

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 18 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 岡田 義昭

平成 19 (2007) 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 P 1-P 4
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 P 5-P 11
岡田 義昭

 - 2. BSE in vitro 検出系としての PMCA 法の検討 P 12-P 14
水沢 左衛子

 - 3. 動物細胞株を用いた異常プリオン感染系の開発 P 15-P 17
長谷川 秀樹

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 P 18

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 我々は昨年度、BSE が持続感染したヒト細胞株を得ることに成功し、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が、詳細な解析の結果、我々が異常プリオンと判断していたウエスタンブロット（WB）法でのバンドは感染細胞に反応するものの非特異的なものであることが判明した。異常プリオンの抽出法と検出法を改良した結果、特異的に異常プリオンが検出できるようになった。この方法を用いてこれまでの結果を再評価したところ、BSE 感染ヒト細胞株から 25~30KD 付近に 3 本のプリオン特異的なバンドが確認できた。このバンドは感染脳組織から検出される異常プリオンのパターンと同一であった。さらに、培養上清中からも感染性異常プリオンが検出できた。また、マウスやラットの細胞株からは明確な感染成立の証拠は得られなかった。これらの結果は昨年度までの結果と一致していた。異なる結果が得られたのは、感染後 4 週間という短期間で感染価測定と除去評価が可能であった点である。また、昨年度、細胞株を基質に用いて異常プリオンの増幅に成功した PMCA(protein misfolding cyclic amplification)法からは特異的な異常プリオンは検出されなかった。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。また、感染後 4 週間という短期間の結果ではあるが、20nm のサイズをもつウイルス除去膜によって 5log の異常プリオンが除去できた。これは、異常プリオンの性状を解析する上で重要な知見と考えられた。

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の開発が急務になっている。しかし、現在用いられている感染性や

除去効率の評価はマウスやハムスターに馴化したスクレーパー株を用いて実施されている。そのため、結果が得られるまでに多数の動物と少なくとも半年以上の時間がかかる。また、脳内接種のため投与できる検体の量にも制限がある。しかも感染した動物の脳乳剤を用いているため、本当に血液中と同じ性状を保っているのか疑問であった。これらの問題点を解決するために我々は BSE 感染ウシ由来の脳乳剤を出発点にして *in vitro* 感染系を開発してきた。BSE 由来の異常プリオン株を分離し、*in vitro* の系によって短期間で評価できるような測定系を確立することを目的としている。*in vitro* 感染系では、培養上清中に感染性の異常プリオンを産生する感染細胞株が得られるかどうか全てが依存している。一方、今年度、ヒト白血球のサブセットの親和性やウイルス除去膜による除去評価（ポアサイズ 15nm、20nm、35nm）が終了した後、検出系の問題点が明らかになった。幸いにも確実に異常プリオンが検出系できる測定系を確立することができ、これまでに得られた結果を再検討することができた。

B. 研究方法と結果

(1) 異常プリオンの検出法と *In vitro* 感染系の確立

BSE に感染したウシ脳乳剤を用いて感染させたグリオーマ細胞を溶解し、核を除いた上清をタンパク分解酵素（Proteinase K;PK）を用いて消化後、メタノール沈殿によって濃縮した。尿素

と 2 ME 入りのローディングバッファーに溶解し、ウエスタンブロット法を行った。検出には単クローン抗体ではなくウサギ由来の抗ヒトプリオン抗体を用いた。25～30KD に 3 本のプリオン特異的なバンドが確認された。このことから、我々がこれまで感染していたと考えていた細胞株は確かに感染していることが確認された。

(2) 培養上清中の感染性プリオンの検出と感染力価測定

6ヶ月以上継代し、脳乳剤の持ち込みを考慮する必要がない細胞培養上清を 10 倍の段階希釈し、グリオブラストーマ細胞株に感染させた。4 週間継代後に 1 の方法を用いて異常プリオンを検出したところ、BSE 由来脳乳剤で感染させた感染株と同様に 3 つの異常プリオン特異的バンドが確認できた。希釈に従ってバンドは弱くなる傾向が認められ、 10^5 まで全て異常プリオンが検出された。感染価は 10^6 /mL 以上であると推定された。

(3) ウイルス除去膜を用いた異常プリオン除去の評価

20nm のウイルス除去膜を用いて感染細胞由来の培養液を濾過した。濾過前後の検体を 1 から 10^5 倍まで希釈し、非感染細胞に感染させ、4 週間継代後に異常プリオンを検出し、濾過前後の感染力価を求めた。5 log 除去できたことが示された。

