

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 19 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 岡田 義昭

平成 20 (2008) 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-P4
	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	P5-P11
	岡田 義昭	
	2. ヒト白血病由来細胞株を用いた in vitro プリオン検出系の検討	P12-P14
	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	P15-P19
	長谷川 秀樹	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	P20

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

1. BSE 脳乳剤を用いて感染させたヒトグリオーマ細胞株は、感染から異常プリオン（PrPres）がウエスタンブロット（以下 WB）法にて検出できるまで約 20 週間を要した。WB によって約 8 週間検出可能であったが、継代を経ると検出されなくなった。
2. 凍結保存した異常プリオン感染細胞は融解後、再度培養しても PrPres を産生した。
3. ヒト白血病細胞株 CMK85-L は感染細胞由来の培養上清によって感染し、陽性シグナルは 5 週目にピークとなった。
4. ヒト神経系細胞株や血小板を基質にして PMCA (protein misfolding Cyclic amplification) 法を検討したが、プリオンの増幅はできなかった。
5. BSE 由来プリオンに感染したヒト細胞株の培養上清中での異常プリオンの性状を解析し、抗プリオン抗体によって感染価は減少しないこと、及び界面活性剤処理後に抗プリオン抗体を作用すると感染価は著明に減少することから上清中の異常プリオンは膜に包まれた粒子中に存在している可能性が示された。
6. BSE 感染ヒトグリオーマ細胞、及びその培養上清を用いて感染させたマウス neuroblastoma 由来の N2a 細胞をマウスの脳内及び腹腔内に接種し、病原性を検討した。接種 1 ヶ月後では脳内及び脾臓内にプリオンの蓄積は確認できなかった。

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

ング法の開発や除去法の開発が急務となったが、いまだ有効な方法は報告されていない。英国において、最近、数年間は 5 人/年の vCJD 発症例が報告され、発症数は減少しているものの将来的には不明な点が多い。スクリーニング法や除去法を開発する上で血液中に異常プリオンがどのように性状で存在しているのか、明らかにする必要があ

A. 研究目的

vCJD が血液を介して感染することが報告され、異常プリオンに対するスクリーニ

る。そのためには、感染細胞からどのように異常プリオンが産生され、血液中に入るのか解析することが重要である。我々の班では BSE 由来の異常プリオンの *in vitro* 感染系を確立することを目指した。昨年度までの研究によって、BSE 由来異常プリオンに感染したヒト神経系や血液由来の細胞株から感染性を有する異常プリオンが培養液中に産生されることを明らかにした。しかも、僅か1ヶ月で結果が得られることも明らかにした。今年度は、培養液中に存在する異常プリオンの性状を詳細に解析した。さらに PMCA (Protein Misfolding Cyclic Amplification) 法による異常プリオンの増幅法も検討した。また、我々が用いている異常プリオンが病原性を有するか確認するためにマウスの脳内、又は腹腔に投与して感染の有無を病理組織的に解析した。

B. 研究方法と結果

(1) ヒト神経系細胞株の感染細胞の作製

ヒトグリオマ由来の細胞株に我が国で診断された BSE 感染牛の脳乳剤を添加し、感染させた。経時的に感染細胞を集め、感染成立の有無をウエスタンブロット法 (WB) 法にて解析した。

感染 20 週前後から PrPres 陽性となり、約 8 週間検出された。その後、WB 法では検出されなくなった。

感染細胞を凍結して保存し、必要に応じて解凍し再度 PrPres が作られるか検討したが、凍結保存しても産生されることを確

認した。

(2) ヒト白血病細胞株の感染細胞の作製

ヒト白血病細胞株 CMK85-L に (1) で感染が確認させた培養上清 (昨年度の報告で 10^6 /mL の感染価を有する) を添加し、経時的にサンプリングし WB 法によって PrPres の有無を検索した。感染 4 週間から検出できるようになり、5 週目に陽性シグナルはピークとなり、以後減弱していった。

(3) 感染細胞上清中に存在する異常プリオンの性状解析

抗プリオン抗体 3F4 をつけた磁気ビーズを培養上清 (昨年度の報告で 10^6 /mL の感染価を有する) に添加し、3F4 と結合する成分を除去した培養上清の感染力価を求めた。また、最終濃度 0.5% になるように培養上清に Triton X-100 を添加し、室温で 30 分間反応後、感染力価を測定した。

さらに、Triton X-100 処理した培養上清に 3F4 をつけた磁気ビーズを添加し、抗体に結合する成分を除去した培養上清の感染力価を測定した。抗プリオン抗体及び Triton X-100 処理によって感染価と陽性シグナルが増強した。しかし、Triton X-100 処理後に抗プリオン抗体を作用させると感染価は激減した。

(4) PMCA による異常プリオンの増幅

ヒトグリオブラストーマとヒト血小板を夫々 conversion 緩衝液に溶解し、2 で得た感染 5 週後の CMK85-L 細胞上清を添加し、20 サイクルの PMCA を行ない、1 部の PMCA

産物を取り、さらに 20 サイクルの PMCA を実施した。PK 処理し、PrPres の増幅の有無を WB 法にて解析した。特異的な PrPres の増幅は得られなかった。

