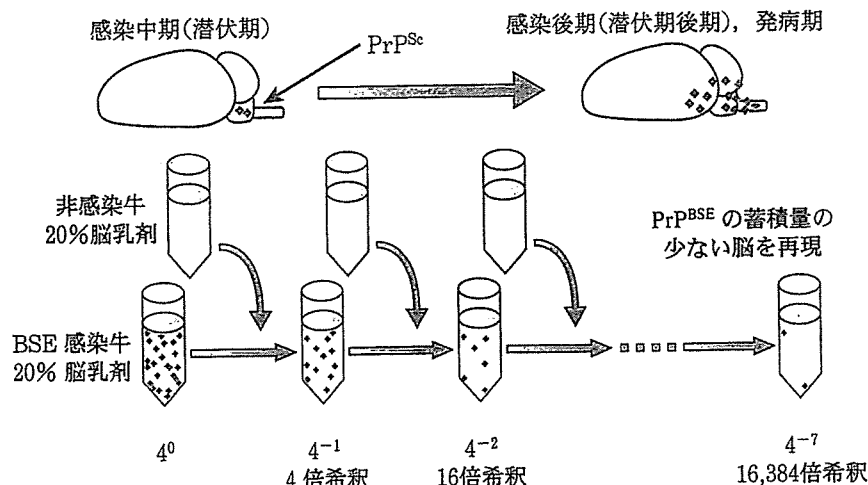




BSE 陽性検体	試験法	BSE 感染牛の希釈			
		4 ⁻³	4 ⁻⁴	4 ⁻⁵	4 ⁻⁶
BSE#4	WB	+	+	+	+
	PLATELIA	+	+	-	-
	OB-ELISA	+	+	-	-
BSE#5	WB	+	+	-	-
	PLATELIA	+	+	-	-
	OB-ELISA	+	+	-	-
BSE#6	WB	+	+	+	+
	PLATELIA	+	+	-	-
	OB-ELISA	+	+	+	-
BSE#7	WB	+	+	+	+
	PLATELIA	+	+	+	-
	OB-ELISA	+	+	+	-

図2 PrP^{Sc} 検出の検出限界

PrP^{Sc} が少量含まれる牛の脳を再現するために、BSE 感染牛の脳を非感染牛の脳で段階希釈し、PrP^{Sc} の検出限界を測定した(上)。Platelia BSE Kit, OB-ELISA, および確認検査用 WB の検出限界(下)。

Enfer TSE Test (Enfer 社), FRELISA BSE (富士レジオ社)のキットが BSE スクリーニングの一次検査に使用されている。これらで陽性あるいは擬陽性と判定された検体について、指定機関で確認検査を行っている。確認検査では WB, 免疫組織化学 (IHC), および病理組織学的検査を実施する。図2に Platelia BSE Kit, OB-ELISA (FRELISA BSE のプロトタイプ), および確認検査用 WB の検出限界を比較した結果を示した。英国 BSE 牛の脳を正常脳で4倍段階希釈した試

料から、それぞれの試料調整法に従って試料を調整し、PrP^{Sc} の検出を行った。Platelia BSE Kit と OB-ELISA は同等の検出限界を有していた。また、確認検査用の WB は両 ELISA と少なくとも同等～16倍程度の検出限界を有していた。

図3に国内4例目と7例目の BSE の検査結果を示した。4例目は ELISA の吸光度が3.0以上であり、確認検査でも WB および IHC で PrP^{Sc} の蓄積が確認でき、HE 標本でも神経細胞および神経網の空胞変性が認められた。一方、7例目は ELISA の吸光度が0.3とカットオフ値よりも僅かに高いだけであった。確認検査では WB および IHC で明らかな陽性所見が認められたが、HE 標本では空胞変性は認められなかった。この例から、WB および IHC が確認検査として十分な感度を有していること、また、予想通り HE 標本では感度が低いことも確認できた。

プリオン高感度検出系

PrP^{Sc} の免疫生化学的検出法の感度は、プリオン感染価にするとどの程度であろうか？一例として、表2にマウス PrP^{Sc} 検出とバイオアッセイから得られたプリオン感染価を比較した。OB-ELISA (発色法) ではスクレイパー感染マウス脳の4⁻⁷希釈 (920 ng 組織相当), OB-ELISA (化学発光) では4⁻⁸希釈 (230 ng 組織相当) まで検出できた。バイオアッセイから得られた感染価に換算すると発色法で約400 LD₅₀, 発光法で

