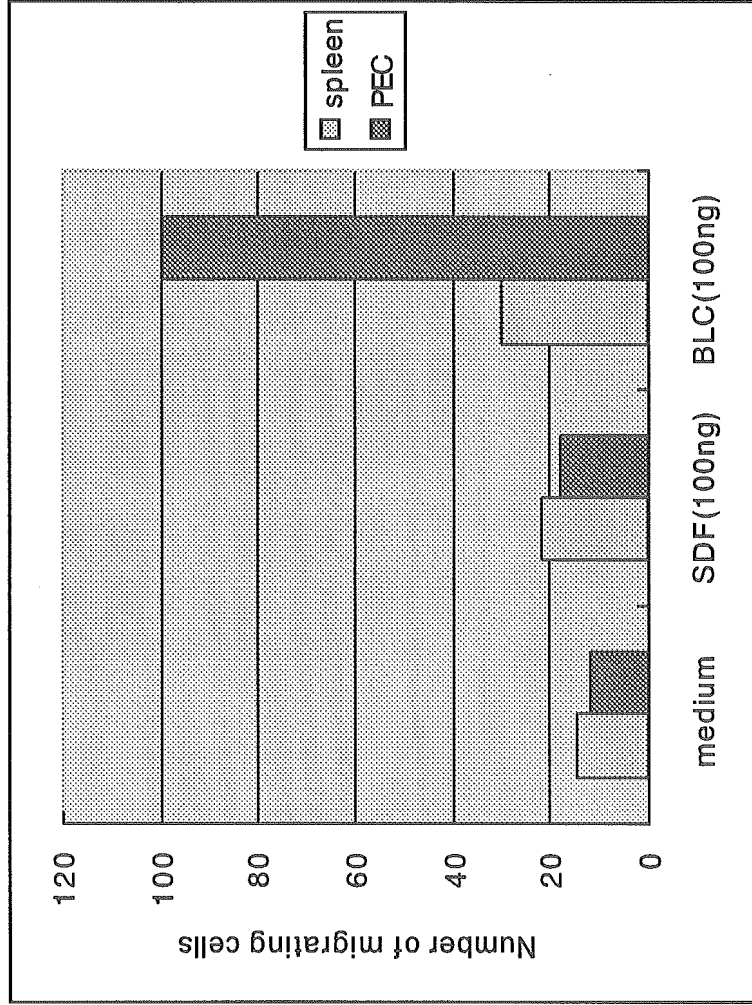
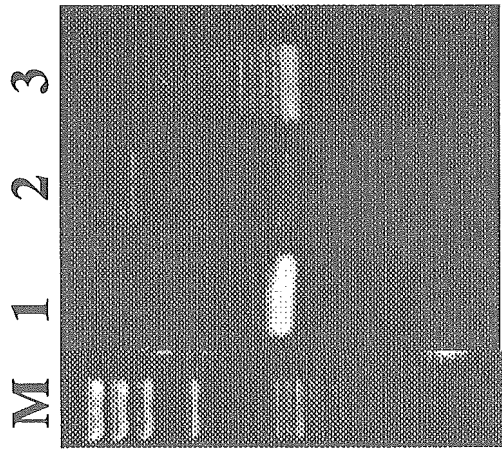


Fig.3 Migration of PEC for chemokine



1.Payer patch

2.small intestine

3.mesenteric L.N.

Fig.4 Expression of BLC in secondary lymph organs

厚生労働科学研究費補助金(肝炎等克服緊急対策研究事業)
分担研究報告書

ヒト血液成分における正常プリオンタンパクの分布に関する研究

分担研究者 水沢左衛子 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 主任研究者
協力研究者 岡田 義昭 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 第一室室長

