

200501089A

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

輸血用血液の安全性向上のための異常プリオン
検出系の開発

平成 17 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 岡田 義昭

平成 18 (2006) 年 3 月

目次

I. 総括研究報告書

- 輸血用血液の安全性向上のための異常プリオン検出系の開発 P1-P5
主任研究者 岡田 義昭

II. 分担研究報告

1. 異常プリオンの in vitro 感染系の開発と高感度検出系の開発 P6-P12
岡田 義昭

2. 白血病由来細胞株を用いた in vitro TSE 感染系 P13-P16
水沢 左衛子

3. 血液中でのプリオンタンパクの存在様式の解析 P17-P20
長谷川 秀樹

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 P21

総括研究報告書

輸血用血液の安全性向上のための異常プリオン検出系の開発

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 英国において輸血を介したプリオン病の感染例が報告され、白血球除去による予防策がヨーロッパ等で導入されているが、より安全性の向上のためには、高感度のスクリーニング法やプリオン除去法の開発が必要である。我々は BSE が持続感染したヒト細胞株を樹立することに成功し、その培養上清を用いてヒトの神経系や血球系の細胞株に感染が成立することを明らかにした。また、in vivo より迅速な in vitro 感染価測定系も確立した。最近、PMCA(protein misfolding cyclic amplification)法によってハムスターやヒツジの異常プリオンが増幅できることが報告され、我々はヒトプリオンも増幅が可能なのか、について検討を加えた。脳乳剤の代わりにヒトプリオンを高発現している細胞株を基質に用いることによってヒトの異常プリオンの増幅が可能になることを明らかにした。次に、in vitro 感染系から感染価の明らかな培養上清を高感受性の細胞に感染させ、5 週間後に PMCA 法によって異常プリオンを増幅したところ通常の方法では検出できないものが検出可能になった。さらに感染性プリオンを含む培養上清を用いて PMCA 法を 2 コース行うことによって、培養上清からヒト異常プリオンを直接、増幅・検出することに成功した。今後、増幅に用いる基質や反応条件等を検討し最適な条件を決める必要があるが、ヒト異常プリオンが培養を経ないで、直接増幅できたことによって PMCA 法はヒト血液からのスクリーニング法の開発や除去法の迅速な評価に応用できると考えられた。

分担研究者

長谷川 秀樹 国立感染症研究所
室長

水沢 左衛子 国立感染症研究所
主任研究官

A.研究目的

日本において英国滞在歴を有する男性

が変異型 C J D と診断されたため、輸血を介した変異型 C J D の感染を防止するためにヨーロッパに滞在歴を有する供血者からの採血を止めている。血液の供給を考えた場合、プリオン病に対するスクリーニング法の開発や除去法が開発が急務になっている。これまでの動物を用いた感染実験によ

って血液中に存在する異常プリオンの量は非常に少ないことが明らかにされている。ヒトを考えた場合に発症する前の供血者が問題となるので、より少量の異常プリオンを検出する能力が必要になる。最近、タンパク質を核酸で実施されているPCR法と同様に増幅させる方法として

PMCA(protein misfolding cyclic amplification)法が開発され、ハムスターの血液中の異常プリオンが検出できたとの報告がされた。我々はこの方法をヒト異常プリオン検出に応用し、高感度の検出法の開発を目的とした。また、血球系の細胞が感染した場合のモデルとして白血病細胞株や巨核球細胞株の感染系を作り、exosomeとプリオンタンパクの存在様式について解析した。

B.研究方法と結果

(1) In vitro 感染系による培養上清の感染価測定

10 倍の段階希釈した検体を高感受性細胞株に感染させ、12-14 週間継代後、感染細胞からプロテナーゼK (PK) 耐性のプリオンを抽出し、マウス抗プリオン抗体の 3F4 又は SAF70 を用い、化学発光にて異常プリオンの有無を検討した。上清を感染させた細胞にのみに抗プリオン抗体と反応する分子量約 30-35Kd のバンドが検出された。バンドが検出できた最大希釈倍数から感染価を測定することが可能になった。

(2) BSE 感染細胞からの PMCA 法による異常プリオンの増幅・検出

感染性異常プリオンが存在していることが明らかな培養上清を 10 倍ずつ段階希釈し、高感受性のヒト由来細胞に添加し、5 週間継代培養した。感染細胞 2.5×10^6 に $250 \mu\text{l}$ の PMCA-buffer を加え、超音波蛋白質自動活性化装置 (ELEKON 社) を用いて異常プリオンを増幅した。計 40 サイクル (約 40 時間) の増幅を行うことによって通常の検出法では検出できなかった異常プリオンのバンドの検出が可能になった。

(3) 培養上清からの PCMA 法による異常プリオンの増幅・検出

1 で感染に用いたものと同じ培養上清を希釈し、ヒトグリオーマ由来の細胞株 (非感染) 2.5×10^6 に $250 \mu\text{l}$ の PMCA-buffer を加え、超音波蛋白質自動活性化装置 (ELEKON 社) を用いて異常プリオンを増幅した。40 サイクルの増幅を行った後、検出感度を上げるために、増幅検体 $50 \mu\text{l}$ を新しい PMCA-buffer に溶解したヒトグリオーマ由来の非感染細胞に添加し、さらに 40 サイクルの増幅を行った。培養液を 10^{-7} まで希釈した検体まで異常プリオンの検出が可能であった。また、培養液 (異常プリオンが入っていない) を同様に増幅しても異常プリオンは検出できなかった。

(4) 白血病由来細胞株を用いた in vitro TSE 感染系

CMK85-L、TPH-1、K562 の細胞株に BSE が持続感染しているヒト細胞株の培養上清を添加し、感染の有無を検索した。3 つの細胞株とも異常プリオンが検出されたことから感染が成立したと考えられた。さらに、これらの培養上清をヒトのプリオン高感受性株に感染させたところ、CMK85-1 と K562 の培養上清を添加した細胞に異常プリオンが検出された。この 2 つの細胞株から感染性のプリオンが産生されていることが示唆された。

C. 考察

我々が見出した BSE 持続感染細胞株は培養上清中に高濃度の感染性プリオンを産生することがわかった。また、持続感染株の基となった非感染細胞株が異常プリオンに対して高感受性を見出し、*in vitro* 感染系を作り、異常プリオンの感染価を 3 ヶ月程度で測定できるようになった。マウスの評価系に比べ大幅に短縮することができた。