(5) 二次感染細胞から産生される異常プリオンの伝達性の解析

1 で得られたヒト感染細胞株（一次感染細胞）から産生される異常プリオンに感染した細胞（二次感染細胞）が異常プリオンを産生するのか検討した。二次感染 4 週後の上清、または Triton X-100 処理した上清を非感染細胞に添加した。感染 5 週後の解析では Triton X-100 処理した培養上清を添加した細胞から PrPres が検出された。

(6) マウスでの病原性の解析

1 で得られた BSE プリオンに感染したヒト細胞株（感染後 19 週）とヒト感染細胞から調製した培養上清を用いて感染させたマウス neuroblastoma 由来 N2a-#34（感染 10 週目）を脳内 ($3 \times 10^6 / 20 \mu\text{L}$)、あるいは腹腔 ($3 \times 10^6 / 200 \mu\text{L}$) に接種した。接種 1 ヶ月後に剖検し、脳及び脾臓での PrPres の蓄積を免疫組織化学的に検討した。脳及び脾臓から PrPres の蓄積は認められなかった。今後、病原性を確認するため最長 2 年間の経過観察を予定している。

D. 考察

一次感染細胞では、感染から PrPres が検出までに約 20 週間を要した。これは、ウシとヒトの「種の壁」が存在するために

ヒトの細胞株に馴化した異常プリオンがヒト細胞内で検出可能なまでに増殖するのに要する時間と考えられた。そのため、一次感染細胞から産生された異常プリオンはヒト由来のため「種の壁」がなく、僅か感染 4 週で検出できるまでに増殖するものと考えられた。興味深いことに、WB 法で陽性所見が検出できるのは一過性で、継代を重ねると検出されなくなった。

また、感染細胞由来の上清を用いて上清中に存在する異常プリオンの存在様式について検討したところ、抗プリオン抗体を添加した上清の感染価は減少するだろうとの予想に反し、逆に感染性は増加し、陽性シグナルもコントロールに比べ増強した。Triton X-100 処理によって可溶化した状態で、抗プリオン抗体を反応させると陽性バンドは検出できなかった。以上から、感染細胞から産生される異常プリオンは膜に包まれた粒子状の性状で存在すると考えられた。血液中での存在様式が不明であったことから、これまでのプリオン除去の評価は脳乳剤で実施されていた。脳乳剤の場合は、界面活性化剤等の処理がされており、異常プリオンが露出している可能性がある。異常プリオンに対するリガンドを用いたプリオン除去法では、脳乳剤に対しては有効かもしれないが、血液では全く効果が期待できない可能性もある。この意味で、我々の培養液中に異常プリオンが産生される系は血液からの除去法開発に貢献すると考えている。また、ヒト白血病細胞

株 CMK85-L も感染することから、感染 CMK の上清を詳細に解析すれば、神経系の細胞から産生される異常プリオンとの相違を明らかにすることも期待できる。

また、一連の Triton X-100 を用いた解析から Triton X-100 処理によって感染価が増加することを明らかにした。これを用いて我々は、二次感染細胞の培養上清から異常プリオンが産生されることを確認できた。残念ながら PMCA によってヒトの異常プリオンは増幅できなかったが、Triton X-100 処理した検体を我々の培養系に添加することで、異常プリオンの高感度検出系になった。

E. 結論

BSE 感染ウシ由来の脳乳剤を用いてヒト感染細胞株を作製し、培養液中に産生される異常プリオンを In vitro の感染系で検出できるシステムを確立した。これを応用し、培養上清中に存在する異常プリオンの性状を解析したところ、膜に包まれた粒子状の中に存在することが示された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 嶋崎 典子、岡田義昭、米山 徹夫：医薬品からの感染が危惧されるウイルス疾患と安全対策、月刊薬事、90 巻、No .11、1691-1697、2007 年

- 2) 種市 麻衣子、岡田 義昭、上村 晃一郎、他：血液凝固第 9 因子国内標準品の力価測定、日本輸血細胞治療学会誌、第 54 巻、第 1 号、43-47、2008 年

2. 学会発表

- 1) 岡田義昭：血液製剤の安全性向上目指したプリオン検出法の研究（教育講演）、第 55 回日本輸血学会、名古屋、2007 年
- 2) Y.Okada, K., Umemori, and K. Yamaguchi: Preparation of plasmids containing HBV-fullgenome of genotype A to H and trial of HBV inactivation method. 20th SoGAT international working group meeting. Warsaw. 2007.
- 3) 岡田 義昭、水沢 左衛子：BSE 由来プリオンの in vitro 感染系の確立、プリオンシンポジウム 2007、津南、2007 年
- 4) 岡田 義昭、水沢 左衛子、梅森 清子、山口一成：BSE 由来プリオンの in vitro 感染系の確立とその応用、第 55 回日本ウイルス学会、札幌、2007 年
- 5) 梅森 清子、岡田 義昭、水沢 左衛子、嶋崎 典子、米山 徹夫、山口一成：血液製剤の安全性向上をめざした新規ウイルス不活化法の開発、第 55 回日本ウイルス学会、札幌、2007 年
- 6) 嶋崎 典子、清原 知子、戸塚 敦子、梅森 清子、岡田 義昭、米山 徹夫：加熱および加圧による A 型肝炎ウイルスの不活化法—株間の差異の検討—、第 55 回日本ウイルス学会、札幌、2007 年