BSE が輸血によって感染することを示唆する動物実験が報告されている。病原性プリオンプロテインの取り込みや伝播に正常プリオンプロテインを発現している血球がかかわっているかどうかは不明である。本研究ではヒトの血液の各成分を分析し、正常プリオンプロテインの分布を検討し、以下のことが明らかになった① PrP^Cが CD3+ T cell, CD19+ B cell で同程度に発現していることをフローサイトメトリーとウエスタンブロットで確認した。②正常プリオンプロテインは主に血小板画分に分布していた。血漿中の PrP^C は検出できなかった。③Megakaryocyte 的な性質を有する白血病由来細胞株 5 株のうち 4 株が正常プリオンプロテインを発現していた。

A. 研究目的

ウシ海綿状脳症(BSE)の感染による variantCJD(vCJD)の症例はイギリスを中心として125例にのぼる(2002年4月1日)。動物を用いた実験では輸血によるBSE感染が示唆されている。ヒトのvCJDが輸血を介して感染するか否かは不明であるが、潜伏期間中のドナーの血液から製造された輸血用血液と分画製剤による2次感染のリスクを減少させるにはどのような方法をとるべきか議論されている。病原性プリオンプロテイン(PrP^{Sc})の取り込みや伝播に正常プリオンプロテイン(PrP^C)を発現している血球がかかわっているかどうかは興味ある問題であるが不明である。本研究では血液の各成分におけるPrP^Cの分布を明らかにすることを目的にして、抗プリオン抗体を用いたフローサイトメトリーとウエスタンブロットによって血液の各成分を分析した。

B. 研究方法

リンパ球、血小板画分及び血漿の調製：採血翌日の400ml 献血血液由来パuffyコートから血液の各成分を調製した。パuffyコートは東京都西赤十字血液センターから譲渡を受けた。生理食塩水で2倍希釈したパuffyコート20mlをリンフォセパール(免疫科学

研究所)20mlに重層、室温で2000rpm、10分間遠心してリンパ球層を採取した。PBSで洗浄後、さらにMACS磁気分離カラムを用いてCD45+リンパ球、CD3+ T cell, CD19+ B cellを分離した。パuffyコーートを1500rpm10分間遠心した上清を血小板リッチ血漿とし、それをさらにエッペンドルフ遠心機で10000rpm3分間遠心した上清を血漿、沈殿を血小板画分とした。

培養細胞株：PrP^C発現細胞株としてヒト glioblastoma 由来細胞株T98G(JCRB 9041)、マウス neuroblastoma 由来細胞株N2a(ATCC: CCL-131)及び当研究室で作成した組換えヒトプリオンタンパク発現プラスミドを導入したCos7細胞株(COS7 PrP)を用いた。Megakaryocyteに特徴的な性質を有する細胞株として使用した白血病由来細胞株CMK85-2, CMK85-L, CMY20, CMS, CTSは国立感染症研究所布施明室長より分与された。

フローサイトメトリー：1次抗体として抗ヒトプリオンペプチド(アミノ酸214-230)ウサギ抗血清P5、2次抗体として抗ウサギIgG PE標識ヤギポリクローナル抗体を用いてリンパ球とT98G培養細胞の表面に発現しているPrP^Cを標識し、Coulter社Epics®で分析した。

ウエスタンブロット：リンパ球、血小板画分、

培養細胞及び血漿は SDS-PAGE サンプルバッファ中で 100℃加熱、SDS-12.5%ポリアクリルアミドゲル (パジエル NPU-12.5L、アトー社) を用いて 100V、2 時間の電気泳動 (12.5%SDS-PAGE) によって分離後、polyvinylidone difluoride 膜 (Immobilon®, Millipore 社) に転写、ブロックエース (大日本製薬) で一晩ブロッキングを行った。PrP^C の検出には抗プリオン マウスモノクローナル抗体 3F4 あるいは SAF32 を 1 次抗体、ビオチン標識抗マウス IgG ヤギポリクローナル抗体を 2 次抗体として、洗浄後にアビジン: ビオチン化 HR パーオキシダーゼ複合体を結合させ (Vectastain ABC キット、フナコシ)、ルミノール酸化による化学発光を ECL ミニカメラで検出した (ECL ウェスタンブロッティング検出システム、アマシャム)。陽性コントロールとして大腸菌で発現させた 219 アミノ酸鎖長の組換えウシプリオンタンパク (Prionics 社) を用いた。

