

厚生労働科学研究費補助金

食品の安全性高度化推進研究事業

血液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 16 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 岡田 義昭

平成 17 (2005) 年 3 月

目次

I. 総括研究報告書

血液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

P 1-P 5

主任研究者 岡田 義昭

II. 分担研究報告

1. 血液製剤からのプリオン除去法、及び in vitro 感染系の
開発と感染効率の評価

P 6-P 13

岡田 義昭

2. 白血病由来細胞株を用いた in vitro TSE 感染系

P 14-P 19

水沢 左衛子

2. 異常プリオン発現培養細胞のプリオンタンパク存在様式についての
病理学的解析

P 20-P 22

永田 典代

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

P 23

IV. 研究成果の刊行物・別冊

p24-P33

厚生労働科学研究費補助金
(食品の安全性高度化推進研究事業)

総括研究報告書

血液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

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 BSE 由来の PrP^{sc} にウエスタンブロット法によって感染が確認された細胞株をさらに継代したところ 1 年以上の持続感染が確認できた。この細胞株の上清を希釈し、非感染細胞に感染させることによって感染価を測定したところ 10⁶/m l 以上の感染価を含むことが明らかとなった。さらに 20 nm のウイルス除去膜を用いて除去を試みたところ、感染価の減少は認められなかったが感染 4 週間後ではウエスタンブロットでのシグナルの減弱が認められた。これらのことから培養上清中には大小様々な PrP^{sc} が存在し、大きい PrP^{sc} は除去されるが 20 nm 未満の大きさの物は除去膜を通過するため除去できなかったと推定された。この持続細胞株における感染細胞の頻度は 20 倍対物レンズの一視野に数個程度であった。また、血球系細胞の中で、最も正常プリオンが多く存在する血小板に分化能を有する巨核球系の細胞株にも持続感染を成立させた。さらに、持続感染細胞株の培養上清をマウスリンパ球のサブセットに添加することによって、腹腔内に存在する細胞は異常プリオンに親和性が有ることが明らかとなった。

分担研究者

水沢 左衛子 国立感染症研究所
主任研究官

永田 典代 国立感染症研究所
主任研究官

A. 研究目的

日本において初めての変異型 C J D と診断された症例が報告され、一方では牛海綿状脳症 (BSE) と診断された牛は 17 頭になった。本研究では血液を介したプリオン病の感染を未然に防止するために、血液の中で PrP^{sc} がどの様な形で存在しているの

か、また、血球系の細胞に感染又は結合するのか、等これまで研究されることがない血液から見たプリオン病の解析をすることを目的としている。これまでの研究は神経学から見た研究が主に行われており、感染ハムスター-脳乳剤を使用した添加実験によって評価しているものが多かった。我々は血液中や血球系細胞に存在するプリオンが脳と同じ性状で存在するのか懐疑的であり、血液の安全性確保のためには血液中に存在している状態により近いモデルを作ることが必要であった。そこで、血液系や神経系

の細胞株に PrP^{sc} を感染させ、感染が成立した場合にはどの部位に感染性の異常プリオンが存在するのか明らかにする必要があった。そこで、昨年度に感染が成立した細胞株に加えてヒト白血病細胞株に感染させてさらに解析し、培養上清中に PrP^{sc} が存在する細胞株の選択、感染価の測定法の確立を実施した。さらに、PrP^{sc} が存在する培養上清をマウスのリンパ球のサブセットに添加することによって PrP^{sc} に親和性のある細胞群を明らかにした。また、感染価の測定が可能になったので、分画製剤のウイルス除去工程で実際に導入されているウイルス除去膜による除去効果についても解析した。

B. 研究方法と結果

(1) in vitro BSE 感染細胞の解析

昨年度の研究によって BSE を感染させたヒトグリオーマ由来の細胞株、肺ガン由来細胞株、網膜芽腫由来細胞株、及びマウス由来の N2 細胞をさらに継代し、脳乳剤の持ち込みが否定できるまで継代を続けた。感染後六ヶ月以上経過した細胞を集め、 2.5×10^6 の細胞をプロテナーゼ K (PK) 濃度を各 40、80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の条件で 37 度 30 分間処理を行い、ウエスタンブロット法にて PK 耐性の異常プリオンを検出した。ヒト脳腫瘍由来の細胞株は 10 ヶ月以上継代しても分子量 27-30Kd 付近に強いシグナルが検出され、BSE に持続感染していることが明らかとなった。週に 2 回の間隔で継代したこと

から最初の感染時に持ち込まれた脳乳剤を検出している可能性はない、と考えられた。しかし、脳乳剤に認められるような 20Kd と 25Kd 付近のバンドは確認できなかった。

(2) in vitro による感染価測定

1 で得られた感染細胞株の中で最も強く異常プリオンが検出されたヒトグリオーマ由来の細胞株の培養上清を集め、検体を希釈し、非感染細胞に感染させて感染価を求めた。感染、2、3、4、5、6 週後に細胞を回収し異常プリオンの感染の有無をウエスタンブロット法にて解析した。感染 2 週間より希釈倍率の少ない培養液を用いて感染させた細胞に陽性のバンドが確認された。4 週を過ぎると 10^{-5} においても PK 耐性のプリオンが検出された。これらから細胞培養液の感染価は $10^6/\text{ml}$ 以上あることが示された。

(3) ウイルス除去膜によるプリオン除去

感染細胞株の培養上清を集め、10000 G、10 分間の遠心にて細胞残屑を除去し、20 nm 及び 35 nm のポアサイズのウイルス除去膜 (プラノバ) を用いて検体を濾過した。濾液を段階希釈し非感染細胞に感染させた。感染 2、3、4、5、6 週後に細胞を回収し、異常プリオンの感染の有無をウエスタンブロット法にて解析した。20 nm のウイルス除去膜を用いて処理した細胞培養液は、感染 4 週間では希釈倍率の高い検体において異常プリオンは検出されなかった。また、希釈倍率の低い

検体の陽性シグナルも減少していた。しかし、感染 6 週後では希釈による差はなくなり、無処理の細胞培養液と比較しても差がなくなった

(4) マウスリンパ球における異常プリオン親和性サブセットの解析

マウス脾細胞を各抗体が付いた磁気ビーズを用いて各サブセットに精製した。また、マクロファージ、PEC (peritoneal exudative cell) も集めた。分離した細胞群を BSE 感染 N2 細胞由来の細胞培養液を 1 ml 添加し、2-3 日間培養した。培養後、細胞を破碎し、非感染細胞の N2 細胞に感染させた。異常プリオンの感染の有無はウエスタンブロット法にて解析した。感染 6 週目において PEC 由来の lysate のみに異常プリオンが検出された。このことから血球系細胞には異常プリオンに親和性が有る細胞群が存在することが示唆された。