(4) マウス・ラット由来細胞株を用いた感染系の開発

マウス由来では AtT-20 (下垂体腫瘍) KT 5 細胞 (アストロサイトーマ)、ラット由来の細胞株は RNB (アストロサイト)、RCR (アストロサイト様細胞) GH1 (下垂体腫瘍)、GH3 (下垂体腫瘍) を用いた。これらの細胞株に BSE に感染した脳乳剤を添加して 20 週以上継代し、異常プリオンの有無で感染成立を検討した。検出法はヒト細胞株と同様にしたが、明らかな 3 本のバンドは認められず、感染の成立は確認できなかった。

(5) PMCA 法による異常プリオンの増幅・検出法の開発

基質となる正常プリオンはヒト神経系細胞株、ラット神経系細胞株、非感染ウシ脳乳剤を用いた。異常プリオンは BSE 由来のウシ脳乳剤、*in vitro* で感染させたヒト細胞株及びラット株を用いた。ウシとヒトは 20 サイクルの増幅を行い、1 部の増幅産物を新しい基質に添加してさらに 20 サイクルの増幅を行った。ラットの細胞は 2 回目の増幅は 40 サイクル行った。検出は培養細胞と同様に行ったが何れからも異常プリオンのバンドは増幅されなかった。

C. 考察

検出法に問題が見つかったことから改良された方法を用いて、これまでの結果を再検討した。高感度の測定法として期待していた PMCA 法による異常プリオンの増幅は残念ながら確認できなかった。

それ以外では力価等の違いがあったが、BSE 由来の異常プリオンの *in vitro* 感染が成立し、細胞培養上清中に感染性の異常プリオンを産生していることは確認できた。感染力価の再検討では、希釈した上清を用いて感染させてから 4 週、7 週、13 週、17 週後の異常プリオンを検出したが、4 週目に 10^5 希釈まで異常プリオンが検出できたが 7 週目以降検出できなくなっていた。これまで *in vivo* での潜伏期が長いことから異常プリオンの増殖は遅いと考えていたが、経時的に見た感染価から感染後数週間でピークに達し、以後、感染細胞の増殖が抑制されるか、又は非感染細胞が異常プリオンに耐性となって感染が抑制され、検出感度以下となる可能性が示唆された。

また、20 nm のポアサイズのウイルス除去膜によって異常プリオンが除去されたことは、単に感染細胞から産生された異常プリオンが凝集しているためなのか、または何らかの膜に包まれた粒子状のためなのか、除去法開発のために重要な知見と思われた。BSE 由来の *in vitro* 感染系の報告はなく、これまでの結果の再確認とはいえ、今までに報告がない新しい知見を幾つか発見できた。

D. 結論

昨年度の検出系に特異性の問題が生じたが、特異的に異常プリオンを検出できる系を作り、これまでの結果を再評価した。*in vitro* 感染系は成立し、培

養上清中に感染性の異常プリオンを産生していることが確認できた。しかし、PMCA による異常プリオンの増幅は認められなかった。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1.論文発表

岡田義昭、梅森清子：血漿分画製剤の安全性確保の現状、医学の歩み第 218 巻、625-630、2006 年

2.学会発表

1) 岡田義昭：血漿分画製剤の感染症対策（シンポジウム）、第 54 回日本輸血学会、2006 年、大阪

G. 知的所有権の取得状況

なし

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やプリオン除去法の開発が切望されている。我々が昨年報告した異常プリオンと判断していたウエスタンブロット（WB）法でのバンドは感染細胞に反応する非特異的なものであることが判明したので、BSE 感染ヒト細胞株が本当に感染しているのか検討した。抽出法と検出に用いる抗体を検討し、確かに感染していることが確認できた。さらに、培養上清を用いた非感染細胞への感染性が確認でき、これによって細胞株が培養上清中に感染性の異常プリオンを産生していることも確認できた。細胞培養液と非感染細胞を用いて4週間で異常プリオンの力価を測定することが可能であった。また、ウイルス除去膜による異常プリオンの除去を検討し、20 nmの除去膜によって約5logの除去ができた。除去可能なことから、培養液に存在する異常プリオンがプリオンの凝集物なのか、あるいは何らかの膜に包まれた粒子なのか、今後の重要な解析テーマになった。