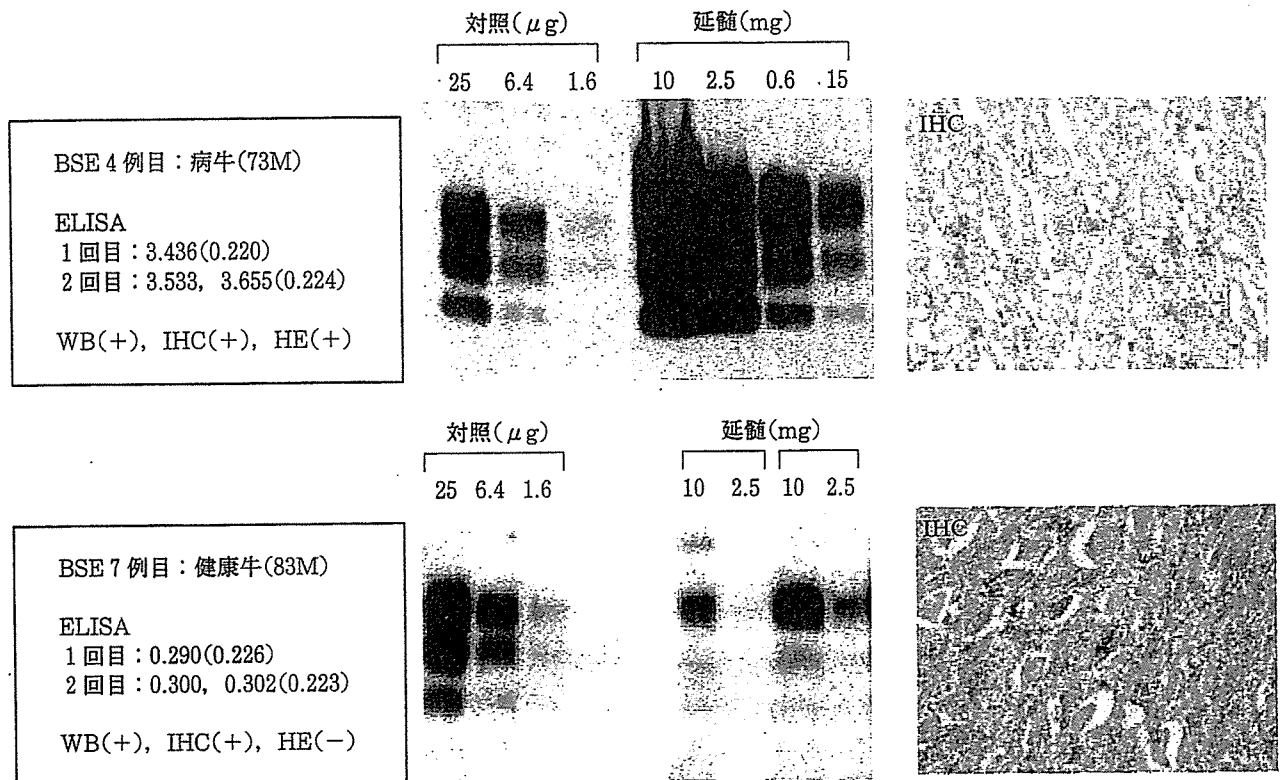


図3 BSE 検査結果

上段(国内4例目), 下段(国内7例目)。ELISAのカッコ内の値はカットオフ値。迷走神経背側核の免疫組織化学(IHC)を示した。7例目はELISAの値はカットオフ値よりも僅かに高い程度であるが、WB, IHCとも明らかに陽性像を呈した。

表2 OB-ELISAのPrP^{Sc}検出限界

検出法など	検出限界			検出限界	
	マウス脳 希釈	組織当量 (ng)	感染価(LD ₅₀) 換算値	BSE感染牛 延髄希釈	組織当量 (μg)
発色(TMB)	4 ⁻⁷	920	400	2 ⁻⁹	33
化学発光(CSPD)	4 ⁻⁸	230	100	2 ⁻¹¹ (=10 ^{-3.3})	8
化学発光(CSPD)+PTA沈殿	4 ⁻⁹	125~50	25	NT	NT