(5) 白血病由来細胞株を用いた in vitro TSE 感染系

ヒト白血病由来細胞株 CMK85-2 と CMK85-L に BSE 感染脳乳剤を添加し、in vitro においてこれらヒト血球系細胞に感染が成立するか、検討した。感染後、週 2 回の割合で細胞を継代し、感染 15 日、35 日、141 日に細胞を集め、PK40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 又は 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ にて 37 度 30 分間処理後、ウエスタンブロット法にて異常プリオンの有無を検索した。35 日後に約 30 kD の異常プリオンのバンドが検出さ

れ、以後 141 日目まで同様の陽性バンドが検出された。このことから CMK85-2 と CMK85-L は異常プリオンに持続感染しているものと考えられた。

さらに、CMK85-L の細胞培養上清をヒトグリオーマ由来の細胞株に添加し、異常プリオンの伝達性を検討した。実験に用いた細胞株は正常プリオンの産生が多いため、非感染細胞にも弱い PK 耐性プリオンタンパクが検出されたが、CMK85-L の培養上清を添加した細胞において非感染細胞よりも強いシグナルが検出された。このことから CMK85-L の培養上清中には感染性の異常プリオンが産生されていると考えられた。

(6) 異常プリオン発現培養細胞のプリオンタンパク存在様式についての病理学的解析

BSE 由来ウシ異常プリオンに持続感染したヒトグリオーマ細胞株を用いて異常プリオンの局在を解析した。ラブテックチャンバースライドにて 2 日間培養後培養上清を捨て、4%パラフォルムアルデヒド固定を室温 30 分あるいは 4℃一晩行った。1% (w/v) NH_4Cl in PBS で中和後、0.1% Triton X-100 in PBS にて 5 分間浸漬し、正常プリオンを除去するために 3M guanidinium thiocyanate in PBS で 5 分間処理した。一次抗体として抗プリオン抗体の SAF32, SAF61, SAF70, PRI308, 3F4 モノクローナル抗体を用いた。抗マウス IgG ウサギ血清を二次抗体として引

き続きストレプトアビジンビオチン複合 (sABC) 法を行った(LSABキット、DAKO, Japan)。あるいは蛍光標識抗体 Alexa Fluor 546 goat anti-mouse IgG (H+L) (Molecular probes, Netherland) を二次抗体として用い蛍光免疫染色を行った。sABC 法による検出では、非特異反応が高かったが、蛍光免疫染色によって 3F4 モノクローナル抗体で異常プリオン抗原が細胞質に顆粒状に検出された。その検出頻度は 20 倍対物レンズの一視野に数個程度であった。

C. 考察

昨年度の研究から、スクレピー由来のマウスプリオンを感染させたマウス脾細胞に存在する PrP^{Sc} は、検出される異常プリオンの分子量等から脳と存在様式が異なる可能性が示唆された。そこで昨年度に感染が成立したと細胞株を継代し、さらに詳細に検討を加えた。明らかとなったのは、BSE の感染は一過性ではなく、持続感染することを複数の細胞株を用いて明らかにした。特殊な細胞株ではなく神経系由来又は類似した細胞株においても感染は成立した。また、ヒト血球系の細胞株においても、検討した 141 日間の持続感染を確認した。ウエスタンブロットでの解析では陽性のシグナルに差があることから、異常プリオンが多く検出される細胞株をさらに詳細に解析した。感染細胞の培養上清中に異常プリオンが存在するか、どうかは重要な問題である。

そこで、同じ細胞株の非感染細胞に希釈した細胞培養上清を感染させ、6 週間以上培養し、異常プリオンを検出した。その結果、培養液中には 10^6 /ml 以上の高い感染価があることが明らかとなった(感染細胞の頻度は 20 倍対物レンズの一視野に数個程度であった)。これによって、この細胞株を培養することで多量に異常プリオンが入手可能になった。また、ヒト血球系の細胞株においても培養上清中に非感染細胞に対する感染性を示唆する所見が得られた。感染細胞から産生され、培養上清中に存在することから血液に存在するプリオンに極めて類似しているものと推定された。そこで、実生産において導入されているウイルス除去膜の異常プリオン除去能力を検討した。完全には除去することは無理であったが、一過性に陽性シグナルの強さを減少させることが可能であったので、ウイルス除去膜によってウイルス様の大きさを有する異常プリオンは除去されるが、20 nm よりも小さいサイズ、又は可溶性(?) のものは通過した結果と考えられた。

また、細胞株の培養上清とマウスから精製したリンパ球を数日間混合培養し、異常プリオンと親和性のあるマウスリンパ球サブセットを求めたが、腹腔に存在する細胞群に親和性が認められた。一方、T細胞、B細胞、CD11b、CD11c 等では検出できなかった。これまでの報告等で、感染マウスの白血球分画に感染性

があると報告されていたが、詳細な検討はされていない。感染している細胞の他に、細胞に異常プリオンを付着させている細胞の存在も今回の実験から推定でき、白血球除去によるプリオン病予防効果を有効にするためにはヒト血液細胞においても解析する必要がある。

D. 結論

1. 異常プリオンが持続感染する細胞株を複数（ヒト由来白血球細胞株を含む）作成した。
2. 培養上清中に高い感染価を有する異常プリオンを産生する細胞株を樹立した。
3. ウイルス除去膜を用いた解析から、培養液中には様々な大きさの異常プリオンが存在し、一部は除去可能であるが完全には除去できない。
4. マウスの血液細胞を用いた検討から異常プリオンは PEC に親和性があることを見出した。
5. 持続感染している細胞株における感染細胞の頻度を蛍光抗体法を用いて評価したところ 20 倍対物レンズの一視野に数個程度であった。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 岡田義昭、水沢左衛子、種市麻衣子、他：血液製剤の安全性のための核酸増幅

検査（NAT）、臨床検査、第 48 巻、1125-1130、2004 年。

- 2) 岡田義昭：血液と血液製剤の安全性、サークルズ、6 巻、4-7、2004

2. 学会発表

- 1) Y.Okada: B19 infectivity assay with an epithelial cell line, International Scientific Working group on the Standardization of Genome Amplification Techniques for the Safety testing of Blood, tissues and organs with Regard to Blood Borne Pathogens. Paris May 2004