また、PMCA 法がヒトの血液のスクリーニングに応用可能か検討した。PMCA 法はハムスターとヒツジの系での増幅が報告されているのみで、ヒトを含めた他の動物（特に牛）まで応用できるのかわかっていなかった。また、どの程度異常プリオンを増幅することが可能なのか、明らかになっていなかった。さらに問題なのは脳の正常プリオンを基質として使用しているため、ヒトの系に応用するためには、脳の代わりとなる基質を探す必

要があった。正常プリオンを高発現する細胞株を基質として用いることでこの問題を解決することができた。感染細胞をそのまま PMCA 法によって増幅し、異常プリオンを検出したところ、通常のウエスタンブロットでは検出できない検体からも検出が可能であった。

次に、培養を経ないで直接的に培養上清からヒト異常プリオンを増幅・検出させることを検討したところ、PCMA 法を 40 サイクルを 2 クール行うことで培養上清から直接ヒトの異常プリオンの増幅・検出が可能になった。今後、増幅に最適な条件を検討する必要があるが、血液等のスクリーニング法の開発に結びつくものである（概要図参照）。

また、性質が異なる 3 つのヒト白血病細胞株に異常プリオンの感染が成立し、内 2 つの細胞株からは異常プリオンの産生が示唆されたことから、プリオンに感染した血球系からどのような様式で異常プリオンが血液中に放出されるのか解析できる良いモデルになる可能性がある。感染性の最も高いプリオンの大きさが 50 nm 前後との報告もあり、これは exosome の大きさに一致し、巨核球や樹状細胞に exosome が多く見られることから異常プリオンの除去法を開発する上からも興味深い。

D. 結論

1. *in vitro* 感染系を確立し、約 3 ヶ月で異常プリオンの感染価を測定可能

にした。

2. ハムスターの脳乳剤を基質にした PMCA 法を改良し、ヒトグリオーマ細胞株の細胞を基質に用いることによってヒト異常プリオンの増幅が可能になった。
3. 感染細胞を PMCA 法によって増幅後、検出することによって感染早期に異常プリオンが検出可能になった。
4. 培養上清から PMCA を 2 コース (約 80 時間) 行うことで、直接ヒトの異常プリオンを増幅・検出できることに成功した。
5. 性質が異なる 3 つのヒト白血病細胞株に異常プリオンの感染が成立し、内 2 つの細胞株からは異常プリオンの産生が示唆された。

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：輸血、血液製剤の安全性の現状、公衆衛生、第 69 巻、781-785、2005 年。
- 2) 水沢左衛子、岡田義昭、堀内喜信、他：C 型肝炎ウイルス RNA の遺伝子検査法のための第一次国内標準品の作製、日本輸血学会雑誌、51 巻、515-519、2005

2. 学会発表

- 1) 岡田義昭、水沢左衛子、梅森清子、山口一成：in vitro プリオン検出系を用いたプリオン高親和性マウスリンパ球サブ

セットの検索、第 53 回日本ウイルス学会、横浜、2005 年

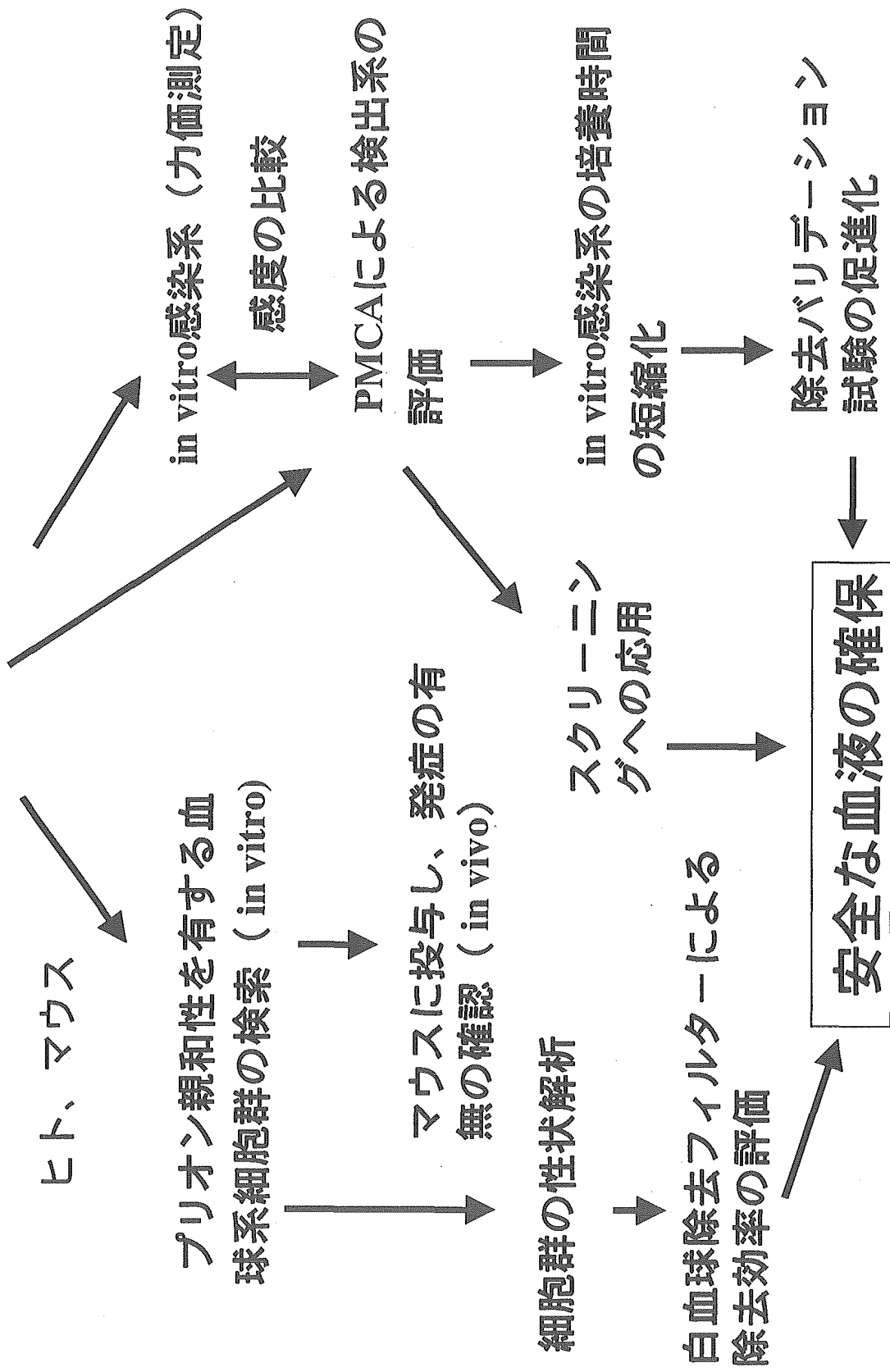
- 2) 水沢左衛子、岡田義昭、梅森清子、山口一成：ヒト白血病由来細胞株を用いた in vitro TSE 感染系、第 53 回日本ウイルス学会、横浜、2005 年