分担研究報告書

異常プリオンの *in vitro* 感染系の開発と性状解析

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 昨年度に感染細胞は、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を確認したので、今年度は培養液中に存在している異常プリオンの性状について解析した。抗プリオン抗体をつけた磁気ビーズを上清に添加し、抗体に結合する抗原を除去したところ、予想に反し培養液の感染価は減少しなかった。また、Triton X-100 を上清に添加することで感染価が増加した。Triton X-100 処理後に抗プリオン抗体がついたビーズを添加すると上清中の感染価は著明に減少した。以上から、感染細胞から産生される異常プリオンは膜に包まれて上清中に存在することが示唆された。また、培養上清によって感染した細胞も感染性の異常プリオンを産生することが確認できた。これらの結果はプリオン除去法の実用化に貢献するものと考えられた。

A. 研究目的

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一定期間滞在歴を有する供血者からの献血を制限しているが、供血者の減少を考えると血液製剤の安全性向上のためには、プリオン病に対するスクリーニング法の実用化や除去法の実用化が必要である。そのためには、血液中に異常プリオンがどのように性状で存在しているのか明らかにする必要がある。また、現行のプリオン病の研究は、*in vivo* 実験が主に行なわれている。そのため、結果を得るまでに半年から2年間を要し、しかも数多くの動物が評価に必要である。また、脳乳剤に存在する異常プリオンの性状が血液中に存在するプリオンと同じであるという保

証はない。さらに、スクレーパ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パーと異なりリンパ組織に異常プリオンが蓄積することから、血液中での動態がスクレーパーと異なる可能性がある。一方で *in vitro* で増殖可能なプリオン株は少なく、BSE由来の株の報告はない。以上のことから我々は、BSE由来の異常プリオンの *in vitro* 感染系を確立することを目指した。昨年度までの研究によって、BSE由来異常プリオンがヒト及びマウスの細胞株に感染し、ヒト感染細胞からは感染性を有する異常プリオンが産生されることを明らかにした。しかも、僅か1ヶ月で結果が得られることも明らかにした。今年度は、培養液中に存在す

る異常プリオンの性状を詳細に解析し、除去法に有用な知見を得ること、及び高感度検出系の確立を目指した。

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 0.5 mL の Lysis buffer (150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)) に溶解後、1 万 g 1 分間の遠心によって核成分を除いた上清を得た。Proteinase K (PK) を最終濃度 20 μg/mL になるように添加し、37°C 45 分間反応させた。10 μL の pepablock 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に溶解し、ウエスタンブロット (以下 WB) 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) 感染細胞の作製

ヒトグリオマ由来の細胞株に我が国で診断された BSE 感染牛の脳乳剤を添加し、感染させた。経時的に感染細胞を集め、感染成立の有無を (1) の方法で異常プリオンを抽出し、WB 法にて検出を行なった。

(3) 異常プリオンを含む培養上清の調整

持続感染が成立した細胞株を牛の脳乳剤の混入を否定するために 6 ヶ月以上継代し、その培養上清を 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約 50 mL 調製し、以後の感染実験に用いた。

(4) 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。培養上清を種々の濃度に希釈し、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/週の頻度で継代した。感染の有無は、感染 4~5 週後の細胞を 10 cm ディッシュで増やし、コンフルレントになった時点で集め、(1) の方法によって検出した。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ー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。

(5) 感染細胞上清中に存在する異常プリオンの性状解析

抗マウス IgG 抗体を介して抗プリオン抗体 3F4 を磁気ビーズに付け、反応後 3 回洗うことによって磁気ビーズに結合しない 3F4 抗体を除いた。(3) で集めた細胞上清 1 mL に 3F4 が付いた磁気ビーズを添加し、4°C で 1 時間回転させながら反応させた。磁石でビーズを除いた上清を希釈し、非感染細胞に各 100 μL ずつ添加し、

(4) の力価測定法に従って感染力価を求測定した (プリオン抗体処理)。

また、最終濃度 0.5% になるように感染細胞由来培養液に Triton X-100 を添加し、室温で 30 分間反応させた。反応後、上清を希釈し、非感染細胞に各 100 μ L ずつ添加し、(4) の力価測定法に従って感染力価を求めた (Triton X 処理)。

さらに、TritonX-100 処理した感染細胞由来の培養液に 3F4 を付けた磁気ビーズを添加し、1 時間反応させた。反応後磁気ビーズを除いた培養上清を希釈し、非感染細胞に各 100 μ L ずつ添加し、(4) の力価測定法に従って感染力価を求めた (Triton-X 処理+プリオン抗体処理)。

(6) 二次感染細胞から産生される異常プリオンの伝達性の解析

BSE 脳乳剤によって感染したヒト細胞株 (一次感染細胞) から産生される異常プリオンを用いて感染させた細胞 (二次感染細胞) の感染 4 週後の上清を (3) に従って調製し、感染性を検討した。感染性を増強するために Triton-X 処理した培養液も同様に感染性を検討した。