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の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とされている。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。逆に少量であることから、特異的にプリオンを吸着等によって除去するフィルターも有効だと考えられる。何れの方法もそれらの機能を評価するとなると、現行での感染脳乳剤を動物の脳内に接種して発症の有無で評価する方法を改善する必要がある。さらに、スクレーピー由来の異常プリオンがモデルとして使用されているが、vCJDの感染者ではスクレーピーと異なりリンパ組織に異常プリオンが蓄積することが知られている。血液中での動態がスクレーピーと異なる可能性があるためvCDJ の in vitro 感染系を確立し、高感

度検出系、及び除去法の開発を目指した。

また、脳乳剤よりもより血液の性状に類似した異常プリオンを含む評価用の検体を整備することも目指した。

B. 研究方法

(1) 異常プリオンの検出法

2.5 X 10⁶ 個の細胞を 0.5mL の Lysis buffer(150mM NaCl、 0.5%triton X-100、 0.5% sodium deoxycholate、 50mMTris-HCL(pH7.5))に溶解後、1 万 g 1 分間の遠心を行い、上清を 0.25mL 集めた。Proteinase K を最終濃度 20 μg /mL になるように添加し、37°C 1 時間反応させた。10 μl の pefablock を加えて PK の反応を止め、6 倍量のメタノールを添加し、4°C にて 3300 g、30 分の遠心を行った。沈殿は尿素入りのローディングバッファーに溶解し、ウエスタンブロットを行った。異常プリオンの検出はウサギ抗ヒトプリオン抗体を用いた化学発光法によって行った。

(2) 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、10000 g、10 分間の遠心にて細胞残屑を除去し、さらに 0.45 μm 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 6 ヶ月以上継代した細胞株の培養上清を上記処理した。

(3) In vitro 感染系による培養上清の感染価測定

感染前日に 24 穴プレートに 1 x 10⁵ 個の細胞を播く。培養上清を 1 から 10⁵ 倍まで希釈し、非感染細胞に各 100 μl 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 μg/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。コンフルレント状態になった後に 6 穴プレートに移し、2 回/週の頻度で 17 週間継代した。感染の有無は継代時に細胞を 10 cm ディッシュに植え、コンフルレントになった時点で集め、-80°C に保存した。検出は 1 の方法に従った。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。

(4) ウイルス除去膜を用いた異常プリオンの除去の評価

2 で集めた細胞上清 3mL をポアサイズ 20 nm のウイルス除去膜を用いて濾過した。濾過前後の検体を 1 から 10⁵ 倍まで希釈し、非感染細胞に各 100 μl ずつ添加し、3 の力価測定法に従って濾過前後の感染力価を求め、除去の評価を実施した。

C. 研究結果

(1) 異常プリオンの検出法

昨年度に報告した検出法は、感染細胞には 35KD 付近に異常プリオンと思われるバンドが存在し、非感染細胞に対してはそのようなバンドは認められなかった。また、複数回繰り返した In vitro 感染による培養上清の感染力価測定では、希釈濃度にしたがって 35KD のバンドの濃度も減少していたため異常プリオンと判断していた。しかし、詳細な解析の結果、分子量マーカー検出のために添加していた抗体がこれらの 35KD のバンドと反応していることが判明した。非感染細胞では陰性、感染させた細胞は陽性を示したことから感染は成立し、異常プリオンに関連したタンパクが増えているもの考えた。BSE 感染牛由来の脳乳剤を用いて感染させたヒトグリオーマから新しい抽出法を用いて異常プリオンを検出した。図 1 に示すように感染細胞由来の検体に 25~30KD 付近の 3 本のバンドが確認できた。これらのバンドは 2 次抗体やウサギ IgG では検出されず、抗プリオン抗体によって認識されるものと判断した。

(2) In vitro 感染系による培養上清の感染力価測定

上清を感染させた細胞から経時的にプリオンを抽出し、異常プリオンの有無を検索した。感染後 4 週の細胞から BSE 由来の脳乳剤を感染させた細胞と同様の 25

~30KD のバンドが得られた (図 2)。陽性のバンドが培養上清を 10^5 希釈して感染させた検体からも認められたことから、1mL 中には 10^6 /m l 以上の感染価があるものと推定された。しかし、感染後 13 週と 16 週経た細胞からは明らかな異常プリオンのバンドは認められなかった。

(3) ウイルス除去膜を用いた異常プリオンの除去の評価

ポアサイズ 20nm のウイルス除去膜による除去効果を in vitro 感染系を用いて実施した。感染 4 週目では濾過後では 1 倍希釈の濾液のみに異常プリオンが検出された。並行して測定した濾過前の検体では、 10^6 /m l 以上の感染価であったので少なくとも 5log 以上除去されたと考えられた。

