

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 17～19 年度 総合研究報告書

主任研究者 岡田 義昭

平成 20 (2008) 年 3 月

目次

- I. 総合研究報告書
 - 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 7
主任研究者 岡田 義昭

- II. 研究成果の刊行に関する一覧表 P 8

- III. 研究成果の刊行物・別冊

総合研究報告書

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 glioma 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。また、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た。
2. 異常プリオンに高感受性の細胞株を用いることによって 4～5 週間で上清中のプリオンの感染価を測定することが可能になった。
3. プリオン感染細胞の培養上清をウイルス除去フィルター（20nm）を用いて濾過したところ、約 5log の除去が可能であった。
4. 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。
5. 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。
6. 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。
7. 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。
8. BSE 感染ヒト glioma 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

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、異常プリオンに対するスクリーニング法や除去法の実用化が必要

A. 研究目的

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。現行のプリオン感染性の評価は、*in vitro* の適当な系がないため *in vivo* 実験によって行なわれている。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、*in vitro* で増殖可能なプリオン株はスクレーピー由来の株を含め少数であり、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解析には *in vitro* で増殖する BSE 由来異常プリオンを分離し、*in vitro* で感染性を評価できる *in vitro* 感染系を確立することを目指した。また、これまでの報告から血液中に存在する異常プリオンは極微量と考えられることから PMCA (Protein Misfolding Cyclic Amplification) 法による異常プリオンの増幅法も検討した。

B. 研究方法と結果

(1) BSE 由来プリオン感染細胞の作製

vCJD に感染したヒト脳を入手することは困難であることから、日本で発症した BSE 感染ウシ脳乳剤を用いた。プリオンに感受性のある細胞株として、マウスやラット由来の神経系の細胞株、ヒト由来の神経系細胞株や血液を介した感染を解析することから血球系の細胞株などを候補として、ウシ脳乳剤を感染させた。「種の壁」

が存在することから、細胞株に馴化した BSE 由来異常プリオンが増殖し、WB によって検出可能になるまで長期間を要すると推定した。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。PrPres の抽出は、 2.5×10^6 個の細胞 (タンパク量にして $200 \mu\text{g}$ に相当) を 0.5mL の Lysis buffer (150mM NaCl、 0.5% triton X-100、 0.5% sodium deoxycholate、 50mM Tris-HCl (pH7.5)) 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 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ になるように添加し、 37°C 60 分間反応させた。 $10 \mu\text{L}$ 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 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、10 分間 100°C 加熱処理後、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、又はマウス抗プリオン単クローン抗体を用いた化学発光法によって行った。

ヒト glioma の 1 つの株から感染 20 週間後から WB によって $26\text{--}28\text{KD}$ 付近に抗プリオン抗体と反応するバンドが確認された。二次抗体及び、非免疫ウサギ由来のコントロール IgG ではこのバンドは検出できなかった。その後、さらに継代を続けたところ 8 週間後には WB 法では検出できなくなった。

また、WB で PrPres が検出された感染細

胞を凍結して保存し、再度解凍し培養して 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が確認できた。

(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 10000 g、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上清を検体とし、異常プリオンの有無を測定した。10倍ずつの段階希釈後、非感染の細胞株に感染させ、経時的に細胞を集めながら継代した。4週間継代後に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異常プリオンの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。なお、WB法による陽性バンドは4~5週をピークに5週以上では経時的に減少し、検出されなくなった。

(3) ウイルス除去膜を用いた異常プリオン除去の評価

20 nm 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) 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 感染脳乳剤によって感染したヒト glioma 細胞株（一次感染細胞）は異常プリオンを培養液中に産生していたが、培養液によって感染した glioma 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。これによって二次感染した細胞からも異常プリオンが培養液中に産生することが明らかになった。

(5) ヒト白血病細胞株の BSE 感染細胞の作製

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 (10^6 /mL の感染価を有する) を添加し、感染の有無を WB 法にて検索した。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。特に、CMK85-L 細胞では感染4週後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。さらに、これらの培養上清をヒトの glioma 細胞に感染させたところ、CMK85-L 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培養液中に産生されていることが示唆された。

(6) 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測定した。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。抗プリオン抗体処理した培養上清は予想に反し、感染価は減少しなかった。Triton X-100 処理では、異常プリオンの感染価が増加した。しかし、Triton X-100 処理後に抗プリオン抗体を作用させたところ感染価は激減した。

(7) 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、5 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。

また、基質としてヒト神経系細胞株、ラット神経系細胞株、非感染ウシ脳乳剤を用いて PMCA による異常プリオンの増幅を検討した。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。

(8) 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）KT5 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、WB 法にて異常プリオンを検出し、感染成立の有無を検討した。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。

(9) 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。接種一ヶ月後に剖検し、脳及び脾臓から PrPres の蓄積の有無を免疫組織化学法にて検討した。感染一ヶ月の脳及び脾臓からは PrPres は検出できなかった。今後、2 年間経時的に経過観察する計画である。

D. 考察

BSE 感染ウシ脳乳剤を用いて感染させた

細胞から PrPres が検出までに約 20 週間という長い期間を要した。これは、実験当初から想像はしていたが、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、培養上清中に含まれる異常プリオンを定量するために用いた細胞はヒト glioma 由来であったために、「種の壁」がなく、僅か感染 4 週で検出できるまでに増殖したものと考えられた。興味深いことに、glioma 細胞だけでなくヒト白血病細胞株も WB 法で陽性所見が検出できるのは一過性で、4-5 週で陽性シグナルがピークとなり、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、逆に感染価は減少しなかった。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、血液からの除去には全く効果が期待できない可能性もある。これらのことは、脳乳剤を用いての解析からは得られない所見である。その点からも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。異常プリオンは凝集して存在していると考えられているので、界面活性剤処理によって凝集していたプリオンがバラバラとなり、それぞれが感染性を持つことから感染価が増加したものと考えている。

高感度の検出系として期待されている PMCA について基質や反応条件等を検討しながら異常プリオンの増幅を試みたが、成功しなかった。

我々が BSE 感染ウシから分離したプリオンが病原性を有するのか、in vitro では解析できないので、マウスに接種して経過を観察中である。脳、あるいは脾臓から異常プリオンの蓄積が確認できたならば、in vivo においても BSE 由来プリオンが感

染した証明になる。

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) 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
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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、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
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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.
- 6) 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
- 7) 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

8) 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

9) 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

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

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					