G. 知的所有権の取得状況

なし

概要図

プリオン持続感染細胞の上清



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）
分担研究報告書

異常プリオンの in vitro 感染系の開発と高感度検出系の開発

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 輸血を介したプリオン病の感染例が報告され、血液での高感度のスクリーニング法の開発とプリオン除去法が開発が切望されている。我々が確立した BSE 持続感染ヒト細胞株は培養上清中に感染性の異常プリオンを産生し、血液中に存在する異常プリオンに性状が似ていると考えられている。この培養上清を高感受性細胞に感染させ、PMCA(protein misfolding cyclic amplification)法によって異常プリオンが増幅したところ、ヒト異常プリオンの増幅が確認され、通常の培養法よりも早期の検出が可能になった。さらに感染性プリオンを含む培養上清をヒト正常プリオンが多く発現する細胞に添加して PMCA 法を行い、上清からヒト異常プリオンを直接、増幅・検出することに成功した。今後、増幅に用いる基質や反応条件等を検討し最適な条件を決める必要があるが、ヒト異常プリオンが増幅できたことによって PMCA 法はヒト血液からのスクリーニング法の開発や除去法の迅速な評価に応用できると考えられた。

A.研究目的

日本において英国滞在歴を有する男性が変異型 CJD と診断されたため、輸血を介した変異型 CJD の感染を防止するためにヨーロッパに滞在歴を有する供血者からの採血を止めている。血液の供給を考えた場合、プリオン病に対するスクリーニング法の開発や除去法が開発が急務になっている。これまでの動物を用いた感染実験によって血液中に存在する異常プリオンの量は非常に少ないことが明らかにされている。ヒトを考えた場合に発症する前の供血者が問題となるので、より少量の異常プリオン

を検出する能力が必要になる。検出感度そのものを高める技術の他に、検出する対象を増幅して検出しやすくする方法もある。タンパク質を核酸で実施されている PCR 法と同様に増幅させる方法として近年 PMCA(protein misfolding cyclic amplification)法が開発された。過剰量の正常プリオン存在下に超音波処理によって異常プリオンをバラバラにして、異常プリオンと正常プリオンとを結合させ正常を異常に変える工程を数十回繰り返すことによって異常プリオンを増幅させる方法である。報告ではハムスター脳乳剤にスクレイピー

由来のプリオン病を発症したハムスターの血液を添加し、PMCA法を行うことによって血液中の異常プリオンが検出できたというものであった。我々はこの方法をヒト異常プリオンに応用し、高感度の検出法の開発を目的とした。また、我々の開発した *in vitro* 感染系でも感染価を測定するのに約3カ月を要する(動物では半年から1年、場合によってはそれ以上)ため、異常プリオン除去効果等を迅速に評価するためにPMCA法を用いることで評価期間の短縮も目指した。

B. 研究方法

(1) 異常プリオンを含む培養上清の調整

ヒトグリオマー由来の細胞株に日本産牛由来のBSE脳乳剤を添加することで、持続感染が成立した細胞株の培養上清を集め、10000G、10分間の遠心にて細胞残屑を除去し、さらに0.45 μ mのフィルターで濾過したものを感染実験に用いた。牛の脳乳剤の混入を否定するために約8ヶ月間継代した細胞株の培養上清を上記処理した。

(2) *In vitro* 感染系による培養上清の感染価測定

検体を 10^{-3} から 10^{-10} まで希釈し、非感染細胞に各100 μ 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 μ g/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。12-14週間継代し、感染細胞をプロテネ

ースK (PK) 100 μ g/mlの条件で37度60分間処理し、ウエスタンブロット法を行った。検出にはマウス単クローン抗体である3F4とSAF70を用い、化学発光にて異常プリオンの有無を検討した。

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-ザブルのものを使用し、ピペット類は1度培養液を吸った後にはメデュウム瓶に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) BSE感染細胞からのPMCA法による異常プリオンの増幅・検出

感染性異常プリオンが存在していることが明らかな培養上清を10倍ずつの段階希釈し、高感受性のヒト由来細胞に添加し、5週間継代培養した。感染細胞 2.5×10^6 に250 μ lのPMCA-buffer (1% Triton X-100、150mM NaCl、4mM EDTA、protease inhibitor)を加え、超音波蛋白質自動活性化装置(ELEKON社)を用いて異常プリオンを増幅した。増幅は、超音波の照射を3秒間行い、1秒間の間隔を空け、計5回照射し、1時間のincubationを1サイクルとした。計40サイクル(約40時間)の増幅を行った。増幅した検体をプロテネースK (PK) 100 μ g/mlの条件で37度60分間処理し、ウエスタンブロット法を行った。検出は2と同様に行った。

(4) 培養上清からのPCMA法による異常プリオンの増幅・検出

1 で感染に用いたものと同じ培養上清を 10^{-1} から 10^{-8} まで希釈し、増幅に用いた。ヒトグリオーマ由来の細胞株（非感染） 2.5×10^6 に $250 \mu\text{l}$ の PMCA-buffer と上記の希釈した培養液 $50 \mu\text{l}$ を加え、超音波蛋白質自動活性化装置（ELEKON 社）を用いて異常プリオンを増幅した。超音波の処理は（2）と同じ条件で 40 サイクルの増幅を行った。検出感度を上げるために、増幅検体 $50 \mu\text{l}$ を $250 \mu\text{l}$ の PMCA-buffer に溶解したヒトグリオーマ由来の非感染細胞 2.5×10^6 に添加し、さらに 40 サイクルの増幅を行った。増幅産物は 2 と同じ条件で PK 処理後、ウエスタンブロットにて異常プリオンの有無を解析した。