C. 研究結果

CD45+リンパ球、CD3+ T cell、CD19+ B cell の細胞表面におけるプリオンタンパクの発現をフローサイトメトリーにより検討した。図 1 は各リンパ球画分の PE 蛍光のヒストグラムを示している。蛍光強度の最大値は CD45+リンパ球でやや高く、CD3+ T cell と CD19+ B cell はほぼ同じであった。

CD45+リンパ球、CD3+ T cell、CD19+ B cell における PrP^C の発現量と分子量をウェスタンブロットで分析した。図 2 A はそれぞれ 2×10^5 個の細胞を用いて 3F4 で検出した結果を示している。CD45+リンパ球、CD3+ T cell、CD19+ B cell では約 31kD のブロードなバンドが検出された。CD45+リンパでの発現量が多く、CD3+ T cell、CD19+ B cell では同程度であった。リンパ球で検出されたバンドは COS7PrP のバンドよりも分子量が大きかった。血小板リッチ血漿 $10 \mu\text{l}$ 相当量の血小板画分に強い発現が認められた (Lane7)。図 2 B に示すように SAF32 を用いると強いシグナルが得られたが、同様の結果が得られた。

血漿と血小板画分中の PrP^C の検出をウェスタンブロッティングで試みた。図 3 A は血小板、血小板リッチ血漿、血漿それぞれに含まれる PrP^C を 3F4 で検出した結果を示している。血小板画分と血小板リッチ血漿からは PrP^C が検

出されたが血小板をのぞいた血漿では検出されなかった。図 3 B に示すように SAF32 を用いると強いシグナルが得られたが、同様の結果であった。血小板リッチ血漿、血漿中には血漿画分の PrP^C と分子量の異なる 2 本のバンドが検出されたので、2 次抗体のみのブランクのバンド検出を行った結果、これらは 2 次抗体による非特異的なバンドであることがわかった (図 3 C)。

白血病由来細胞株 CMK 85-2, CMK85-L, CMY20, CMS, CTS は megakaryocyte に特徴的な性質を有し、培養中に未熟な血小板様の小胞体を産生することで知られている。これらの細株化細胞がプリオンタンパクを発現しているか否かをウェスタンブロッティングで検討した。図 4 A はそれぞれ 2×10^5 個の細胞を用いて 3F4 で検出した結果を示している。CMS を除いた CMK 85-2, CMK85-L, CMY20, CTS の 4 つの細胞株からプリオンタンパクが検出された。図 4 B に示すように SAF32 を用いると強いシグナルが得られたが、同様の結果であった。血小板画分に見られるバンドと比較すると、N2a と類似した、ブロードなバンドであった。

D. 考察

1. 磁気分離カラムを用いて分取した CD45+リンパ球、CD3+ T cell、CD19+ B cell をフローサイトメトリーで分析した結果、CD3+ T cell、CD19+ B cell の細胞表面には同程度の PrP^C が発現していることを確認した。Barclay *et al* は血球を分画しないで多色染色してフローサイトメトリーで分析して同様な結果を報告している。CD3+ T cell に比して CD45+リンパ球の蛍光強度が強かったことについては技術的な検討等が必要と思われる。
2. 同じ試料をウェスタンブロットによって分析した結果、CD45+リンパ球、CD3+ T cell、CD19+ B cell、血小板画分で PrP^C のバンドを検出した。CD3+ T cell、CD19+ B cell での発現量は同程度であった。リンパ球の細胞数や、血小板が由来する血漿量から概算すると血液中 (正確にはバフフィーコート中) のプリオンタンパクの分布はリンパ球: 血小板画分で約 1: 20 と推定された。本研究では血小板リッチ血漿を遠心した沈殿を血小板画分として