- 2) 岡田義昭、梅森清子、水沢左衛子、山口一成：上皮性細胞株を用いたパルボウイルス B19 の感染系の確立、第 52 回日本ウイルス学会、2004 年

G. 知的所有権の取得状況

なし

厚生労働科学研究費補助金

分担研究報告書

血液製剤からのプリオン除去法、及び *in vitro* 感染系の開発と感染効率の評価

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 昨年度の研究によってマウスのリンパ球の特定なサブセットに PrP^{sc} が蓄積する可能性を明らかにしたので、今年度はリンパ球をサブセットに分離後、PrP^{sc} に持続感染している N2 細胞株の培養上清を添加し、数日間培養後各サブセットに含まれる PrP^{sc} を *in vitro* で測定したところ、腹腔に存在するリンパ球だけから PrP^{sc} が検出された。このことから特定のリンパ球に感染、又は結合することが示された。また、BSE 由来の PrP^{sc} にウエスタン法によって感染が確認された細胞株をさらに継代したところ 1 年以上の持続感染が確認できた。この細胞株の上清を希釈し、非感染細胞に感染させることによって感染価を測定したところ 10⁶/m l 以上の感染価を含むことが明らかとなった。さらに 20 nm のウイルス除去膜を用いて除去を試みたところ、感染価の減少は認められなかったが感染 4 週間後ではウエスタンプロットでのシグナルの減弱が認められた。これらのことから培養上清中には大小様々な PrP^{sc} が存在し、大きい PrP^{sc} は除去されるが 20 nm 未満の大きさの物は除去膜を通過するため除去できなかったと推定された。

A. 研究目的

日本において初めての変異型 CJD と診断された症例が報告され、一方では牛海綿状脳症 (BSE) と診断された牛は 17 頭になった。本研究では血液を介したプリオン病の感染を未然に防止するために、血液中 PrP^{sc} がどのような形で存在しているのか、また、血球系の細胞に感染又は結合するのか、等これまで研究されたことがない血液から見たプリオン病の解析をすることを目的としている。これまでの研究は神経学から見た研究が主に行われており、感染

ハムスター脳乳剤を使用した添加実験によって評価しているものが多い。我々は血液中や血球系細胞に存在するプリオンが脳と同じ性状で存在するのか懐疑的であり、解析のためには PrP^{sc} が培養上清中に存在している系を確立することが必要であった。昨年度に感染が成立した細胞株をさらに解析し、培養上清中に PrP^{sc} が存在する細胞株の選択、感染価の測定法の確立を実施した。さらに、PrP^{sc} が存在する培養上清をマウスのリンパ球のサブセットに添加することによって PrP^{sc} に親和性のある細胞群

を明らかにした。また、感染価の測定が可能になったので、分画製剤のウイルス除去工程で実際に導入されているウイルス除去膜による除去効果についても解析した。

B. 研究方法

(1) in vitro BSE 感染細胞の解析

昨年度の研究によって BSE を感染させたヒトグリオーマ由来の細胞株、肺ガン由来細胞株、網膜芽腫由来細胞株、及びマウス由来の N2 細胞をさらに継代し、脳乳剤の持ち込みが否定できるまで継代を続けた。感染後六ヶ月以上経過した細胞を集め、 2.5×10^6 の細胞をプロテネース K (PK) 濃度を各 40、 $80 \mu\text{g}/\text{ml}$ の条件で 37 度 30 分間処理を行った。マウス単クローン抗体由来のプリオンタンパクを認識する抗体である 3F4、SAF70、SAF84 を用いてウエスタンブロット法にて PK 耐性のプリオンタンパクを検出した。

(2) in vitro による感染価測定

1 で得られた感染細胞株の中で最も強く異常プリオンが検出されたヒトグリオーマ由来の細胞株の培養上清を集め、10000 G、10 分間の遠心にて細胞残屑を除去し、さらに $0.45 \mu\text{m}$ のフィルターで濾過したものを検体とした。検体を 10^{-1} から 10^{-5} 希釈し、非感染細胞に各 $100 \mu\text{l}$ ずつ添加した。細胞と異常プリオンとの接触を亢進させるためにポリブレンを最終濃度 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ になるように添加した。感染 1 日後に培養上清を吸引し、新しい培養液と交換した。感染、2、3、4、5、6 週後

に細胞を回収し異常プリオンの感染の有無をウエスタンブロット法にて解析した。なお、継代によるコンタミネーションを防止するために、全てのチップは綿栓付きのディスポのものを使用し、ピペット類は 1 度培養液を吸った後には戻さないように注意し、感染細胞のウエル毎に交換した。

(3) ウイルス除去膜によるプリオン除去
感染細胞株の培養上清を集め、10000 G、10 分間の遠心にて細胞残屑を除去し、 $0.45 \mu\text{m}$ のフィルターで濾過したものを検体とした。20 nm 及び 35 nm のポアサイズのウイルス除去膜 (プラノバ) を用いて検体を濾過した。非特異的な吸着を避けるためにプリオンを含む検体を濾過する前に培養液を濾過した。濾液を 1 から 10^{-5} まで 10 倍づつの段階希釈を行い、各希釈 $100 \mu\text{l}$ を非感染細胞に感染させた。細胞と異常プリオンとの接触を亢進させるためにポリブレンを最終濃度 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ になるように添加した。感染 1 日後に培養上清を吸引し、新しい培養液と交換した。感染、2、3、4、5、6 週後に細胞を回収し、異常プリオンの感染の有無をウエスタンブロット法にて解析した。

(4) マウスリンパ球における異常プリオン親和性サブセットの解析

マウス脾細胞を抗 Fc 抗体で処理後 Thy1、CD19、CD11b、CD11c の各抗体が付いた磁気ビーズを添加し、MACSMidi にて Thy1 陽性細胞、CD19

陽性細胞、CD11b 陽性細胞、CD11c 陽性細胞を各々精製した。また、プラスチックディッシュに付着した細胞をマクロファージ、腹腔内洗浄液から回収した細胞を PEC (peritoneal exudative cell) として以下の実験に用いた。分離した細胞群を各々 1×10^6 ずつ 24 穴のプレートに播き、(1) で調整した BSE 感染 N2 細胞由来の細胞培養液を 1ml 添加し、2-3 日間培養した。培養後、細胞を回収し、5 回細胞を洗浄することで培養液の持ち込みを極力減らした。凍結融解を 3 回繰り返すことで細胞を破壊し、非感染細胞の N2 細胞にポリブレン存在下に添加、培養した。感染 1 日後に培養上清を吸引し、新しい培養液と交換した。感染、2、3、4、5、6 週後に細胞を回収し、異常プリオンの感染の有無をウエスタンブロット法にて解析した。マウス由来の細胞であるため、変性剤存在下で $40 \mu\text{g}/\text{ml}$ の PK にて 30 分処理後、残存する異常プリオンタンパクをウエスタンブロット法にて検出した。検出にはマウス単クローン抗体の SAF70、SAF84 を用いた。