C. 研究結果

(1) 感染細胞の作製

昨年度、WB 法によって PrPres が検出された細胞を長時間継代したところ、感染 20 週前後から PrPres 陽性となり、約 8 週間検出された。その後、WB 法では検出されなくなった。また、9 週から PrPres 陽

性となる細胞株も存在したが、7 週後には検出されなくなった。

(2) 感染細胞上清中に存在する異常プリオンの性状解析

(3) に従って調製した BSE 感染細胞株の培養上清に抗プリオン抗体が付いた磁気ビーズを添加し、感染価を測定したところ、感染価は予想に反し減少しなかった。また、Triton-X 処理によって感染価の増加と陽性バンドのシグナルの増強が認められた。さらに、Triton-X 処理後にプリオン抗体が付いた磁気ビーズを添加したところ、ウエスタンブロット上、陽性バンドは消失した (図 1)。

(2) 二次感染細胞から産生される異常プリオンの伝達性の解析

感染 4 週後の二次感染細胞の培養上清を非感染細胞に感染させたところ、Triton X-100 処理した上清を感染させた細胞から陽性のシグナルが確認され、二次感染細胞からも感染性を持つ異常プリオンが上清中に産生されていることが明らかとなった。

D. 考察

昨年度の培養液を用いた感染実験によって感染後 4~5 週をピークに陽性バンドが減弱することが判明したが、ウシの脳乳剤で感染させた一次感染細胞も同様に経時的に追ったところ、約 8 週間 WB が陽性になり、以後検出されなくなった。これは、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。また、一次感染細胞では、感染から PrPres が検出までに約 20 週間を要するのは、ウシとヒトの種の壁が存在するためにヒトの細胞株に馴化したプリオンがヒト細胞内で検出可能なまでに増殖するのに要する時間と考えられた。そのため、一次感染細胞から産生された異常プリオンはヒト由来のため「種の壁」がなく、僅か感染 4 週で検出できるまでに増殖するものと考えられた。

また、感染細胞由来の上清を用いて上清中に存在する異常プリオンの存在様式について検討したところ、抗プリオン抗体を添加した上清の感染価は減少するだろうとの予想に反し、逆に感染性は増加し、陽性シグナルもコントロールに比べ増強した。反復した実験でも同様な結果が得られたことから、図 2 に示した仮説に従って Triton X-100 処理によって可溶化した状態で、抗プリオン抗体を反応させたところ、感染後 4 週では陽性バンドは検出できなかった (図 1)。これは、感染細胞から培養上清中に産生される異常プリオンは何らかの膜に包まれて存在していることを示し、抗プリオン抗体がついたビーズを用いても除去できなかった現象を説明できる。また、包まれている膜を破壊すると異常プリオンが露出すると考えられ、Triton X-100 処理後、抗プリオン抗体を

反応させると感染性が著名に減少した実験結果と一致した。以上から、感染細胞から産生される異常プリオンは膜に包まれた粒子状の性状で存在するものと推定できた。

二次感染細胞の培養上清からも伝達性の異常プリオンが検出できた意義は大きい。二次感染細胞から産生されない場合は、除去等の評価に培養上清を用いる場合に必要時にウシの脳乳剤を感染させて一次感染細胞を作製しなければならないからである。我々は一次感染細胞を凍結して保存し、必要に応じて解凍し、再度 PrPres が作られるか検討したが、凍結保存しても産生されることを確認した。これにより、一度感染させれば評価に必要な培養上清を充分量確保できることが確認できた。

E. 結論

培養上清中に存在する異常プリオンの性状を解析し、異常プリオンは膜に包まれた粒子状の中に存在することが示された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 嶋崎 典子、岡田義昭、米山 徹夫：医薬品からの感染が危惧されるウイルス疾患と安全対策、月刊薬事、90 巻、No.11、1691-1697、2007 年

2) 種市 麻衣子、岡田 義昭、上村 晃一郎、他：血液凝固第9因子国内標準品の力価測定、日本輸血細胞治療学会誌、第54巻、第1号、43-47、2008年

2. 学会発表

1) 岡田義昭：血液製剤の安全性向上目指したプリオン検出法の研究（教育講演）、第55回日本輸血学会、名古屋、2007年

2) Y.Okada, K.,Umemori, and K.Yamaguchi:Preparation of plasmids containing HBv-fullgenome of genotype A to H and trial of HBV inactivation method. 20th SoGAT international working group meeting.Warsaw. 2007.