D. 考察

昨年度に報告した異常プリオンの検出系に重大な誤りが発見され、異常プリオン特異的なバンドと考えていたバンドが非特異的であることが明らかになった。しかし、非特異的バンドは 35KD と他の報告よりも若干分子量が大きいのが、感染していると考えられていた細胞からのみ検出され、非感染細胞からは認められなかった。しかも、感染細胞の培養上清を希釈して感染させた細胞からは高倍率に希釈した程陽性バンドが弱くなり、陽性のシグナルは希釈に依存していた。以上

から、異常プリオン感染に関連したPK耐性の何らかのタンパクが増加しているものと推定した。しかし、BSE感染の成立を証明するには異常プリオンの存在を証明する必要がある。最初に異常プリオンの抽出法を検討し、次に検出法を改良した。これまで単クローン抗体を用いていたがポリクローナル抗体に変えることによってシグナルが増強し、異常プリオンが検出できるようになった。特異性を検討するために、2次抗体やウサギIgGを用いた場合の反応性も調べ、これらでは陰性であることを確認した。この検出法を用いて感染細胞での異常プリオンを検出したところ、25~30KD付近に3本の陽性バンドを確認できた。これらのバンドは非感染細胞からは検出されなかった。以上からBSE脳乳剤によってヒト細胞株が異常プリオンに感染したと判断した。また、添加した牛脳乳剤のコンタミを除外するために6ヶ月以上の長期間継代した細胞株から培養上清中を取り、非感染細胞に感染させたところ、感染4週目では 10^6 /ml以上の感染価が培養液中に認められた。改良された異常プリオン検出法では陽性バンドは3本が認められ、これは脳乳剤を用いて感染させた細胞からのパターンと一致し、確かに異常プリオンが感染・増殖したものと考えられた。このことから、目標としていた「感染細胞から感染性プリオンが産生されるin vitro感染系の確立」を達成したことになる。

興味深いことに、感染後4週目では 10^5 希釈まで異常プリオンが検出されたが、さらに継代した感染後7週目では 10^3 希釈が陽性、13週と17週後では感染は認められなかった（正確にはウエスタンブロット法の検出感度以下）。これは継代している間に異常プリオンは、ある期間増殖するが、その期間を過ぎると検出感度以下になってしまうことを意味していると考えられる。ヒトの細胞に馴化したプリオンはヒト細胞内で急速に増殖するが、これらの感受性のある細胞は死滅、又は細胞の増殖が非感染細胞より遅いため、異常プリオンに抵抗性のある細胞の割合が多くなり、継代を重ねると消失・検出感度以下になるものと推定している。我々はin vivoにおいて異常プリオンが感染してから発症までの期間が長いことから、細胞内でも同様に増殖が遅いと考えていたが、実際は予想よりも速く増えている可能性がある。感染後、どれくらいが感染価を測定するのに適した週数か検討する必要がある。

また、培養上清中に感染性プリオンが産生されることから、ウイルス除去膜を用いて除去効率を検討した。感染4週での評価では5log以上除去されたことになった。20nmのポアサイズを有するウイルス除去膜によって異常プリオンが除去されたことは、異常プリオンが凝集しているために20nmよりも大きな粒子を形成している、又は、異常プリオンが何ら

かの粒子の中に存在していることを意味し、血液中での存在様式を解析する上からも重要な知見だと考えられた。今後、優先的に解析すべきテーマと考え、早急に解析を開始する予定でいる。一方、これまでのマウスを用いた脳乳剤を用いた除去の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、バイオセーフティの面から我々が得た細胞株から産生されるヒト異常プリオンは、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 での感染細胞から異常プリオンを検出する方法を再検討し、感染成立の確認と培養上清中に感染性の異常プリオンが存在することを確認した。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