C. 研究結果

(1) in vitro BSE 感染細胞の解析

昨年 BSE 由来脳乳剤を用いて感染させたヒト脳腫瘍由来の細胞株は 10 ヶ月以上継代しても分子量 27-30Kd 付近に強いシグナルが検出され、BSE に持続感染していることが明らかとなった。週に 2 回の間隔で継代したことから最初の感

染時に持ち込まれた脳乳剤を検出している可能性はない、と考えられた。しかし、脳乳剤に認められるような 20Kd と 25Kd 付近のバンドは確認できなかった。

(2) in vitro による感染価測定

感染 2 週後より希釈倍率の少ない培養液を用いて感染させた細胞に陽性のバンドが確認された。4 週を過ぎると 10^{-5} においても PK 耐性のプリオンが検出された (図 1)。これらから感染価は $10^6/\text{ml}$ 以上あることが示された。

(3) ウイルス除去膜によるプリオン除去

20nm のウイルス除去膜を用いて処理した細胞培養液は、感染 4 週後では希釈倍率の高い検体において異常プリオンは検出されなかった。また、希釈倍率の低い検体の陽性シグナルは弱かった。しかし、感染 6 週後では希釈による差はなくなった。さらに、無処理の細胞培養液と比較しても 6 週後ではウエスタンブロットのシグナルに差がなくなった (図 2)。

(4) マウスリンパ球における異常プリオン親和性サブセットの解析

異常プリオンと培養したリンパ球の cell lysate をもって感染させた N2 細胞は感染 6 週目において PEC 由来の lysate のみに異常プリオンが検出された (図 3)。

D. 考察

昨年の研究によって、脳乳剤を使用した場合、弱い遠心力によってペレットに PrP^{sc} が沈降するため血漿分画製剤の

PrP^{sc} 除去のバリデーションに脳乳剤を使用するためには何らかの可溶性を高める工夫の必要があった。その一方で、血液中や血球系に存在する PrP^{sc} は、検出される異常プリオンの分子量等から脳と存在様式が異なる可能性も示唆された。そこで昨年度に感染が成立したと考えた細胞株を継代し、さらに詳細に検討を加えた。明らかとなったのは、BSE の感染は一過性ではなく、持続感染することを複数の細胞株を用いて明らかにした。特殊な細胞株ではなく神経系由来又は類似した細胞株においても感染は成立した。ウエスタンブロットでの解析では陽性のシグナルに差があることから、異常プリオンが多く検出される細胞株をさらに詳細に解析した。感染細胞の培養上清中に異常プリオンが存在するか、どうかは重要な問題である。そこで、同じ細胞株の非感染細胞に希釈した細胞培養上清を感染させ、6 週間以上培養し、異常プリオンを検出した。その結果、培養液中には 10⁶/ml 以上の高い感染価があることが明らかとなった。これによって、この細胞株を培養することで多量に異常プリオンが入手可能になった。感染細胞から分泌されるのか、アポトーシス等によって細胞が破壊されて培養液中に放出されるのか、現段階では不明である。何れにしても脳乳剤よりも血液により近い状態で存在しているものと考えられた。そこで、実生産において導入されているウイルス除去

膜の異常プリオン除去能力を検討した。20 nm の大きさをもつウイルス除去膜においては、感染 4 週間後では無処理に比べて陽性のシグナルは明らかに減弱していたが、6 週間後にはシグナルの差はなくなった。これらのことからウイルス除去膜によってウイルス様の大きさを有する異常プリオンは除去されるが、20 nm よりも小さいサイズ、又は可溶性 (?) のものは通過した結果と考えられた。

また、細胞株の培養上清とマウスから精製したリンパ球を数日間混合培養し、リンパ球の lysate を感受性のある細胞に添加、継代することによって異常プリオンと親和性のあるマウスリンパ球サブセットを求めたが、腹腔に存在する細胞群に親和性が認められた。一方、T細胞、B細胞、CD11b、CD11c 等では検出できなかった。これまでの報告等で、感染マウスの白血球分画に感染性があると報告されていたが、詳細な検討はされていない。感染している細胞の他に、細胞に異常プリオンを付着させている細胞の存在も今回の実験から推定でき、白血球除去によるプリオン病予防効果を有効にするためにはヒト血液細胞においても解析する必要がある。

E. 結論

1. 異常プリオンが持続感染する細胞株を複数作成した。
2. 培養上清中に高い感染価を有する異常プリオンを産生する細胞株を樹立

した。

3. ウイルス除去膜を用いた解析から、培養液中には様々な大きさの異常プリオンが存在し、一部は除去可能であるが完全には除去できない。
4. マウスの血液細胞を用いた検討から PEC に親和性があることを見出した。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 岡田義昭、水沢左衛子、種市麻衣子、他：血液製剤の安全性のための核酸増幅検査（NAT）、臨床検査、第 48 巻、1125-1130、2004 年。
- 2) 岡田義昭：血液と血液製剤の安全性、サークルズ、6 巻、4-7、2004

2. 学会発表

1) Y.Okada: B19 infectivity assay with an epithelial cell line, International Scientific Working group on the Standardization of Genome Amplification Techniques for the Safety testing of Blood, tissues and organs with Regard to Blood Borne Pathogens. Paris May 2004