3) 岡田 義昭、水沢 左衛子：BSE由来プリオンの *in vitro* 感染系の確立、プリオンシンポジウム2007、津南、2007年

4) 岡田 義昭、水沢 左衛子、梅森 清子、山口一成：BSE由来プリオンの *in vitro* 感染系の確立とその応用、第55回日本ウイルス学会、札幌、2007年

5) 梅森 清子、岡田 義昭、水沢 左衛子、嶋崎 典子、米山 徹夫、山口一成：血液製剤の安全性向上をめざした新規ウイルス不活化法の開発、第55回日本ウイルス学会、札幌、2007年

6) 嶋崎 典子、清原 知子、戸塚 敦子、梅森 清子、岡田 義昭、米山 徹夫：加熱および加圧によるA型肝炎ウイルスの不活化法—株間の差異の検討—、第55回日本ウイルス学会、札幌、2007年

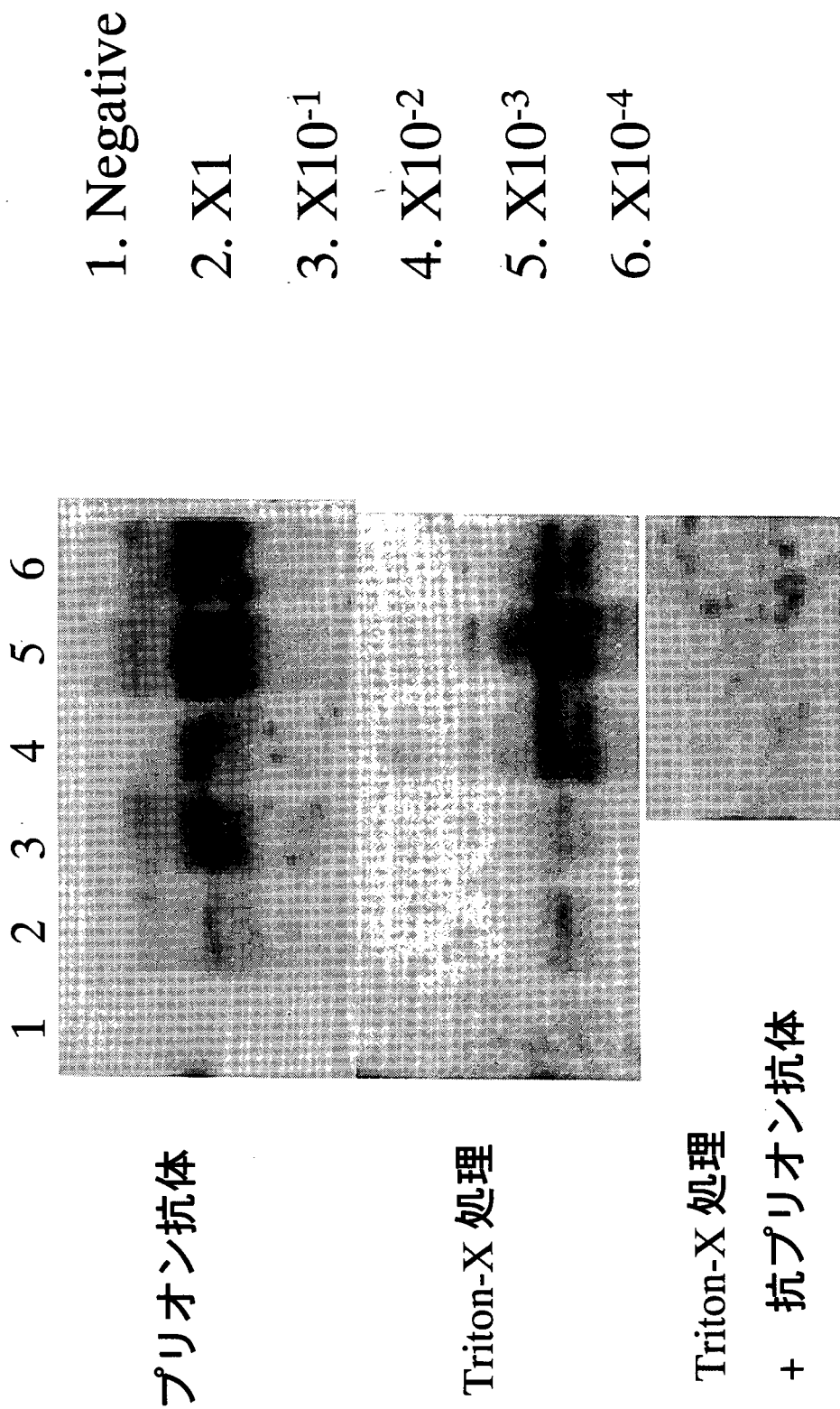
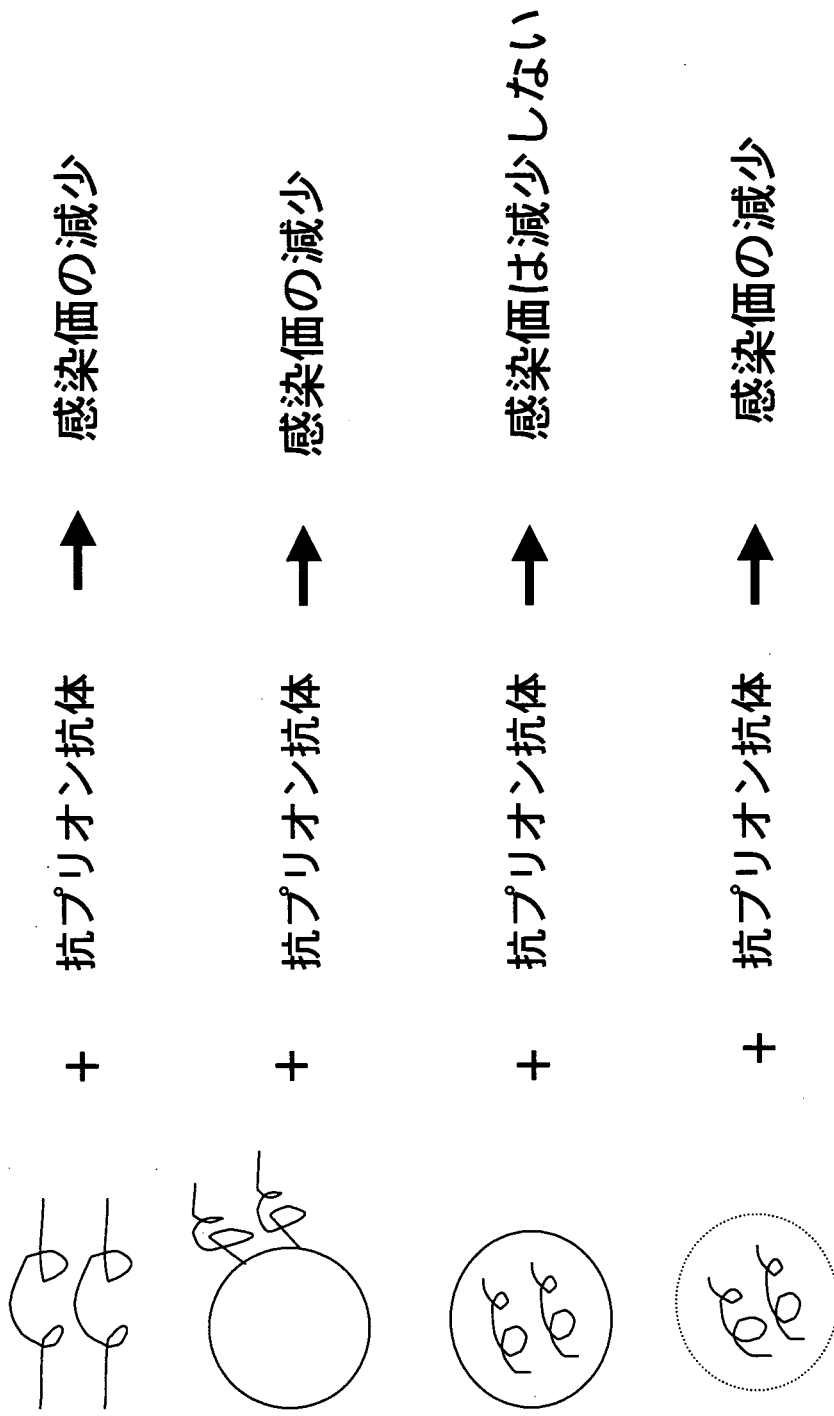