使用したので、この画分には血小板以外の成分も含まれていると考えられる。血小板を除いた血漿中には PrPC を検出できなかった。これは血漿のタンパク量が多いためウェスタンブロットで分析できたのは多くとも $5 \mu\text{l}$ であり、今回分析したリンパ球や血小板の 20 分の 1 ないし 10 分の 1 に相当するに過ぎなかったためである。血漿中の PrPC は血小板や血球と比べて量は少ないと考えられるが、濃縮するなど測定方の改良が今後必要である。なお、ウェスタンブロットでも CD3+ T cell に比して CD45+リンパ球 で PrPC のバンドのシグナルが強かった。

3. 未熟な血小板様の小胞体を産生し、Megakaryocyte 的な性質を有する白血病由来細胞株をウェスタンブロットで分析した結果、5 株中 4 株で PrPC が発現していることがわかった。その発現量と分子量はマウス neuroblastoma 由来細胞株 N2 a と類似していた。

E. 結論

1. フローサイトメトリーで分析した結果、CD3+ T cell, CD19+ B cell の細胞表面に

は PrPC が発現していた。その発現量は同程度であった。

2. ウェスタンブロットによって分析した結果、CD3+ T cell, CD19+ B cell, から PrPC のバンドが検出された。その発現量は同程度であった。
3. ウェスタンブロットによって分析した結果、血小板画分に PrPC が大量に検出された。リンパ球:血小板画分での PrPC の分布はおよそ 1 : 20 と推定された。血漿中の PrPC は検出できない程度であった。
4. Megakaryocyte 的な性質を有する白血病由来細胞株をウェスタンブロットで分析した結果、5 株中 4 株の PrPC の発現が認められた。