2) 岡田義昭、梅森清子、水沢左衛子、山口一成：上皮性細胞株を用いたパルボウイルス B19 の感染系の確立、第 52 回日本ウイルス学会、2004 年

H. 知的所有権の取得状況

なし

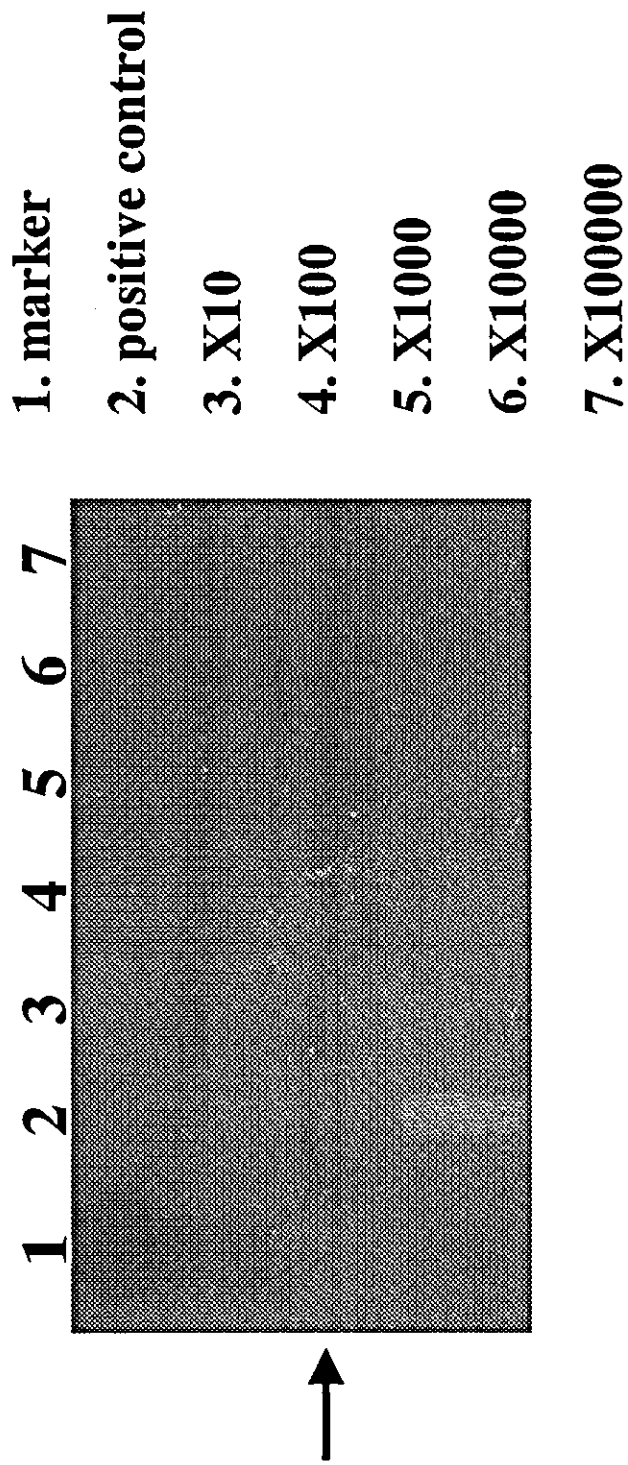


図-1. 感染細胞の培養上清中に存在する感染性プリオン
 持続感染細胞の培養上清を希釈し、100マイクロを非感
 染細胞に感染させウエスタンブロット法にて異常プリオ
 ンを検出した。

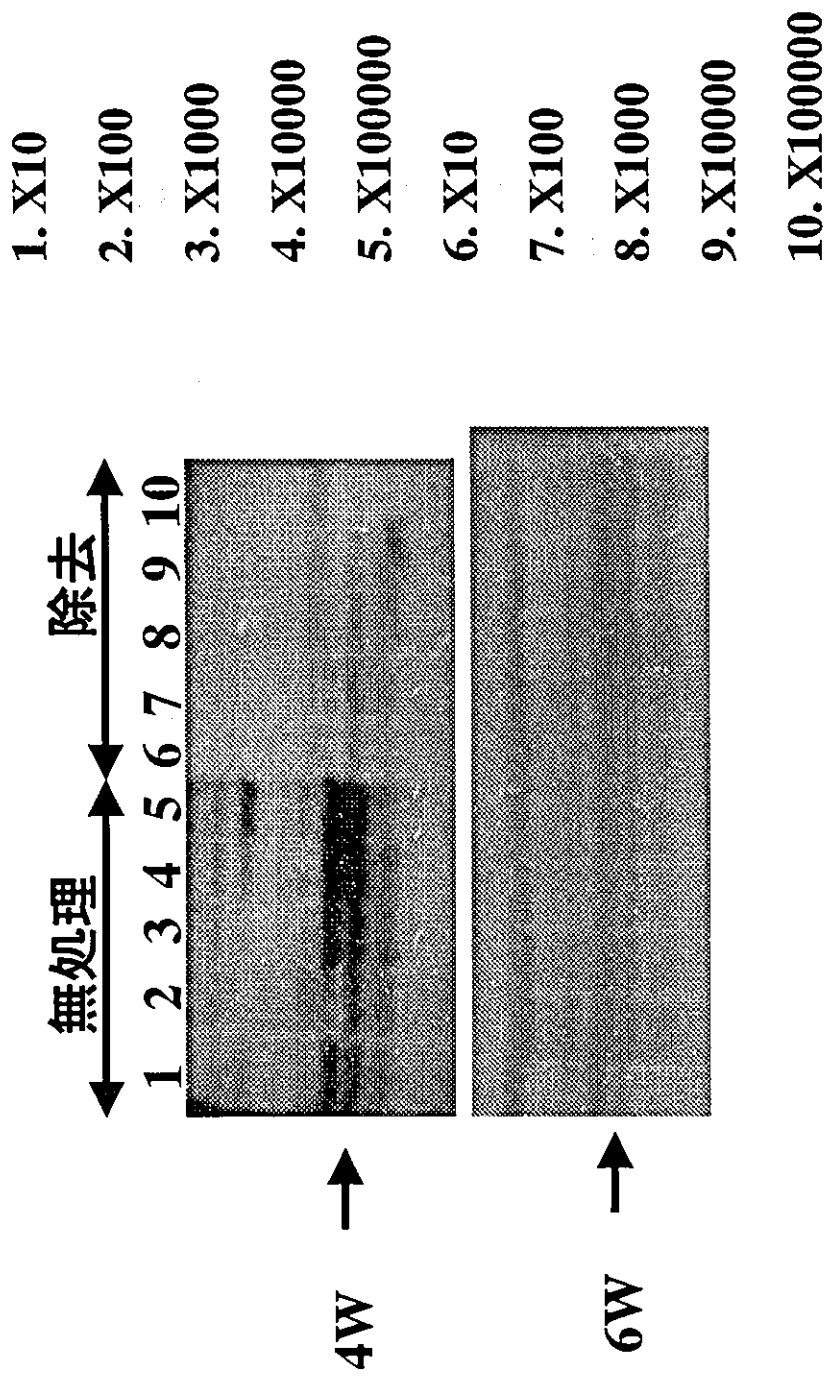


図2 ウイルス除去膜による異常プリオン除去

感染細胞株の培養上清を20nmのポアサイズのウイルス除去膜を用いて濾過し、希釈して非感染細胞に感染させ4週後と6週後にウエスタンブロット法にて異常プリオンの除去を評価した。