図1 培養液中に存在するPrPresの様式



Triton X-100処理

図2 上清中の異常プリオンの性状解析

分担研究報告書

ヒト白血病由来細胞株を用いた *in vitro* プリオン検出系の検討

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

英国で輸血を介しての vCJD 感染が疑われる症例が 2004 年に報告され、また英国滞在歴を有する日本人男性が 2005 年に 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、ヒト血液中の PrP^{Sc} の高感度で迅速な *in vitro* 検出系の確立を目的として、ヒト血球系培養細胞 CMK85-L を用いて PMCA 法(Protein Misfolding Cyclic Amplification)による PrP^{Sc} の検出を検討した。

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 年以来英国で輸血を介しての vCJD 感染が疑われる 3 つの症例が報告されている。一方、わが国においては 2005 年に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。感染動物の血液を用いる場合は血中に存在する異常プリオンの量が非常に少ないため、現在のところ感染性の評価は動物の脳内接種によっておこなわれており、結果を得るのに半年以上を要する。

分担研究者は血液中での PrP^{Sc} の存在様式を反映した *in vitro* の実験系の確立を目的として、ヒト血球系細胞株を用いた *in vitro* プリオン感染系について検討し、巨核球の特徴を有するヒト白血病由来細胞株 CMK85 が BSE 感染牛の脳乳剤及び 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を見出している。

本研究においてはヒト血液中の PrP^{Sc} の高感度で迅速な *in vitro* 検出系の確立を目的として、ヒト血球系培養細胞を用いて

PMCA 法 (Protein Misfolding Cyclic Amplification) による PrP^{Sc} の検出を検討した。

B. 研究方法

PrP^{Sc} : 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 (0.45 μm) でろ過、-80℃で凍結保存したものをを用いた (主任研究者岡田博士から分与)。

培養細胞株 : ヒト白血病由来細胞株 CMK85-L をもちいた。

in vitro プリオン感染 : CMK85-L を 24 穴プレートに 10⁵ cells/well まき、PrP^{Sc} 100μl 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、4 週目から 1 週間ごとにサンプリングした。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℃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 (0.45 μm) でろ過、-80℃で凍結保存した。