岡田義昭、梅森清子：血漿分画製剤の安全性確保の現状、医学の歩み第218巻、625-

630、2006年

2. 学会発表

- 1) 岡田義昭：血漿分画製剤の感染症対策（シンポジウム）、第54回日本輸血学会、2006年、大阪

H. 知的所有権の取得状況

なし

Detection of PrPres in infected cells with BSE brain homogenate

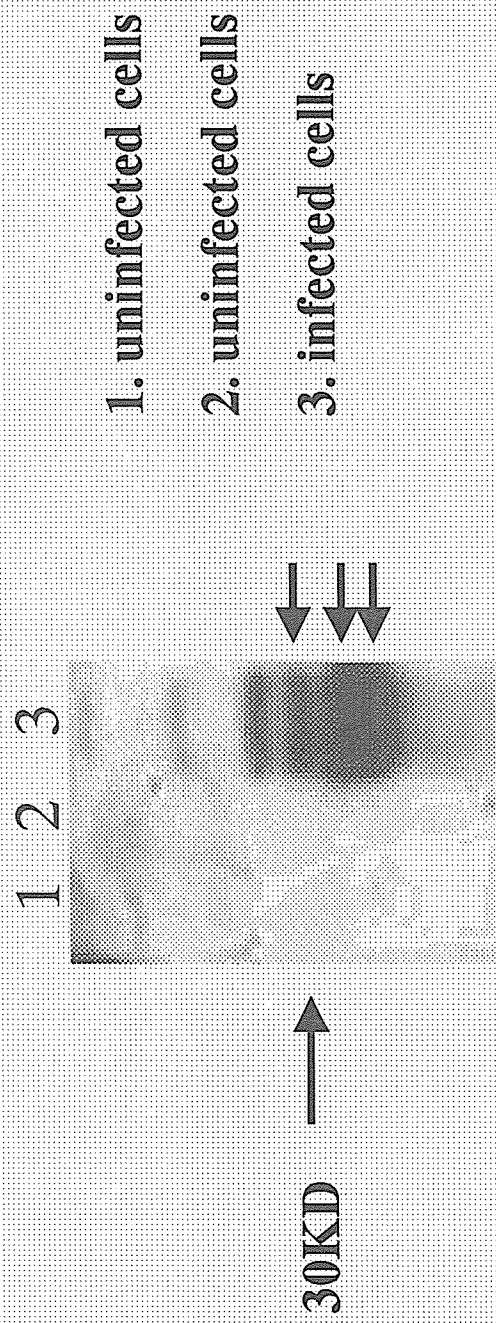


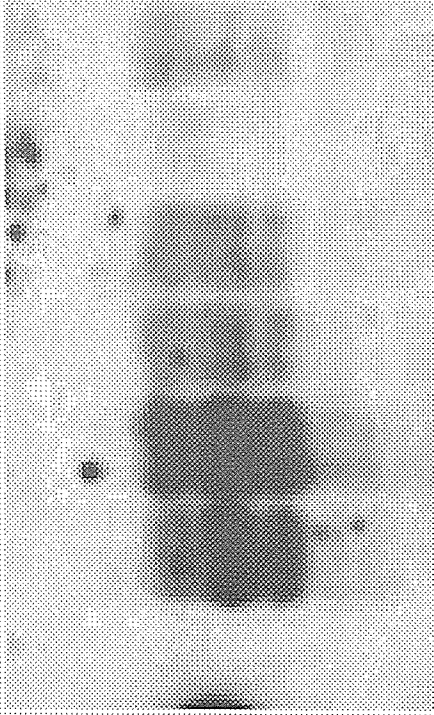
图1

Presence of PrPres in supernatant from infected cells with BSE brain homogenate

1 2 3 4 5 6 7

1. Negative
2. X 1
3. X 10¹
4. X 10²
5. X 10³
6. X 10⁴
7. X 10⁵

(4 weeks after infection)



30KD →

2

BSE *in vitro* 検出系としての PMCA 法の検討

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

英国において輸血を介して vCJD が感染した可能性のある 3 例目の症例が報告され、血液製剤の安全性を確保するために病原性プリオン(PrP^{Res})の除去・不活化法の開発と評価法の確立は社会的に緊急の課題である。効率的な技術開発には迅速で高感度な PrP^{Res} の評価系が必要である。しかし、現在のところプリオンの感染性の評価は動物の脳内接種によって行われており、結果を得るのに半年以上を要する。また、PrP^{Res} の *in vitro* 高感度検出系として PMCA 法(Protein Misfolding Cyclic Amplification)が考案されたが、BSE や vCJD で成功した報告はない。そこで、本研究では BSE の高感度で迅速な *in vitro* 検出系の確立を目標として、BSE 感染牛脳乳剤及び BSE を感染させたヒト glioblastoma 由来培養細胞株を材料に用いて PMCA 法による検出を試みた。PMCA 法によって PrP^{Res} を検出できなかったため、方法を検討中である。

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。さらに、英国において2006年に輸血と関連した vCJD の3例目の症例が報告され、輸血による vCJD の感染が一層危惧されるようになったことから、血液製剤の安全性を確保するためにリスク評価法の確立と病原性プリオン (PrP^{Res})の除去・不活化法の開発は緊急の課題である。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、現在のところプリオン感染性の評価は動物の脳内接種によって行われており、結果を得るのに半年以上を要する。また、PrP^{Res} の *in vitro* 高感度検出系としてハムスターに馴化した 263 株 (スクレイピー由来) を用いた PMCA 法(Protein