C. 研究結果

（1）In vitro 感染系による培養上清の感染価測定

上清を感染させた細胞にのみ 3 F4 に反応する分子量約 30-35Kd の非感染細胞にないシグナルが検出された。SAF70 抗体を用いても同様な結果を得た。2 回測定し、培養上清中に 10^9 から $10^{11}/\text{ml}$ の感染価が認められた。

（2）BSE 感染細胞からの PMCA 法による異常プリオンの増幅・検出

増幅をしない通常の検出法では、 10^{-11} 希釈では異常プリオンのバンドは検出されなかったが 40 サイクルの PMCA 法によって検出可能になった。 10^{-14} では増幅によっても異常プリオンは検出されな

かった。また、非感染細胞に PMCA を行っても約 30-35Kd のバンドは増幅されなかった（図 1）。

（3）培養上清からの PCMA 法による異常プリオンの増幅・検出

10^{-7} に希釈した培養上清 $50 \mu\text{l}$ から異常プリオンを検出することができた（図 2）。 10^{-4} から 10^{-7} までの異常プリオンのシグナルは 10 倍と 100 倍に希釈した培養上清のシグナルよりも強い傾向があった。また、培養液（異常プリオンが入っていない）を同様に増幅しても異常プリオンは検出できなかった。

D. 考察

我々が見出した BSE 持続感染細胞株は培養上清中に高濃度の感染性プリオンを産生することがわかった。これは、添加した牛脳乳剤のコンタミを除外するために長期間継代した結果、細胞株に適応した「プリオン株」が選択され、増殖したためと推定された。そのため、持続感染株の基となった非感染細胞株は増殖した異常プリオンに対して高感受性を示した。それによって異常プリオンの感染価を 3 ヶ月程度で測定できるようになった。これまでのマウスを用いた評価系だと半年から 1 年位の時間を要したので、大幅に短縮することができた。また、異常プリオンの除去の評価も数ヶ月で結果が得られることが期待できる。

さらに、PMCA 法がヒトの血液のスクリーニングに応用可能か検討した。PMCA

法はハムスターとヒツジの系での増幅が報告されているのみで、ヒトを含めた他の動物（特に牛）まで応用できるのかわかっていない。また、成功例では脳乳剤に含まれる正常プリオンを基質として使用している。ヒトの系に応用するためには、ヒト脳乳剤を得ることは倫理的にも容易ではないので、他の正常プリオンが豊富に含まれ、入手が容易なヒト由来組織を求めなければならない。幸い、我々は *in vitro* 感染系を確立するにあたり、正常プリオンを高発現する細胞株を検索していたので、検索した細胞株から高発現細胞株を選び異常プリオンの基質として用いた。まず、*in vitro* 感染系によって異常プリオンの大凡の感染価が分かっている培養液を細胞に感染させ、5 週間後に感染細胞をそのまま PMCA 法によって増幅し、増幅の効率をみた。通常のウエスタンブロットでは検出できない希釈でも異常プリオンの検出が可能であった。また、非感染細胞では増幅が見られなかった。これによって、*in vitro* 感染系でも結果を得るのに 3 ヶ月程度を要したものがさらに大幅に短縮される可能性がでてきた。現在、*in vitro* 感染系で検出可能なエンドポイントを PMCA 法で得るためには、感染後どれくらいの週数が必要なのかの検討を続けている。

次に、感染細胞での増幅を確認できたので、培養を経ないで直接的に培養上清からヒト異常プリオンを増幅・検出させ

ることを検討した。ウイルスの検査で用いられている PCR 法は感度を高めるために nested-PCR が用いられている。これは準じた方法を PCMA 法に応用した。つまり、40 サイクルで増幅した検体の 1 部を新しい正常プリオンが基質として存在している反応液に加えて、さらに増幅を行い、異常プリオンが増幅・検出できるか検討した。結果としては培養上清から直接ヒトの異常プリオンの増幅・検出は可能であった。しかし、検出可能な希釈倍率は一定しておらず、図 2 に示した成績よりも低希釈までしか検出できなかった場合や逆に *in vitro* 感染系と同等の感度まで検出可能な場合があった。増幅に最適な条件を検討し、一定の感度が得られるようさらに検討が必要である。何れにしても、培養上清から直接的にヒト異常プリオンを増幅・検出できたことは血液等のスクリーニング法の開発に結びつくものである。

また、ヒト末梢血のどの分画が異常プリオンと親和性があるのか、検討を続けている。

バイオセーフティ上、安全性確保のために我々が得た細胞株から産生されるヒトプリオンがこの細胞株だけに特に高感受性を示すのか、他の細胞にも同様の感受性を示すのか解析中である。また、マウスやラット由来の細胞株にも高感受性の株が存在している可能性があり、検索を続けている。発見できたならば除去の

評価はマウスやラットの細胞を用いて実施し、増幅・検出のみヒトプリオンを用いるなどに分けることを予定している。

E. 結論

1. *in vitro* 感染系を確立し、約3ヶ月で異常プリオンの感染価を測定可能にした。
2. ハムスターの脳乳剤を基質にしたPMCA法を改良し、ヒトグリオーマ細胞株の細胞を基質に用いることによってヒト異常プリオンの増幅が可能になった。
3. 感染細胞をPMCA法によって増幅後、検出することによって感染早期に異常プリオンが検出可能になった。
4. 培養上清からPMCAを2コース(約80時間)行うことで、直接ヒトの異常プリオンを増幅・検出できることに成功した。

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：輸血、血液製剤の安全性の現状、公衆衛生、第69巻、781-785、2005年。
- 2) 水沢左衛子、岡田義昭、堀内喜信、他：C型肝炎ウイルスRNAの遺伝子検査法のための第一次国内標準品の作製、日本輸血学会雑誌、51巻、515-519、2005