感染細胞の Proteinase K (PK) 処理 : 凍結した細胞 10⁶ 個を lysis buffer 400μl に溶かして 4℃ 15min 静置後、10⁴ x g 1 min 遠心、上清 250μl を上から静かに分取し、proteinase K 10μg/ml 添加、37℃ 30min 処理、0.1M Pefablock 10μl 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 4 $^{\circ}$ C で 3300 x g 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。

PMCA: 感染 5 週目の培養上清を検体とした。基質は次の方法で用時調製した。マイナス 80 $^{\circ}$ C で保存したヒト glioblastoma 由来細胞株 (2.5x10² cells/tube) または洗浄人血小板を conversion 緩衝液 200 μ l に溶かした lysate を基質として使用した。PMCA 専用のプラスチック試験管に基質 200 μ l と適宜希釈した検体 50 μ l とを入れて混合し、37 $^{\circ}$ C 温水中で震盪しながら 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 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、PK 処理 (50 μ /ml 又は 10 μ /ml で 37 $^{\circ}$ C 30min)、2mM Pefablock 存在下で DNase 処理 (40 μ /ml, 室温 5min)、Butanol:Methanol (5:1) 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-PAGE 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% 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、polyvinylidone difluoride 膜 (Immobilon®, Millipore 社) に転写、Starting Blocking Buffer (PIERCE) で一晩ブロッキングを行った。PrP^{Pres} 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 抗体を用い、ECL Plus 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。

(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、また、血小板は検査で不合格となった製剤を日本赤十字社の承認を得て譲渡されたものであり、倫理的な問題はない。

C. 研究結果と考察

1) ヒト白血病由来細胞株 CMK85-L に PrP^{Sc} 感染ヒト glioblastoma 由来細胞株の培養上清を添加すると感染 4 週目から 30kD の PrP^{Pres} の生成が見られ、5 週目がピークであった。一方 PrP^{Sc} 陰性の培養上清を添加したコントロールにおいて PrP^{Pres} はみとめられなかった。このことから CMK85-L が PrP^{Sc} 陽性ヒト glioblastoma 由来細胞株の培養上清によって感染することが再確認され、また 5 週目にピークがあることが判明した。

2) PrP^{Sc} 感染 CMK85-L の培養上清には PrP^{Sc} 伝達能があることをすでに報告した。今回、PMCA 法を用いて培養上清中の PrP^{Sc} の検出を試みた。培養上清を段階希釈したものを検体とし、ヒト glioblastoma 由来細胞株または洗浄人血小板を基質として PMCA 法を実施したが、いずれにおいても特異的な PrP^{Pres} のバンドは認められなかった。PMCA で検出できるのは当初はハムスターに馴化した 263 株 (スクレイピー由来) に限られていたが、最近になってマウスに馴化した 263 株や人の血小板を基質とした CJD の検出が可能になったので、引き続き PMCA の条件を検討する予定である。

D. 結論

- 1) CMK85-L が PrP^{Sc} 陽性ヒト glioblastoma 由来細胞株の培養上清によって感染することが再確認され、また 5 週目にピークがあることが判明した。
- 2) PMCA 法による PrP^{Sc} 感染 CMK85-L 培養上清中の PrP^{Sc} の検出を試みたが、特異的なバンドは認められなかった。反応条件を検討中である。

E. 健康危険情報
該当なし

F. 研究発表
学会発表

- 1) 岡田義昭、水沢左衛子：BSE 由来プリオンの *in vitro* 感染系の確立とその応用，プリオン研究会、2007 年 8 月新潟県津南町
- 2) 岡田義昭、水沢左衛子，梅森清子，山口一成：BSE 由来プリオンの *in vitro* 感染系の確立とその応用，第 55 回日本ウイルス学会学術集会，2007 年 10 月

G. 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)
平成 19 年度分担研究報告書

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
研究協力者 飛梅 実 国立感染症研究所、感染病理部

研究要旨

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。本研究において BSE 由来プリオンを出発材料とするプリオン持続感染細胞の病原性、感染性を調べる目的で感染細胞を C57/BL6 マウスに頭蓋内、腹腔内接種し樹立細胞による感染性と病原性を病理学的に調べた。接種 1 ヶ月後の組織においては神経症状の発症やプリオンの蓄積は認められなかった。プリオン発症には更に長期の期間が必要であり、継続して観察中である。

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-上から好都合である。本研究では *in vitro* で作製されたプリオン感染系の感染性、病原性を調べる事を目的とする。

B. 研究方法

材料と方法；

感染材料

BSE 由来プリオンを出発材料とするプリオン持続感染細胞を樹立した。ヒト由来グリオーマ細胞株に BSE 感染牛（和歌山県）の 20%脳乳剤を添加し、週 2 回の割合で継代し、プリオン持続感染細胞を樹立した。また継代 30 週のプリオン持続感染細胞の培養上清をマウス由来神経芽腫細胞株（N2a）のサブクローンである N2a-#34 に添加し、プリオン持続感染細胞を得た。

感染実験

接種動物として6週齢の雌C57BL6マウスを用いた。ウエスタンブロットによりプリオンの持続感染が確認された継代19週のグリオーマ細胞および継代10週のN2a-#34細胞をPBSに浮遊させ、凍結融解により破碎しマウスへ接種した。マウス腹腔内へは約 $3 \times 10^6/200 \mu$ を、マウス脳内へは約 $3 \times 10^6/20 \mu$ を接種した。陰性コントロール群として、同数のプリオン非感染グリオーマ細胞およびN2-#34細胞破碎液を腹腔および脳内へ接種した。