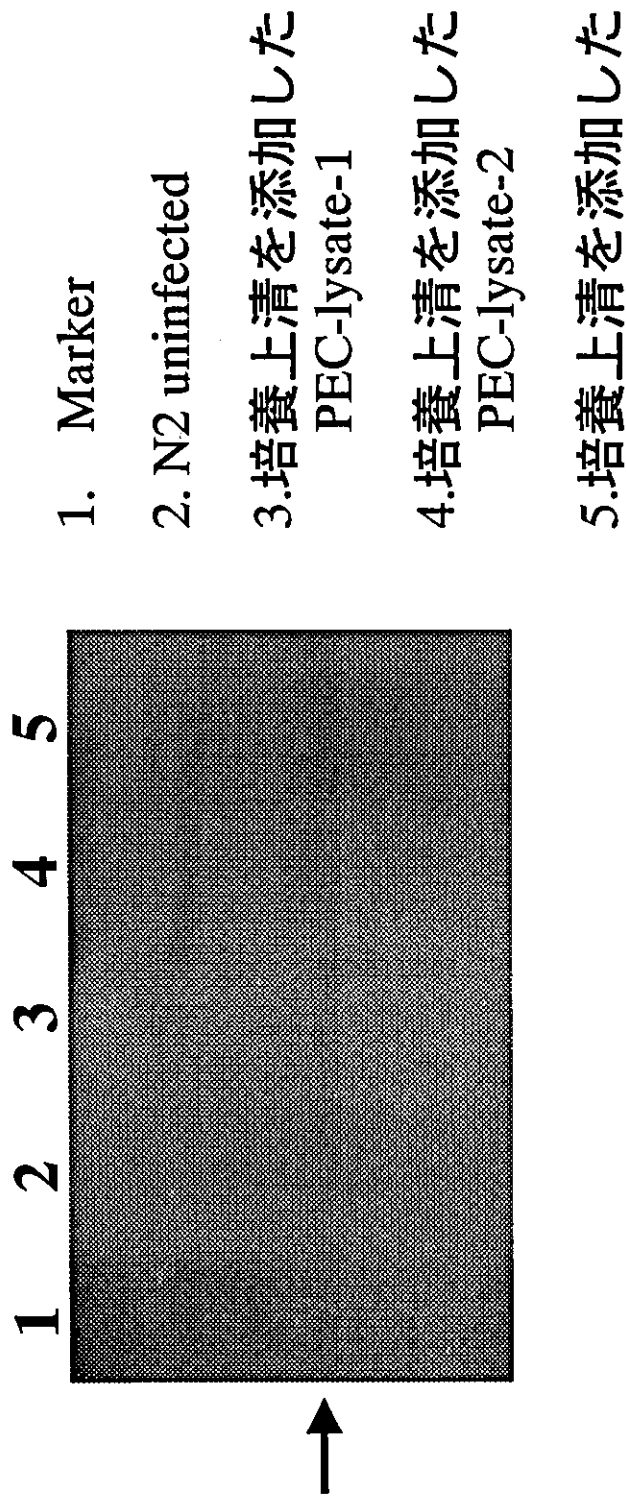


図3. PECによる異常プリオンの伝達性

持続感染細胞の培養上清とPECとを培養し、2-3日後に細胞を破碎して非感染のN2細胞に感染させ、ウエスタンブロット法で異常プリオンの伝達性を検討した。

厚生労働科学研究費補助金(食品安全高度化推進研究事業)
分担研究報告書

白血病由来細胞株を用いた *in vitro* TSE 感染系

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

輸血を介しての variant CJD 感染が疑われる症例が最近報告された。血液製剤のリスク評価法の確立と病原性プリオン (PrP^{Sc}) の除去・不活化法の開発が求められている。分画製剤の製造工程での PrP^{Sc} の挙動を感染動物の脳乳剤を用いて検討した例はあるが、脳乳剤が血液中の PrP^{Sc} の性状を反映しているとは限らない。本研究では PrP^{Sc} の除去・不活化法の評価系で使用するモデル PrP^{Sc} の作成を目的として、血球系細胞株を用いた *in vitro* TSE 感染系の確立を試みた。①白血病由来細胞株に BSE 感染牛の脳乳剤を添加して培養するとウエスタンブロット法で Proteinase K 耐性の PrP (PrP^{Res}) のバンドが検出された。3 か月以上継代した培養細胞からも PrP^{Res} が検出され、血球系細胞株を用いた *in vitro* 系での BSE 持続感染が示唆された。②感染 15 日と 46 日の培養上清を glioblastoma 由来細胞株 T98G に添加して培養し、伝達性を検討した。培養上清を添加しない T98G からは PrP^{Res} の薄いバンドが検出されたが、培養上清を添加すると PrP^{Res} のバンドが濃くなり、新たに分子量の大きな PrP^{Res} が検出された。この分子量の大きな PrP^{Res} の出現が TSE の伝達を意味するかについては検討中である。

A. 研究目的

ウシ海綿状脳症 (BSE) の感染による variant CJD (vCJD) の症例はイギリスで 148 例にのぼる (2004 年 12 月現在)。動物を用いた実験で輸血による BSE 感染が示唆されていたが、2004 年に輸血を介しての vCJD 感染が疑われる症例が報告された。vCJD 潜伏期のドナーの血液から製造された輸血用血液や分画製剤による 2 次感染のリスクのを減らすことが現実的な課題となりつつある。そのためには現在製造されている血液製剤のリスク評価法の確立と病原性プリオン (PrP^{Sc}) の除去・不活化法の開発が不可欠である。分画製剤の製造工程での PrP^{Sc} の挙動を TSE 感染動物の脳乳剤を用いて検討した例はあるが、脳乳剤が血液中の PrP^{Sc} の性状を反映しているとは限らない。ヒト末梢血において血小板に正常プリオンタンパク (PrP^C) が存在することが知られているが、血小板を産生する巨核球の特徴を有するヒト白血病由来細胞株 CMK85-2 と

CMK85-L が PrP^C を発現していることを平成 15 年度に報告した。本研究では PrP^{Sc} の除去・不活化法の評価系に使用するモデル PrP^{Sc} の作成を目的としてとし、ヒト末梢血により近い系として血球系細胞株 CMK85-2 と CMK85-L を用いて、*in vitro* BSE 感染系の確立を試みた。