2. 学会発表

- 1) 岡田義昭、水沢左衛子、梅森清子、

山口一成：*in vitro* プリオン検出系を用いたプリオン高親和性マウスリンパ球サブセットの検索、第53回日本ウイルス学会、横浜、2005年

- 2) 水沢左衛子、岡田義昭、梅森清子、山口一成：ヒト白血病由来細胞株を用いた*in vitro* TSE感染系、第53回日本ウイルス学会、横浜、2005年

H. 知的所有権の取得状況

なし

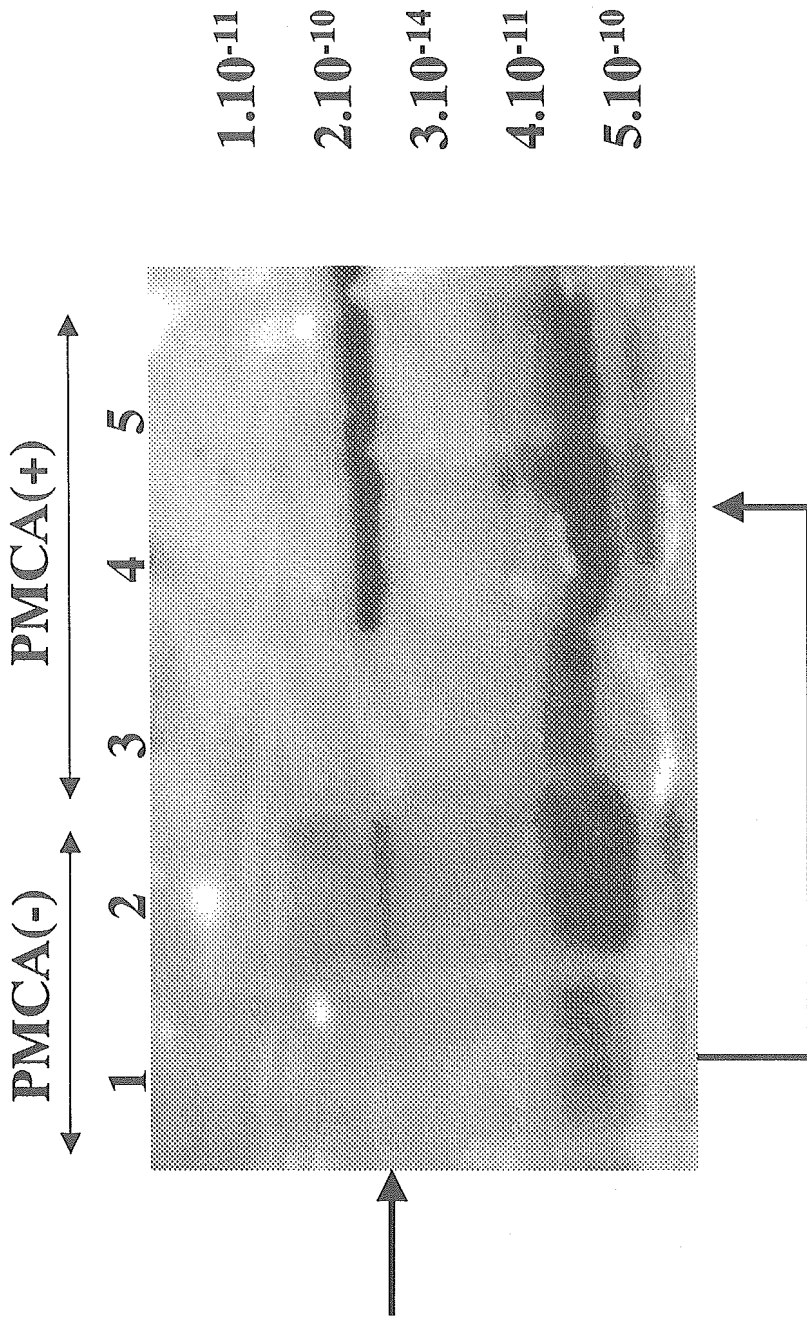


図1.PMCA法による感染細胞での異常プリオンの増幅効果

1. negative

2. XI

3. 10^{-1}

4. 10^{-2}

5. 10^{-3}

6. 10^{-4}

7. 10^{-5}

8. 10^{-6}

9. 10^{-7}

10. 10^{-8}

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

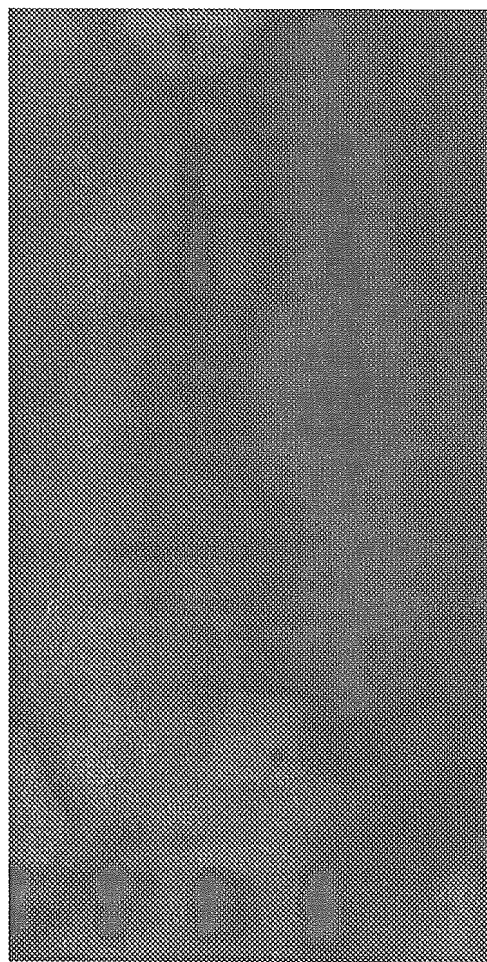


図2.培養上清からのPMCA法によるヒト異常プリオンの増幅・検出

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 主任研究官

2004年に英国で輸血を介しての vCJD 感染が疑われる症例が報告され、また2005年にわが国において、英国滞在歴を有する男性が vCJD と診断されたことから、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。本研究では血液中での PrP^{Sc} の存在様式を反映した *in vitro* の実験系の確立と、血液や血液製剤からの PrP^{Sc} の除去・不活化法の研究に利用できる PrP^{Sc} を供給することを目的として、BSE 感染ヒト glioblastoma 由来細胞株の培養上清を用いてヒト血球系細胞株の感染系について検討した。性質の異なる3つのヒト白血病由来細胞株 CMK85-L, THP-1 及び K562 は BSE 感染細胞の培養上清によって感染し、CMK85-L と K562 は培養上清中に伝達性の PrP^{Sc} を産生することが示唆された。本実験系は脳乳剤を用いた系よりも血液中での PrP^{Sc} の存在様式を反映していると考えられるので、*in vitro* の感染実験系や PrP^{Sc} の除去・不活化法の研究への応用が期待できる。