組織

安楽殺された感染細胞破碎液導入1ヶ月後のマウス脾臓および脳組織を摘出し用いた。半側はウエスタンブロット法を用いたプリオン検出に用い、残り半側を免疫組織化学的方法による、組織内プリオンの検出に用いた。採取された検体はホルマリン固定後に室温にて5分間98%蟻酸処理を行った。

HE染色

3 μ mの厚みにスライスされたパラフィン包埋された脾臓および脳組織をスライドガラスに塗布し用いた。定法に従い脱パラフィン処理を行いヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

免疫組織化学法

3 μ mの厚みにスライスしたパラフィン包埋された脾臓および脳組織をスライドガラスに塗布後、定法に従い脱パラフィン処理を行い用いた。抗原不活化のため1mM(脳組織の場合)または3mM(脾臓組織の場合)HCl存在下で121°C、2気圧の条件で20

分処理した。プリオンの検出にはT4ペプチド抗体を用い、Envision+システムを用いて検出した。

C. 研究結果

臨床症状

プリオン感染細胞株破碎液を接種したマウスに特異的な神経症状は認められなかった。

臓器肉眼所見

安楽殺したマウスの各臓器に肉眼的に著変を認めなかった。

組織学的所見

脳内でのプリオンの増殖に伴い、組織の空胞変性が誘導される(図1-a)ことが知られているが、プリオン持続感染細胞破碎液接種後1ヶ月のマウス脳では、脳内接種群、腹腔内接種群共に空胞変性は認められなかった(図2-b)。また、グリア細胞の増殖、炎症反応等特異的所見を認めず、陰性コントロール群との間に顕著な差異は認められなかった(図2-a,b)。脾臓においても脳組織と同様に、陰性コントロール群と持続感染細胞破碎液接種群において組織学的に差異はなく、著変を認めなかった(図2-c,d)。

免疫組織学的所見

マウスプリオンに特異的な反応性を有するT4ペプチド抗体を用いた免疫染色法を行った。BSE牛脳乳剤を脳内へ接種後200日を経過した陽性コントロールマウスではT4ペプチド抗体に反応する陽性シグナル(図1-b)を得られたが、プリオン持続感染細胞破碎液接種1ヶ月後のマウス脾臓

および脳組織にプリオンの存在を認めなかった。

D. 考察

マウスを用いたバイオアッセイ系はプリオンの病原性、感染性を評価する最も高感度な方法と考えられているが、マウス生体内でのプリオンの増幅には時間が必要なことが報告されている。

本検討に用いた接種 1 ヶ月後のマウスでは、脾臓および脳内でのプリオンの増殖に至っていないと考えられ、今後の経時的な観察と採材が必要である。

E. 結論

プリオン持続感染細胞株の感染性、病原性をマウスを用いた *in vivo* の系で病理学的に

調べた。感染 1 ヶ月後の脳及び脾臓組織では病変が認められなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

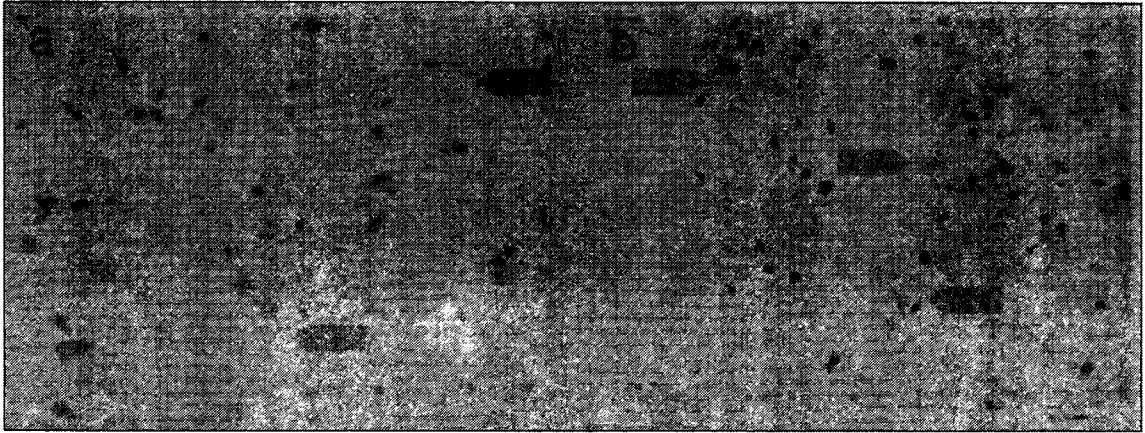
2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図 1



BSE 感染牛脳乳剤の脳内接種後 200 日を経過したマウス（陽性コントロールマウス）の脳組織

- a) HE 染色像。空胞変性を認める（青矢印）
- b) T4 ペプチド抗体を用いた免疫染色像。陽性シグナルを認める（青矢印）。