Misfolding Cyclic Amplification)が考案されたが、BSE や vCJD では成功した報告はない。そこで、本研究では BSE の高感度で迅速な *in vitro* 検出系の確立を目標として、BSE 感染牛脳乳剤及び BSE を感染させた人グリオーマ由来の培養細胞を材料に用いて PMCA 法による検出を試みた。

B. 研究方法

1) BSE 感染牛の脳乳剤を用いた PMCA :

感染牛の脳乳剤(和歌山株)を試料とし、緩衝液(下記の conversion 緩衝液から Complete Protease Inhibitor を除いたもの)で適宜希釈したものを検体とした。Sotoらの方法に従って次のとおり基質を正常牛用時調製した。マイナス 20℃で冷凍保存した正常な牛の視床 1g に対して conversion 緩衝液(PBS containing 150mM NaCl, 1.0% Triton X100, 4mM EDTA and 1.25 x Complete Protease Inhibitor Mixture from Roche) 1ml を加えてホモジェナイザーで破碎し、低速遠心(1500rpm, 1min)した上清を基質とした。超音波装置を用いて

PMCA 反応を行った。まず、専用のプラスチック試験管に基質 200 μ l と検体 50 μ l とを入れて混合し、37 $^{\circ}$ C 温水中で震盪しながら保温し 1 時間ごとに 1 秒間超音波パルス を 5 回行い、これを 20 サイクル繰り返して 1st PMCA を行った。1st PMCA の反応液 50 μ l を新たに調製した基質 200 μ l に加えて同様に 20 サイクルの 2nd PMCA を行った。2nd PMCA 反応液を次の手順で Proteinase K (PK) 処理した。2nd PMCA 反応液 250 μ l に detergent 緩衝液 (Twittergent3-14, 1% Sarkosyl, 100mM NaCl, 50mM Tris-HCl (pH7.5)) 250 μ l を加えて Collagenase 処理 (0.5 μ g/ml、37 $^{\circ}$ C、30min) した後、PK 処理 (50 μ g/ml 又は 100 μ g/ml で 37 $^{\circ}$ C、60min)、2mM Pefablock 存在下で DNase 処理 (40 μ g/ml、室温 5min) , Butanol:Methanol (5:1) 混液 250 μ l と混合して遠心 (15,000 rpm, 10min, 20 $^{\circ}$ C)、沈殿を乾燥させて SDS アクリルアミド・ゲル電気泳動 sample buffer に溶解、100 μ g 5min 加熱してウェスタンブロッティングの試料とした。

2) BSE 感染ヒト glioblastoma 由来細胞株を用いた PMCA :

ヒト glioblastoma 由来細胞株に BSE 感染牛の脳乳剤 (和歌山株) を感染させてから 5 ヶ月以上継代培養した細胞を -80 $^{\circ}$ C で凍結保存したものを試料とした (主任研究者岡田義昭博士から提供)。室温で融解した試料 (2.5 \times 10² cells) を緩衝液 (conversion 緩衝液から Complete Protease Inhibitor を除いたもの) 250 μ l に溶かし、低速遠心 (1500rpm, 1min) した上清を適宜希釈して検体とした。基質は次の方法で用時調製した。マイナス 80 度で保存した非感染培養細胞 (2.5 \times 10² cells/tube) を conversion 緩衝液 200 μ l に溶かして調製した lysate を基質とした。PMCA 専用のプラスチック試験管に基質 200 μ l と検体 50 μ l とを入れて混合し、脳乳剤と同様に 1st PMCA に引き続いて 2nd PMCA を行った。2nd PMCA 反応液 200 μ l に等量の detergent 緩衝液を加え、Collagenase 処理を省略した以外は同様に処理して PrP^{Res} を調製し、Western blotting 法で検出した。

3) 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 (パジェル 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、Starting Blocking Buffer (PIERCE) で一晚ブロッキングを行った。PrP^{Res} の検出には一次抗体に抗ヒトプリオン-ウサギポリクローナル抗体 (FL-253) を 2 次抗体には HRP 標識抗ウサギ IgY ヤギ抗体を用い、ECL Plus ウェスタンブロッティング検出システム (アマシヤム) を用いた化学発光を ECL Hypermax film (アマシヤム) 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 感染牛の脳乳剤 (和歌山株) を用いた PMCA :