A. 研究目的

変異型 CJD (vCJD) はウシ海綿状脳症(BSE)の感染が原因と考えられている。2004年に英国で輸血を介しての vCJD 感染が疑われる症例が報告され、また2005年にわが国において、英国滞在歴を有する男性が vCJD と診断されたことから、英国滞在歴を有する献血者からの採血が制限され、輸血用の血液の不足が危惧されている。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・不活化法の開発が求められている。しかし、血液中に存在する異常プリオンの量が非常に少ないため、血液製剤中に混入する PrP^{Sc} の除去・不活化の研究の多くは感染動物の脳乳剤を用いている。

分担研究者は①血液中での PrP^{Sc} の存在様式を反映した *in vitro* の実験系の確立と②血液や血液製剤からの PrP^{Sc} の除去・不活化法の研究に利用できる PrP^{Sc} を供給することを目的として、ヒト血球系細胞株を用いた *in vitro* TSE 感染系について検討してきた。巨核球の特徴を有するヒト白血病由来細胞株 CMK85 が BSE 感染牛の脳乳剤によって感染し、141日以上持続して Proteinase K 耐性のプリオン (PrP^{Res}) を産生することを平成16年度に報告した。本研究ではさらに血液中での PrP^{Sc} の存在様式をより反映した *in vitro* の実験系の確立を目指し、BSE 感染ヒト glioblastoma 由来

細胞株の培養上清を用いて性質の異なる3つのヒト白血病由来細胞株の感染を検討した。

B. 研究方法

図1に実験の概要を示した。

BSE : BSE 感染牛の脳乳剤をヒト glioblastoma 由来細胞株に感染させてから5ヶ月以上継代した培養の上清を 10000 x g, 10min 遠心、その上清をミリポアフィルター (0.45µm) でろ過、-80°Cで凍結保存したものをを用いた。

培養細胞株 : ヒト白血病由来細胞株として CMK85-L, THP-1 及び K562 を、また伝達実験の感受性細胞としてヒト glioblastoma 由来細胞株をもちいた。

in vitro TSE 感染 : CMK85-L, THP-1 及び K562 を 24 穴プレートにそれぞれ 10⁵ cells/well まき、BSE 感染細胞上清 100 µl を添加。以後、RPMI 培地で週2回3~5倍に希釈して継代培養し、1ヶ月後にサンプリングして細胞のウェスタンブロッティングと上清の伝達実験を行った。培養 2ml (約 10⁶ 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 10000 x g, 10min 遠心、その上清をミリポアフィルター (0.45µm) でろ過、-80°Cで凍結保存した。

伝達実験 : 図2に概要を示した。PrP^C を高発現しているヒト glioblastoma 由来細胞株 5x10⁴ 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、2日後にPBSで3回洗浄、トリプシン処理して継代、以後週2回ずつ継代し、1ヶ月後にウェスタンブロッティングを行った。

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°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 °C 5min 加熱してウェスタンブロッティングの試料とした。

ウェスタンブロッティング：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時間の電気泳動によって分離後、polyvinylidene 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^{Sc}の検出には抗プリオン-マウスモノクローナル抗体 3F4 を1次抗体とし、Dual View(アマシャム)とECL ウェスタンブロッ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。

(倫理的な配慮) 使用したヒト培養細胞は広く研究に使用されている確立した細胞株であり、倫理的な問題はない。

C. 研究結果

1) BSE 感染ヒト glioblastoma 由来細胞株の培養上清を用いたヒト白血病由来細胞株の感染。図3上のパネルに示したように、BSE 陽性の培養上清を添加した CMK85-L と THP-1 とでは 30kD の、K562 では 25kD の PrP^{Pres} の生成が見られた。一方 BSE 陰性の培養上清を添加したコントロールにおいて K562 では 25kD の非常に薄いバンドが観察されたが、CMK85-L と THP-1 では PrP^{Pres} みとめられなかった。

2) ヒト白血病由来細胞株に生じた PrP^{Pres} の伝達性。ヒト白血病由来細胞株で生成した PrP^{Pres} の伝達性をヒト glioblastoma 由来細胞株を用いて検討した。図3下のパネルに示すように BSE 陽性の CMK85-L と K562 の上清を添加した場合には 25kD と 30kD の PrP^{Pres} が

生じることから伝達性のあることが示唆された。THP-1 の上清を添加した場合には PrP^{Pres} の生成は認められなかった。一方、非感染細胞の上清を添加したコントロールでは BSE 感染時に特異的なこれらのバンドは認められなかった。

D. 考察

1) BSE 感染牛の脳乳剤によって白血病由来細胞株 CMK85-L が感染して約 30kD の PrP^{Pres} を生成し、伝達性を示すことをすでに報告したが、本研究の結果から性質の異なる3つの血球系細胞株 CMK85-L, THP-1 及び K562 のいずれも BSE 感染ヒト glioblastoma 由来細胞株の培養上清によって感染することが示された。CMK85-L, THP-1 の PrP^{Pres} の分子量は 30kD であった。このバンドのサイズは BSE 感染ヒト glioblastoma 由来細胞株に見られる2種類の PrP^{Pres} の大きい方のバンドのサイズと同じであり、glioblastoma 由来細胞株に馴化した PrP^{Sc} の性質を反映している可能性が考えられる。

2) BSE 感染 CMK85-L と K562 は伝達性を示した。THP-1 は伝達性を示さなかったが、伝達性を確認するには培養期間が充分でなかった可能性があるため、検討中である。