F. 健康危険情報
該当なし

G. 研究発表
該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

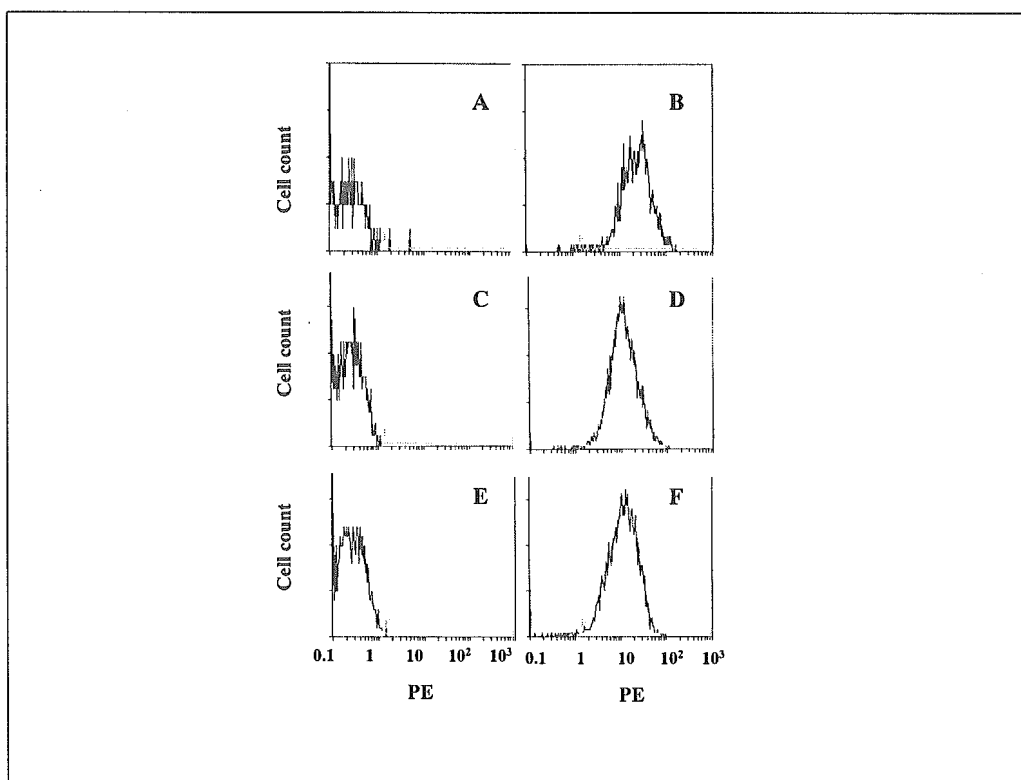


図1. 抗PrPペプチド-ウサギ抗血清P5(1次抗体)と抗ウサギIgG-PE標識ヤギ-ポリクローナル抗体(2次抗体)とで染色したリンパ球の比蛍光強度のヒストグラム. A:CD45+リンパ球, P5 (-)control, B: CD45+リンパ球+P5,C:CD3+T cells, P5(-) control, D: CD3+T cells+P5, E:CD19+B cells, P5(-) control, F: CD19+B cells +P5.

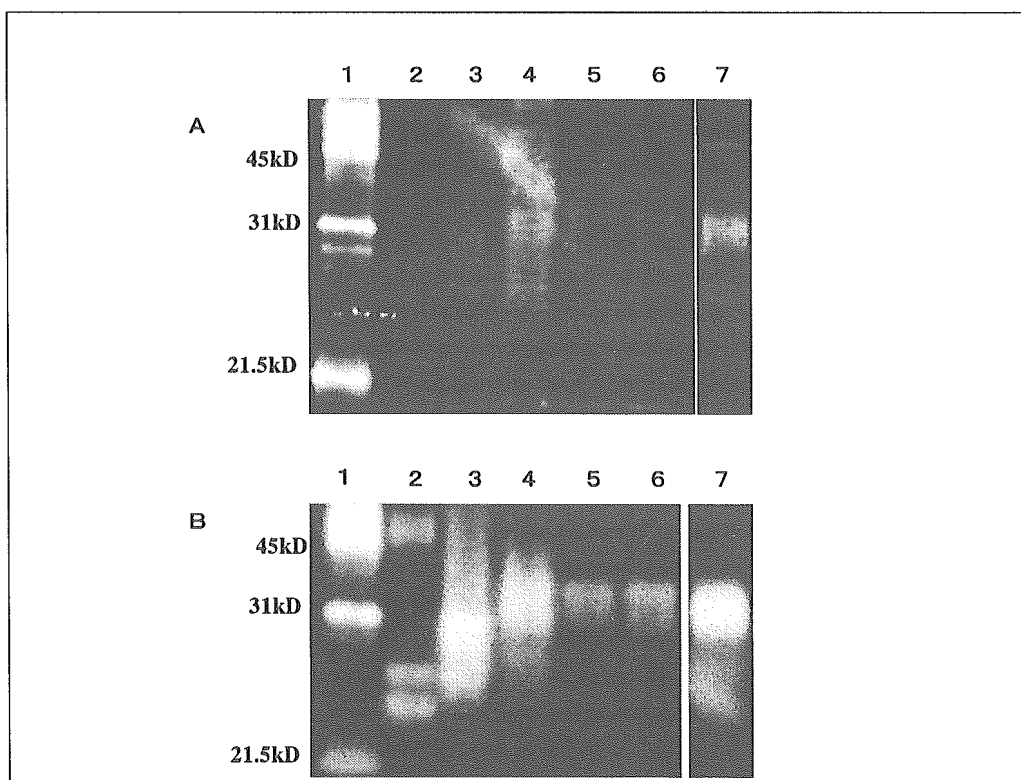


図2. 各種血球のウェスタンブロットによるPrP^Cの検出。Aは3F4を, BはSA F32を1次抗体として用いた。各Laneは、1:ビオチン化サイズマーカー、2:組換えウシPrP、3: Cos7-PrP lysate、4:CD45+リンパ球lysate (2×10^5 cells/well)、5: CD3+T細胞lysate (2×10^5 cells/well)、6: CD19+B胞lysate (2×10^5 cells/well)、7:血小板画分(血小板リッチ血漿 10μ l相当/well)。

