

有馬和彦 論文内容の要旨

主 論 文

題 名 Biological and biochemical characteristics of prion strains conserved in persistently-infected cell cultures

プリオン病原体持続感染培養細胞における
保存された生物学及び生物化学的性質

有馬和彦、西田教行、坂口末廣、重松和人、新竜一郎、山口尚宏、吉川大介、尹載宇、渡邊健、小林信之、Sophie Mouillet-Richard、Sylvain Lehmann、片峰茂

Journal of Virology
7104 ~ 7112, 79(11), 2005

長崎大学大学院医学研究科 病理系 専攻
(指導教授: 片峰茂 教授)

緒 言

伝達性海綿状脳症(プリオン病)の病原体の本体はいまだ不明である。感染発症脳組織に認められる異常型プリオン蛋白が、病原体そのものであり、正常プリオン蛋白が異常構造へとポストトランスレーショナルに変換されることが病態の中心であるとの考えが提唱されている。しかし、一方でプリオン病原体には多様性があり、さまざまな生物学的特徴の異なる株の存在が報告されている。この性質の差異が分子レベルでどのように規定されているのかは不明である。本研究ではマウスプリオン株の持続感染細胞を樹立、継代培養し、株固有の生物学的特徴と異常プリオン蛋白の生化学的性状について比較検討を行った。

対象と方法

当教室でマウスに長期継代しているヒトプリオン病の一種であるゲルストマン-ストライラー-シェインカー病由来の福岡・1株、羊プリオン病であるスクレイピー由来のチャンドラー株の二つのプリオン株を用いた。

この二つのマウスプリオン株をマウス神経系培養細胞のGT1-7に感染させ、30継代以上の長期培養を行った。培養細胞の抽出蛋白の20ulをddYマウスへの脳内接種の後364日間プリオン病発症の観察を行った。

プリオン病を発症したマウス脳乳剤(発症脳)とプリオン持続感染細胞(感染細胞)に含まれるプリオン病原体の感染価(LD50)を、接種材料の10倍段階希釈によるバイオアッセイを行い Behrens-Karber の計算式を用いて算出した。

被接種マウスの呈する臨床症状の観察、発症マウス脳における空胞形成の数と分布の病理変化の検討、脳内に蓄積したプロテイナーズ K 耐性プリオン蛋白の解析をウエスタンブロッティングを用いて行った。

結 果

福岡・1株では発症脳の感染価は $10^{8.1}/g$ 、感染細胞は $10^{5.3}/g$ であった。チャンドラー株では発症脳の感染価は $10^{8.8}/g$ 、感染細胞は $10^{6.5}/g$ であった。

福岡・1株に特異的な排尿障害は発症脳接種マウスでも感染細胞接種マウスでも認められた。チャンドラー株に特徴的な下肢麻痺は同様に発症脳接種マウスでも感染細胞接種マウスでも認められた。

感染価当たりの潜伏期間の長さの関係、発症マウス脳の見方状変化の大きさと分布は、株間で異なり、発症脳接種マウスでも感染細胞接種マウスでも同様のパターンを示した。

プロテイナーズ K 処理後のウエスタンブロッティングでは、福岡・1株でもチャンドラー株でも感染細胞で検出される異常型プリオン蛋白の断片の方が、発症脳乳剤で検出されるものより低分子量であった。また付加される糖鎖のパターンが両者で異なっていた。株間の比較では、チャンドラー株よりも福岡・1株で見られる13キロダルトンの異常型プリオン蛋白の断片が、感染細胞においても発症マウス脳でも、高分子量であった。

考 察

プリオン病病原体株の生物学的特徴である固有の潜伏期、特徴的臨床症状、病理学的病変プロファイルは、生体で継代したものも、培養細胞での長期継代後も変ることなく保持されていた。このことは病原体が極めて安定していることを意味する。しかし持続感染細胞に見られた異常プリオン蛋白の性状は脳内に認めるものと異なっていた。異常プリオン蛋白の検出は現在では BSE のスクリーニングに用いられるほか、CJD の診断基準にも付与されている。また異常プリオン蛋白の糖鎖付加パターンは株ごとに特徴があり、例えば BSE 由来とされる変異型 CJD のものといわゆる孤発型 CJD とは異なっており生化学的鑑別診断の根拠の一つとされる。しかし本研究で用いたプリオン株の場合、感染培養細胞と発症脳内のそれとは明らかに異なっていることから株固有のプリオン蛋白の異常構造があるとしても糖鎖は関係ないものと思われる。異常型プリオン蛋白そのものが病原体の本体であり病原体固有の遺伝子は存在しないと仮定すると、種々の生物学的差異はプリオン蛋白の異常立体構造に規定されるはずである。そういった構造が保たれているかどうか詳細は不明であるが、プリオン病原体には異常型プリオン蛋白以外の成分が関与している可能性を認めた。また、単一種の培養細胞にプリオン病原体が高感染価で持続感染することは、今後のプリオン病原体の同定分離に適した材料でもあり、このプリオン株の性質の保持機構を解明することでプリオン病の伝播と病態の解明に繋がると考えられた。