BSE 感染牛の脳乳剤を 10⁻²、10⁻³ および 10⁻⁴ 希釈した検体の 2nd PMCA 産物を異なる PK 濃度 (100 および 50 μ g/ml) で処理し、一次抗体に抗ヒトプリオン-ウサギポリクローナル抗体 (FL-253) を 2 次抗体には HRP 標識抗ウサギ IgY ヤギ抗体を用いたウェスタンブロッティング法で PrP^{Res} の検出を試みたがバンドは認められなかった。

2) BSE 感染ヒト glioblastoma 由来細胞株を用いた PMCA :

BSE 感染ヒト glioblastoma 由来細胞株を 10⁻¹、10⁻² および 10⁻³ 希釈した検体の 2nd PMCA 産物を異なる PK 濃度 (10 および 20 μ g/ml) で処理し、一次抗体に抗ヒトプリオン-ウサギポリクローナル抗体 (FL-253) を 2 次抗体には HRP 標識抗ウサギ IgY ヤギ抗体を用いたウェスタンブロッティング法で PrP^{Res} の検出を試みたが、特定のバンドの増幅は認められなかった。

D. 考察

BSE 感染牛脳乳剤及び BSE 感染ヒト glioblastoma 由来培養細胞株のいずれも PMCA 法による PrP^{Res} の増幅を確認できなかった。これは今回試みた条件では増幅されていないためとも考えられるが、PrP^{Res}

の性質は株ごとに異なるので、PMCA 法で増幅された BSE 由来の PrP^{Res} の PK 耐性が低いために検出できなかった可能性もある。また、検出系には BSE 感染ヒト glioblastoma 由来細胞株の PrP^{Res} 検出で良好な結果が出ている抗体の組み合わせを用いたが、陽性コントロールに用いた牛組換えプリオンタンパクのバンドが薄いことから、BSE に適した抗体の組み合わせを検討する必要がある。BSE の *in vitro* 検出系は未だ報告がないがこれが可能になれば、血液製剤の除去・不活化法の開発や評価において有用である。

E. 結論

本研究において BSE の高感度で迅速な *in vitro* 検出系の確立を目標として、BSE 感染牛脳乳剤及び BSE を感染させたヒト glioblastoma 由来培養細胞株を材料に用いて PMCA 法 (Protein Misfolding Cyclic Amplification) による検出を試みたが、PrP^{Res} を検出できなかった。PMCA 法の条件を検討中である。

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

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

動物細胞株を用いた異常プリオン感染系の開発

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

研究要旨

この班では主に *in vitro* での感染系を確立し、検出法の開発や除去法の評価を目指しているが、病原性や感染性の有無は *in vivo* の実験が必要である。プリオン感染には種の壁が存在するため、マウスに接種して発症までの時間を短縮し、さらに発症頻度を高めるためにも *in vitro* でのマウスやラット由来細胞株を用いた感染系の作製は重要である。BSE 感染由来の脳乳剤をマウスとラット由来の細胞株に感染させ、異常プリオンの検出を試みたが、明確な感染成立は認められなかった。また、PMCA (Protein misfolding cyclic amplification) 法による異常プリオンの増幅法を行ったが増幅は認められなかった。

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となっている。この班では異常プリオンの *in vitro* 感染系を開発し、動物を使用した *in vivo* 実験よりも短時間で多数の検体を評価できるようにすることを目的としているが、病原性の有無や血液中での異常プリオン感染細胞の同定等の解析に関しては、マウス等の小動物を使用する必要がある。プリオン感染には種の壁が存在するため、ウシやヒト由来の異常プリオンタンパクを直接脳内に接種しても発症まで長時間を要する。そこ

で、マウスやラット由来の細胞株を用いた *in vitro* 感染系を作製すれば種の壁が無くなるため、短期間での発症が期待できる。また、*in vitro* で増える異常プリオンはマウスやラットのプリオンため、取り扱う研究者のバイオセーフティー上から好都合である。

B. 研究方法

(1) 感染に用いた細胞株、感染方法

検討した細胞株は、マウス由来では AtT-20 (下垂体腫瘍) K T 5 細胞 (アストロサイトーマ)、ラット由来の細胞株は RNB (アストロサイト)、RCR (アストロサイト様細胞) GH1 (下

垂体腫瘍)、GH3(下垂体腫瘍)を用いた。

1×10^5 個の細胞を 24 穴プレートに播き、細胞が付着後、培養液を $100 \mu\text{L}$ 残るように取り除き、30 倍に希釈した $100 \mu\text{L}$ の BSE 感染ウシ脳乳剤 (10%の脳乳剤 $3.3 \mu\text{L}$ 相当) を添加して継代した。経時的に細胞を採取し、異常プリオンの抽出まで -80°C に保存した。