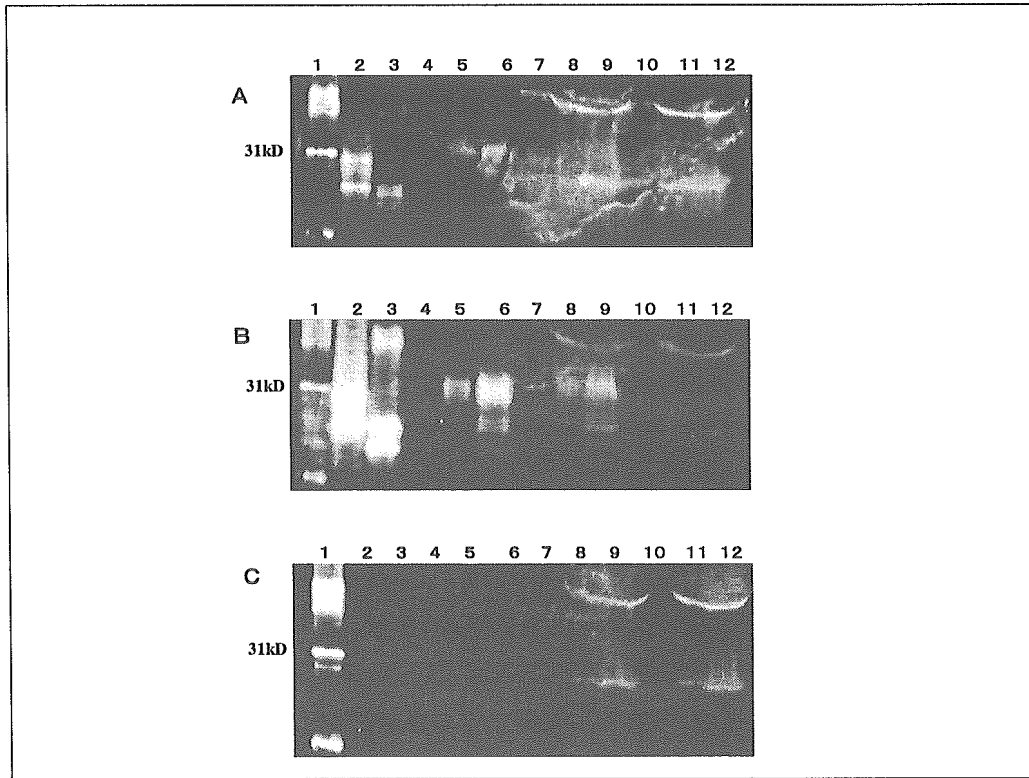


図3。血小板画分と血漿のウェスタンブロットによるPrP^Cの検出。Aは3F4を、BはSAF3 2を1次抗体として用いた。Cは1次抗体(-)コントロール。A、B、Cとも各Laneは1:ビオチン化タンパクサイズマーカー、2: Cos7-PrP lysate、3:組換えウシPrP、4:血小板画分(血小板リッチ血漿0.1 μ l相当/well) 5:血小板画分(血小板リッチ血漿1 μ l相当/well) 6:血小板画分(血小板リッチ血漿10 μ l相当/well) 7:血小板リッチ血漿0.1 μ l/well、8:血小板リッチ血漿1 μ l/well、9:血小板リッチ血漿5 μ l/well、10:血漿0.1 μ l/well、11:血漿1 μ l/well、12:血漿5 μ l/well