E. 結論

ヒト白血病由来細胞株 CMK85-L, THP-1 及び K562 は BSE 感染細胞の培養上清によって感染し、CMK85-L と K562 は培養上清中に伝達性の PrP^{Sc} を産生することが示唆された。本実験系は脳乳剤を用いた系よりも血液中での PrP^{Sc} の存在様式を反映していると考えられるので、*in vitro* の感染実験系や PrP^{Sc} の除去・不活化法の研究への応用が期待できる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

水沢左衛子, 岡田義昭, 梅森清子, 山口一成：
ヒト白血病由来細胞を用いた *in vitro* TSE 感染系, 第53回日本ウイルス学会学術集会,
2005年11月、横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

図1. In vitro BSE 感染系

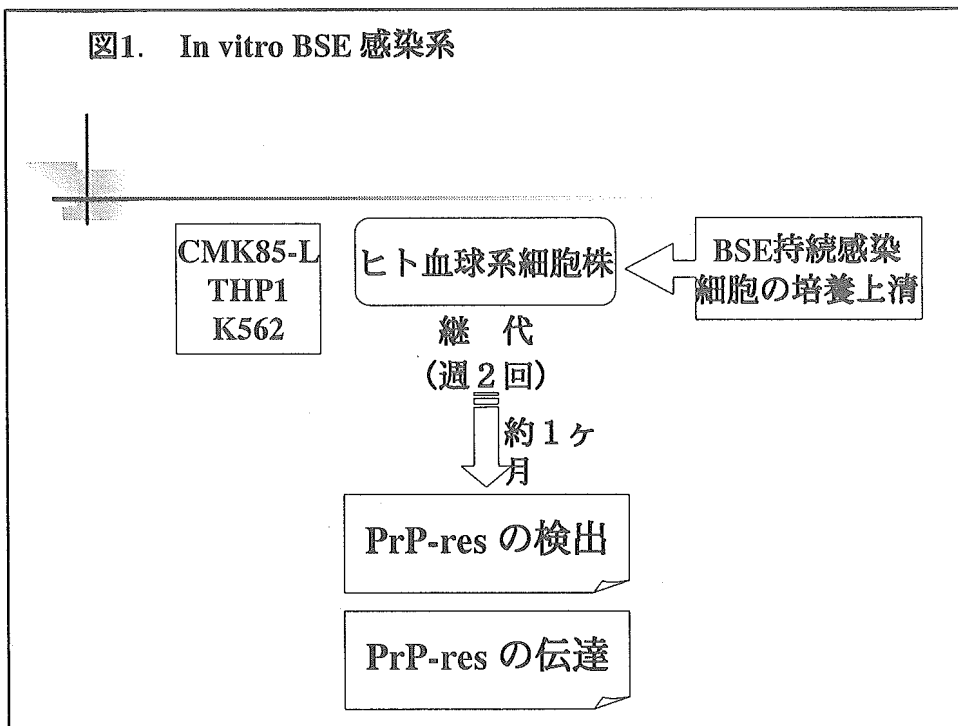


図2. 伝達実験

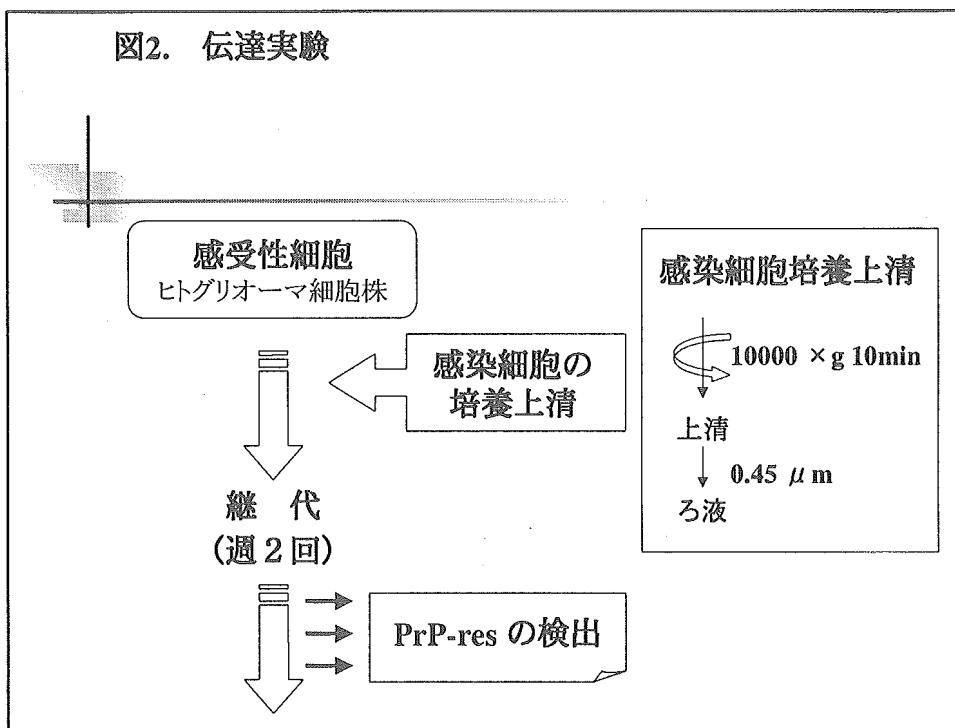
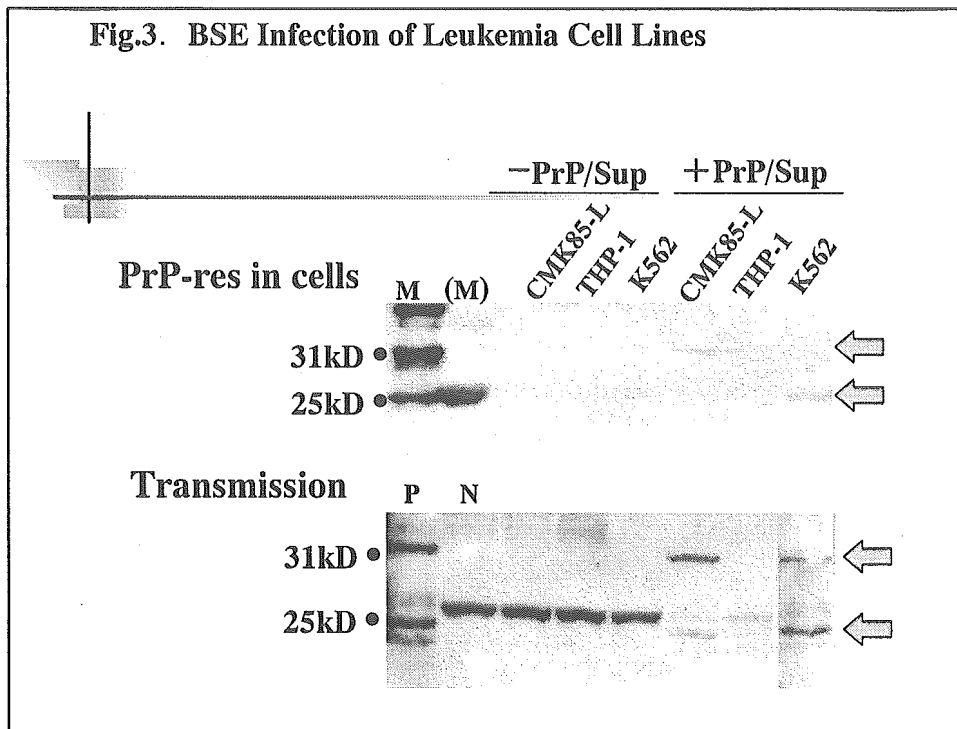