(2) 異常プリオンの検出法

2.5×10^6 個の細胞を 0.35mL の Lysis buffer (150mM NaCl、 0.5% triton X-100、 0.5% sodium deoxycholate、 50mM Tris-HCl ($\text{pH}7.5$)) に溶解後、 1mg 1 分間の遠心を行い、上清を 0.25mL 集める。Proteinase K を最終濃度 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ になるように添加し、 37°C 1 時間反応させた。 $10 \mu\text{l}$ の pefablock を加えて PK の反応を止め、6 倍量のメタノールを添加し、 4°C にて 3300g 、30 分の遠心を行った。沈殿は尿素入りのローディングバッファーに溶解し、ウエスタンブロットを行った。異常プリオンの検出は 1 次抗体としてマウス単クローン抗体 SAF70、又はウサギ抗ヒトプリオン抗体を用い、2 次抗体は各々 HRP 標識のヤギ抗マウス IgG、ヤギ抗ウサギ IgG を用いた化学発光法によって行った。

(3) PMCA 法による異常プリオンの増幅の検討

Soto らの方法に従って次のとおり行った。 -80°C で冷凍保存した $2.5 \times$

10^6 個の非感染 RCR 細胞を conversion 緩衝液 (最終濃度 150mM NaCl, 1.0% Triton X100, 4mM EDTA、Protease Inhibitor を含む PBS 溶液) $200 \mu\text{L}$ を加えて溶解し、PMCA の基質とした。(1) で感染させた RCR 細胞を $250 \mu\text{L}$ の PMCA の conversion 緩衝液に溶解し、さらに conversion 緩衝液を用いて感染細胞の溶解液を 10 倍、100 倍、1000 倍に希釈した。 $200 \mu\text{L}$ 基質に希釈した感染細胞の溶解液を $50 \mu\text{L}$ 加えて超音波装置を用いて PMCA 反応を行った。PMCA の条件は、1 秒間の超音波パルス を 5 回行い 1 時間インキュベートを 1 サイクルとして 20 サイクル繰り返した。反応後の増幅産物を $50 \mu\text{L}$ 取り、新たに調整した RCR 細胞株の基質に添加して 40 サイクルの PMCA を行った。検出は (2) の方法に従って行った。

C. 研究結果

BSE の脳乳剤に感染後、各細胞株に馴化した異常プリオンが増殖してくると考え、感染後 20 週以上経た検体を集中して検索した。WB 法にて 30KD にバンドが感染細胞に認められることもあったが、時に非感染細胞からも検出されることがあり、脳で検出されるような $25\sim 30\text{KD}$ の 3 本のバンドは検出されなかった。また、PMCA 法にても異常プリオンの増幅は認められなかった。

D. 考察

細胞株から異常プリオンが検出されなかった原因として、感染が成立

しなかった可能性の他に、ウシ異常プリオンが各細胞株に馴化してから検出できるまでに長時間を要するものと考えていたこともある。今回は、感染後 20 週以上経た検体を検索したので感染後早期の検体も調べる必要がある。また、検出に用いた抗体も単クローン抗体のため感度以下の場合も考えられる。ウサギポリクロ抗体はヒトプリオンで免疫したものだがマウスプリオンも検出可能ということで使用したが感度は不明である。また、今回 Proteinase K は最終濃度 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ になるように添加して抽出を行ったが、至適濃度を検討する必要がある。特に、PMCA 法によって増幅されてくるプリオンは感染細胞内で産生される異常プリオンと同一の PK 抵抗性を持つのか不明であり、PK 濃度を検討する必要がある。また、PMCA 最終後、直ぐに抽出、又は -80°C に保存したが、 37°C で完全な異常プリオンを形成するまでインキュベートする必要性がある可能性もある。

E. 結論

マウスとラットの神経系由来の細胞株を用いて BSE 由来のプリオンを感染させたが、明らかな感染は検出できなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Iwata N., Sato Y., Higuchi Y., Nohtomi K., Nagata N., Hasegawa H., Tobiume M., Nakamura Y., Hagiwara K., Furuoka H., Horiuchi M., Yamakawa Y., Sata T.
Distribution of PrPSc in Cattle with Bovine Spongiform Encephalopathy Slaughtered at Abattoirs in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 2006 Apr;59(2):100-7.

1. 2. 学会発表

1. なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

別紙5

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト（参考）

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
なし					