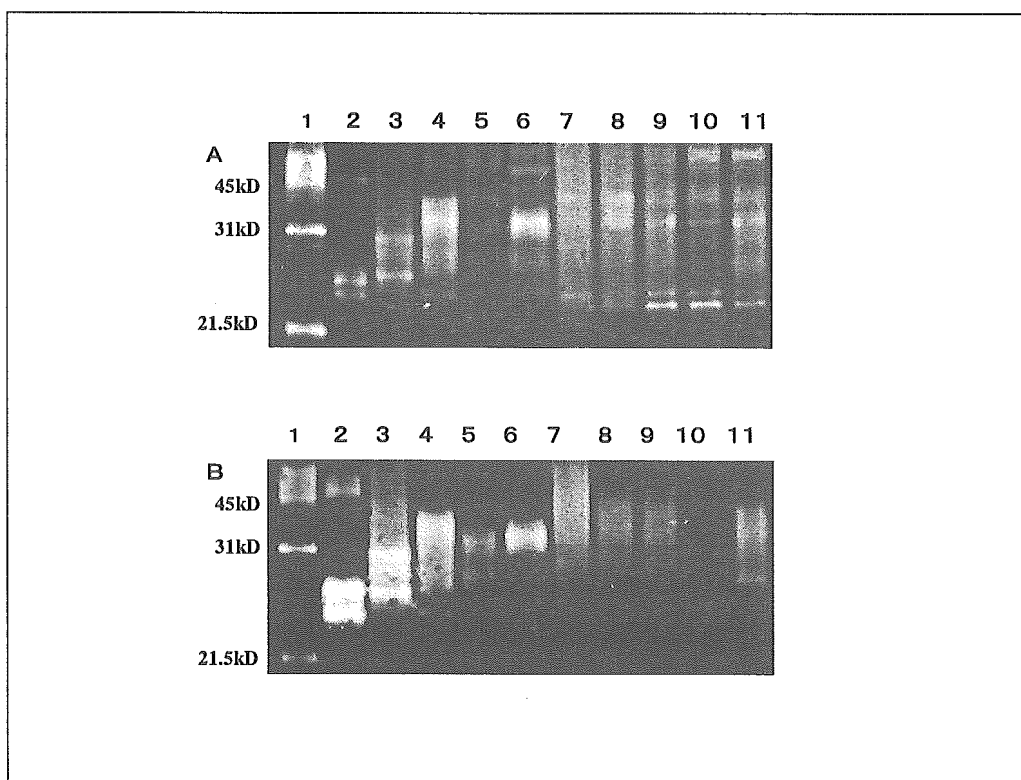


図4. 白血病由来細胞株のウェスタンブロットによるPrP^Cの検出。Aは3F4を、BはSAF3 2を1次抗体として用いた。各Laneは1:ビオチン化タンパクサイズマーカー、2:組換えウシPrP、3:Cos7-PrP、4:T98G (2x10⁵ cells/well)、5:N2a (2x10⁵ cells/well)、6:血小板画分(血小板リッチ血漿10 μl相当/well) 7:CMK85-2 (2x10⁵ cells/well)、8:CMK85-L (2x10⁵ cells/well)、9:CMY20 (2x10⁵ cells/well)、10:CMS (2x10⁵ cells/well)、11:CTS (2x10⁵ cells/well)。

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策(牛海綿状脳症研究分野)研究事業)

「血液中でのプリオンタンパクの存在様式の解析と
血液製剤からのプリオン除去の研究」

分担研究報告書

実験動物を用いたプリオンタンパクの存在様式

および動態についての病理学的解析

分担研究者名 永田典代 国立感染症研究所・感染病理部

研究要旨

血液細胞によるプリオン伝播を実験動物を用いて病理学的に解析することを目的とする。特に、血液細胞とリンパ装置の濾胞樹状細胞（FDC）、正常プリオン(PrP^{C})および異常プリオン(PrP^{Sc})の相互関係について着目していく。今後、マウス、サルを用いたプリオン病発症実験を予定しているが、本年度は動物実験に先立って、これらの実験動物における PrP^{C} の局在について調べる事を目的として、免疫組織化学に使用する抗体の選択を試みた。マウス、ラット、カニクイザル由来のホルマリン固定パラフィン切片組織に有用な抗体を選択しリンパ節、脾と脳組織における抗原局在を確認した。また、カニクイザル脾組織における PrP^{C} の発現は B 細胞領域の濾胞中心で、FDC と関連することを示し、ヒトモデルになりうると考えられた。