B. 研究方法

培養細胞株：ヒト白血病由来細胞株 CMK85-2 と CMK85-L は国立感染症研究所 布施明室長より分与された。CMK85-2 と CMK85-L はサブクローン同士である。ヒト glioblastoma 由来細胞株 T98G (JCRB9041) は JCRB 細胞バンクから分譲された。

BSE 感染牛脳乳剤：国産牛由来。当研究所、感染病理部より供用された。

in vitro TSE 感染：CMK85-2 と CMK85-L を 24 穴プレートにそれぞれ 10⁵ cells/well まき、Polybrene を 1 μg/ml 加え、BSE 脳乳剤 5 μl を添加。以後、Polybrene を含まない RPMI 培地で週 2 回 3~5 倍に希釈して

継代培養した。あるいは Polybrene を加えないで同様に脳乳剤を添加、継代培養した。サンプリングは培養 2ml (約 10^6 個) を 7000 rpm, 2min 遠心、沈殿した細胞を PBS で洗浄して -80 度で凍結保存、上清は 13000 rpm, 5min 遠心してその上清を同様に保存した。

伝達実験： T98G 細胞 5×10^4 個を 24 穴プレートで 2 日間培養後、培地を感染細胞の培養上清 0.5ml と DMEM 培地 0.5ml の混合液に交換した。2 日後に PBS で 3 回洗浄、トリプシン処理して継代し、以後週 2 回ずつ継代した。感染細胞の培養上清はミリポアフィルター (0.45 μ m) でろ過して用いた。

Proteinase K(PK)処理：凍結した細胞約 10^6 個を detergent buffer 250 μ l に溶かし、proteinase K (1mg/ml) 10 または 20 μ l 添加、37 $^{\circ}$ C で 30 分間処理、0.1M Pefablock 10 μ l 添加後、DNase 10mg/ml 2 μ l を加えて室温で 5 分間処理、ブタノール：メタノール (5 : 1) 250 μ l を加えて室温で 15000rpm, 10min 遠心、沈殿を乾燥させて sample buffer に溶解、100 $^{\circ}$ C 5min 加熱してウェスタンブロットティングの試料とした。

ウェスタンブロットティング： SDS-12.5%、又は 5-20% 濃度勾配ポリアクリルアミドゲル (パジェル NPU-12.5L、NPG-520L、アトー社) を用いて 100V、2 時間の電気泳動によって分離後、polyvinylidene difluoride 膜 (Immobilon $^{\circ}$, Millipore 社) に転写、ブロックエース (大日本製薬) で一晚ブロッキングを行った。PrP^{Sc} の検出には抗プリオン・マウスモノクローナル抗体 SAF70 と SAF84 の混合液または 3F4 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、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)、ECL ウェスタンブロットティング検出システム (アマシャム) を用いた化学発光を ECL Hypermax film (アマシャム) で検出した。

C. 研究結果

1) ヒト白血病由来細胞株 CMK85-L を用いた BSE 感染系。BSE 感染牛脳乳剤を添加 141 日後の CMK85-L 培養細胞を、PK の濃度を変えて処理した。非感染対照として脳乳剤を添加しないで平行して培養した細胞をもちいた。PK 40 μ g/ml あるいは 80 μ g/ml

で処理すると脳乳剤を添加した細胞には約 30 kD の PrP^{Pres} の生成が認められたが、非感染対照では PrP^{Pres} はみとめられなかった。

(図 1)。感染後経時的に観察した結果、15 日目には 31 kD の PrP^{Pres} が検出されたが、35 日目には 30 kD の PrP^{Pres} のみとなり、141 日目まで検出された。

BSE 感染時に Polybrene を添加しなくても 30 kD の PrP^{Pres} 生成には影響なかった。また、PrP^{Pres} の生成はもう 1 つのサブクローン、CMK85-2 でも認められた。

2) CMK85-L に生じた PrP^{Pres} の伝達性。PrP^C の高発現細胞株であるヒト glioblastoma 由来細胞株 T98G を用いて CMK85-L で生成した PrP^{Pres} の伝達性を検討した。脳乳剤添加 15 日と 46 日後の CMK85-L 細胞培養の上清を T98G に添加後、毎週 2 回継代し、図 3 に示す日に細胞を集めて PK 80 μ g/ml で処理した。非感染対照に約 30 kD の薄いバンドが認められたが、感染細胞の上清を添加すると明らかに増加した。また、感染細胞の上清を添加した場合のみ特異的に分子量の大きい PrP^{Pres} が観察された。分子量の大きい PrP^{Pres} は感染 46 日目の上清を添加した 4 日目以降のすべてと、感染 15 日目の上清を添加した 26 日目で検出された。非感染対照では検出されなかった。3F4 を用いて検出すると全体のシグナルは弱い、傾向は同じであった。

D. 考察と結論

1) 白血病由来細胞株 CMK85-L に BSE 感染牛の脳乳剤を添加して培養するとウェスタンブロットティング法で約 30 kD の PrP^{Pres} が検出された。3 か月以上継代後も PrP^{Pres} の生成が認められ、*in vitro* BSE 持続感染が示唆された。今まで、神経系細胞株を用いたプリオン感染系は報告されているが、血球系細胞を用いた持続感染系の報告はほとんどない。ここに報告した BSE 持続感染系は血球系細胞株である CMK85-L を用いているので、末梢血中のプリオンの性状をより反映していると考えられる。図 1 で感染 15 日目に 31 kD の PrP^{Pres} が検出されることを示したが、これは、残存する脳乳剤の BSE プリオンに由来すると思われる。

2) BSE 感染 CMK85-L 細胞の培養上清を

glioblastoma 由来細胞株 T98G の培養に添加すると、約 30 kD の PrP^{res} が明らかに増加し、分子量の大きい PrP^{res} が特異的に検出された。Kikuchi らは contact inhibition がなかったまま 長期間培養した T98G で 3F4 とは反応しない PrP^{res} が生成されることを報告しているが、本実験で検出した PrP^{res} はいずれも 3F4 で検出される点で Kikuchi らが報告した PrP^{res} とは性状が異なっている。伝達性のアッセイに用いる細胞の培養条件や異なる細胞株を用いて、分子量の大きい PrP^{res} が TSE の伝達性を反映しているのかさらに検討中である。

3) 次に、PrP^{Sc} の細胞への伝播についてだが、STI1 は co-chaperonin protein のひとつとして細胞質に局在するが、一部は細胞表面に分布して PrP^C に結合することが知られ