Fig.3. BSE Infection of Leukemia Cell Lines



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)
分担研究報告書

血液中でのプリオンタンパクの存在様式の解析

分担研究者 長谷川 秀樹 国立感染症研究所、感染病理部 室長
協力研究者 永田 典子 国立感染症研究所、感染病理部 主任研究官

研究要旨

血液中では異常プリオンがどのような様式で存在し、細胞から細胞にどのような機序で感染するのか、感染を予防する上からも重要な点である。我々は細胞の中に形成された小胞が *exosome* の形で培養上清中に放出されることに注目し、正常プリオンタンパクを高発現しているヒト *glioma* 由来の細胞株の培養上清から HLA クラス 1 や CD61 に対する抗体を用いて *exosome* を濃縮し、プリオンがその中に存在するかどうか、ウエスタンブロットにて解析した。プリオンタンパクは検出されなかったが、検出感度の問題もあり、PMCA (Protein misfolding cyclic amplification) 法や電顕を用いた解析を進めている。

A. 研究目的

英国において輸血を介したプリオン病の感染例が報告され、輸血用血液の安全性を確保する上で異常プリオンの検出・除去法の開発が重要になった。正常プリオンは通常細胞表面に存在しているが、異常プリオンは血液中ではどのような様式で存在し、血液系の細胞から細胞にどのような機序で感染を拡大していくのか、明らかにすることは有効な予防対策を立てる上で重要である。我々は細胞内で小胞として存在し、50 nm 前後の大きさの *vesicle* として培養上清中に放出される *exosome* に注目し、プリオンタンパクと *exosome* の関係について解析した。

B. 研究方法

ヒト *glioma* 由来の細胞株を 2×10^6 各々 10 cm ディッシュに播き、3 日間培養後、培養上清を集めた。3000rpm x 10 分の遠心によって細胞残屑を取り除いたものを検体とした。抗マウス IgG 抗体が結合した磁気ビーズに抗ヒトクラス 1 抗体、抗ヒトクラス II 抗体、CD4、CD8、CD19、CD61、抗プリオン抗体 (SAF32 及び SAF70 抗体) を各々添加し、4°C にて 2 時間反応させた。磁石によって磁気ビーズを集め、結合していない抗体を取り除いた磁気ビーズを各 10 ml の培養上清に加え、4°C にて 14 時間反応させた。反応後、磁石によって免疫複

合体を集め、ウエスタンブロット法にてプリオンタンパクの有無を検索した。プリオンの検出には抗プリオン抗体である 3F4 を用い、化学発光によって行った。

C. 研究結果

何れの抗体を用いた検体からも明瞭なプリオンタンパクのバンドは確認できなかった (図 1)。

D. 考察

Exosome の表面は細胞の表面と同じなので正常プリオンが存在していると考えられる。陽性コントロールとして用いたプリオン抗体による exosome の濃縮によってもプリオンが検出されないこと、また、exosome を破壊し、その中にプリオンが存在していれば培養液中に溶出するように界面活性剤処理を行い、プリオン抗体で免疫沈降を実施してもプリオンは検出できなかったこと、等からこの試験法の感度では検出が困難であることが示唆された。異常プリオンは PMCA 法によって増幅可能なことから同法を用いた解析を予定している。また、exosome は血小板や樹状細胞に多く存在することが報告され、特に、血小板に正常プリオンが多く存在することを我々も明らかにしており、巨核球細胞株の exosome の存在様式を電顕を用いて解析中である。Exosome の大きさは 50 nm 前後であり、また 50 nm 前後のプリオンが最も強い感染性を有するとの報告もあり、exosome とプリオンは細胞内外でどのような存在様式をしているのか

非常に興味深い。

E. 結論

Exosome とプリオンとの存在様式を解析したが、検出感度の点からプリオンの検出は困難であった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hasegawa H, Ichinohe T, Strong P, Watanabe I, Ito S, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T. Protection against influenza virus infection by intranasal administration of HA vaccine with chitin microparticles as an adjuvant. *Journal of Medical Virology*, 2005 Jan; 75:130-136.
2. Ichinohe T, Watanabe I, Ito S, Fujii H, Moriyama M, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T, and Hasegawa H*, Synthetic double-stranded RNA [poly (I:C)] combined with mucosal vaccine protects against influenza virus infection. *Journal of Virology*, 2005 Mar;79(5):2910-9.
3. Saijo M, Morikawa S, Fukushi S, Mizutani T, Hasegawa H, Nagata N, Iwata N, Kurane I. Inhibitory effect of mizoribine and ribavirin on the replication of severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus. *Antiviral Res.* 2005 Jun;66(2-3):159-63. Epub 2005 Feb 19.

2. 学会発表

1. 永田典代、岩田奈織子、長谷川秀樹、福士秀悦、西條政幸、森川茂、佐藤由