A. 研究目的

Creutzfeld-Jakob 病（CJD）や変異型 CJD などのプリオン病は異常プリオン (PrP^{Sc}) が中枢神経系に蓄積することによって発症することが知られているが、その発症までの機序は未だ不明である。変異型 CJD では扁桃組織の濾胞樹状細胞（FDC）に PrP^{Sc} が蓄積することはすでに知られており、また、CJD の遺伝子改変マウスモデルを用いた研究によって、神経への移行の前に FDC における PrP^{Sc} の蓄積が先行することが明らかにされている。また、

B 細胞欠損マウスではリンパ濾胞が形成されないが、このマウスにおいては PrP^{Sc} の感染が成立しない。しかし FDC からどのように PrP^{Sc} が中枢神経系へ移行するかは不明である。

全血、血漿を含めた血液製剤によるプリオン関連疾患の発症はまだ報告されていないが、Creutzfeld-Jakob 病患者あるいは実験的感染マウスの白血球を動物の脳内に接種すると感染が成立することが知られている。このように、感染血液による伝播の可能性は否定できない。

本研究班では特に血液へのプリオンの移行を調べることを目的としており、血液細胞と FDC、正常プリオン (PrP^C) および PrP^{Sc} の相互関係について着目していく。今後、マウス、サルを用いたプリオン病発症実験を予定しているが、本年度は動物実験に先立って、これらの実験動物における PrP^C の局在について調べる事を目的として、免疫組織化学に使用する抗体の選択を行った。

B. 研究方法

1) 使用動物

健康 BALB/c マウス 4 週齢、健康 LEWIS ラット 4 週齢およびカニクイザル 6 才(病理番号 990009 : Verotoxin2 を静脈内に接種したが無症状で耐過し、組織学的にも病変が見られなかった個体)を用いた。

2) 組織切片作成方法

各動物の組織は過麻酔殺後、心臓からの採血を行ったのち、臓器を採取し 10%ホルマリン緩衝液で浸漬固定し、翌日細切し再固定した。さらに 2 日間追加固定し、常法どおりパラフィン包埋切片を作成した。なお、LEWIS ラットは採血後、開胸し左心室から 10%ホルマリン緩衝液を注入し全身の還流固定を実施しその後浸漬固定を行った。ラットの脳組織を含めた頭蓋は 2 日間の固定後、EDTA4Na 緩衝液で脱灰処理 (80%エタノールによる脱脂後、1 週間浸漬)を行った。

3) 免疫組織化学

ホルマリン固定パラフィン切片を

用いて sABC 法による PrP^C の検出、CD35 陽性細胞 (FDC)、CD20 陽性細胞 (B 細胞) の検出を行った。使用した抗体については Table1 に示した。

sABC法は、脱パラフィン後、0.25%トリプシン処理を 37°C 25 分間行い、0.3%過酸化水素水で内因性ペルオキシダーゼの除去を室温で 30 分間行った。燐酸緩衝液 (PBS) 洗浄後、ウサギ正常血清と反応後、一次抗体を適宜希釈し 4°Cで一晩反応した。PBS 洗浄後、二次抗体としてビオチン化抗ヤギあるいはマウス抗体ウサギ血清と室温で 30 分間反応し、洗浄後ストレプトアビジンペルオキシダーゼと室温で 30 分間反応した。洗浄後、ジアミノベンチジン(DAB)でシグナルの可視化を行い、ヘマトキシリンで核対比染色を行った。

C. 研究結果

1) PrP^C 抗原の検出

マウス、ラット、カニクイザルの脳組織切片を用い、3 種類の抗体を用いて PrP^C 抗原の検出を行った。その結果、C-20 および M-20 抗体が有用であり、すべての動物種の脳組織における PrP^C 抗原の検出が可能であった (Table 2)。3F4 抗体はラット、サル組織を用いて試行したが、抗原は検出できなかった。

また、トリプシン処理および非処理を比較した結果、非処理の方が陽性部位が多いが、同時に非特異的反応を疑わせる所見もあり、トリプシン処理を施行したほうが染色性は良好であ