ている。抗 STI1 抗体を用いれば STI1 が PrP^{Sc} の伝播にどのように関与しているか研究することが可能になるので、本研究では抗 STI1 抗体の作製を計画した。現在、大腸菌で組み換え STI1 の大量発現に成功したので、これを抗原として抗体を作製する予定である。

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

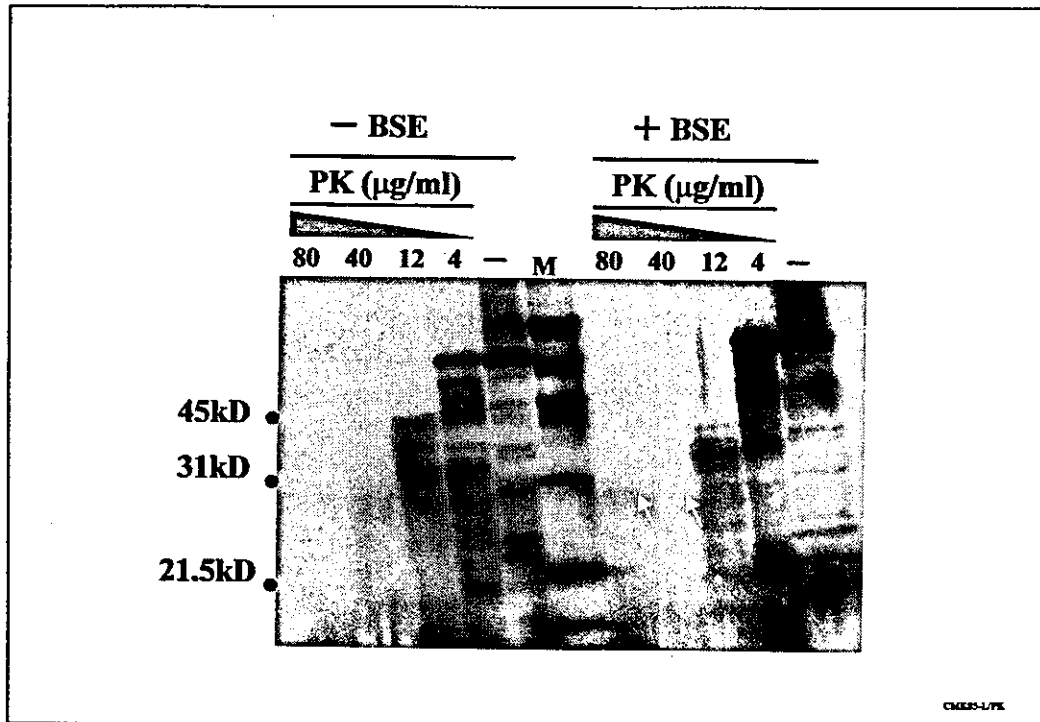


図1. BSE感染牛脳乳剤を添加したヒト白血病由来細胞株CMK85-LからのPrP^{res}の検出。脳乳剤添加141日後の細胞をPK濃度を変えて処理した。SAF70とSAF84を一次抗体に用いて検出した。脳乳剤を添加しない細胞も平行して培養した。PrP^{res}の位置を矢印で示す。M;ビオチン標識サイズマーカー。

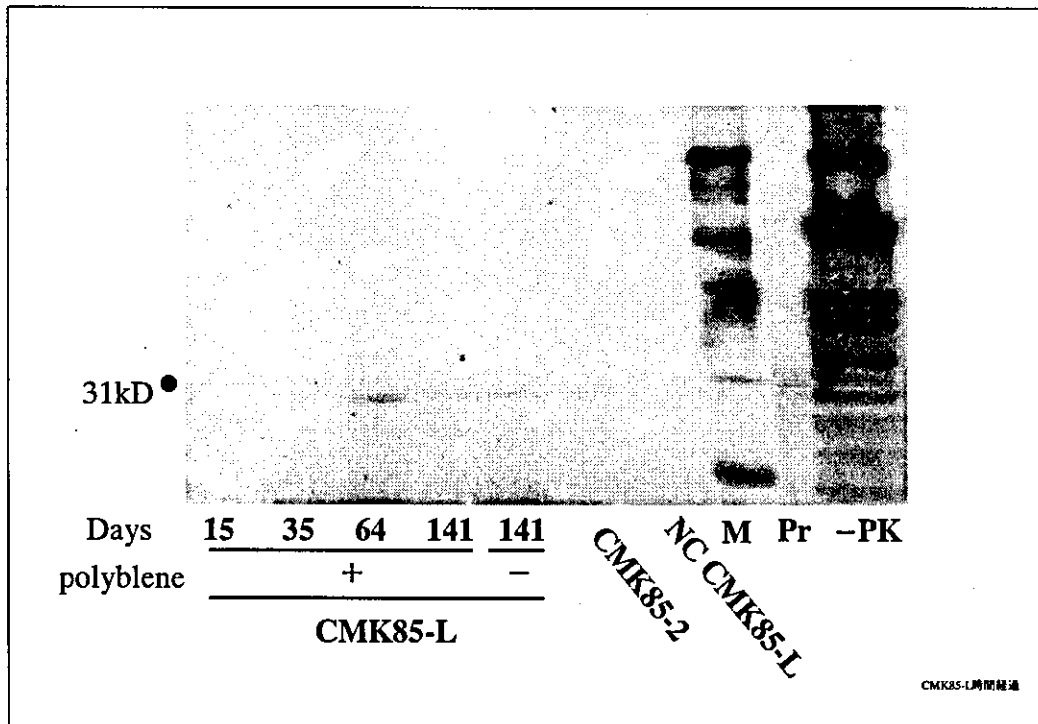


図2. BSE感染牛脳乳剤を添加したヒト白血病由来細胞株CMK85-LにおけるPrP^{res}の追った検出。polybrene 1 μ g/ml存在下で脳乳剤添加後毎週2回継代し、図示した日に細胞 10^6 個を集め、PK40 μ g/mlで処理し、SAF70とSAF84を一次抗体に用いて検出した。日数の表示がない列はすべて141日目の試料。CMK85-2; BSE感染牛脳乳剤を添加したCMK85-2。NC CMK85-L; 脳乳剤を添加しないCMK85-L。-PK; BSE感染牛脳乳剤を添加したCMK85-LのPK無処理 (PK処理試料の1/50相当の試料を使用) M; ビオチン標識サイズマーカー。Pr; COS-7で発現させた組み換え型ヒトプリオンタンパク。