100 LD₅₀が検出限界である。試料調整にPTA沈殿法を導入すると⁶⁾, さらに4倍感度が上昇した。つまり、現時点でELISAをベースにしたPrP^{Sc}の検出感度は、25 LD₅₀ということになる。高感度化の最終目標は1 LD₅₀のプリオンの検出に設定すると、10倍以上の高感度化を達成する必要がある。また、OB-ELISA(化学発光)でBSE感染牛脳からPrP^{Sc}を検出した場合、10^{-3.3}(8 μg組織相当)希釈まで検出可能であった。BSE牛の材料はプリオン感染価のバイオアッセイのデータが十分でないので、感染価で表すことができ

ないが、計算上、BSE牛の脳に蓄積するPrP^{Sc}量の1/2,000が検出限界となる。

Platelia BSE Kitの牛PrP^{Sc}検出限界は1/300~1/1,000希釈で、RⅢマウスにおけるバイオアッセイと比較すると、同キットでのBSEプリオン検出限界は1 LD₅₀であった⁷⁾。RⅢマウスは野生型マウスの中ではBSEに感受性が高い系統であるが、ウシPrP発現トランスジェニック(Tg)マウスを用いたバイオアッセイのほうが1,000倍程度感度が高いと考えられている⁸⁾。SafarらはCDIでBSE牛の脳を10⁻⁴希釈して

も PrP^{Sc}を検出可能であり、CDI による PrP^{Sc} 検出感度はウシ PrP-Tg マウスを用いたバイオアッセイの検出感度は同程度であると報告している⁸⁾。

Schmerr らは、蛍光標識 PrP ペプチドを用いた競合反応をキャピラリー電気泳動法で検出する方法で、羊や鹿の血液から PrP^{Sc} が検出可能であることを報告した⁹⁾。定量的なモデル実験の結果がないので検出感度を定量的に評価することはできないが、血液からプリオンを検出可能な高感度な方法として期待されている。また、Bieschke らは蛍光相互相関分光法で CJD (Creutzfeldt-Jakob Disease) 患者髄液から PrP^{Sc} を検出している¹⁰⁾。これも実用化が期待される技術である。

一般的にバイオアッセイによるプリオン検出は感度が高いと考えられているが、用いた動物が発症するまでには長期間を要する。北本らは、プリオン接種マウスの脾臓の濾胞樹状細胞 (FDC) に、接種後早期から PrP^{Sc} が検出できることに着目し、発症を待たずに、接種後一定期間で脾臓採取して PrP^{Sc} を検出することで、バイオアッセイによるプリオン検出を短縮化できることを示した。ヒト/マウスキメラ PrP をノックインしたマウスの腹腔内に孤発性 CJD の材料を接種した場合、 10^{-7} 希釈までプリオンが検出されている¹¹⁾。ウシ PrP-Tg マウス、あるいはウシ PrP ノックインマウスで同様の方法により、高感度 BSE プリオン検出が可能となることが期待される。

生前診断法の開発

現行の BSE 診断法は、と畜後に延髄を採材して検査する。もし、血液などを材料として BSE 生前診断が可能ならば、と畜・解体前に感染の有無を判定できることから、より効率よく食肉の安全が保証される。また、BSE 汚染状況の把握や、牛の輸出入時に BSE フリーであることの証明も可能となるかもしれない。このような背景から、BSE 生前診断法の開発が求められているが、今のところ期待される方法はない。牛を対象とした場合、生前診断に使用可能な組織は、血液など限られた材料となる。これまでの研究報告を総合的に判断すると、PrP^{Sc} が扁桃や消化管付随リンパ装置などのリンパ系組織に検出される場合は、血液にもプリオンすると考えるのが自然である。実際に、スクレイピー

感染羊、BSE 感染羊、BSE 感染カニクイザル、vCJD 患者のリンパ系組織で PrP^{Sc} が検出でき、血液中に病気を伝達可能な量のプリオンが存在することが知られている。しかし、プリオンが血液中に存在したとしても微量であることから、血液から PrP^{Sc} を検出するには、血液に適した試料調整法方を含めて、超高感度検出技術の開発が必要である。一方、BSE 感染牛におけるプリオンの局在はスクレイピー感染羊と比較して、中枢神経系組織への限局傾向が強く、PrP^{Sc} はリンパ系組織で殆ど検出されない¹²⁾。従って、BSE 感染牛の血液中にはプリオンが殆ど存在しない可能性もある。仮に超高感度 PrP^{Sc} 検出技術が実現できたとしても、血中 PrP^{Sc} の検出を指標とした BSE 生前検査法は現実的でないかもしれない。

PrP に限らず、プリオン感染により特異的に変化する分子は診断マーカーに成り得る。人プリオン病の診断では、髄液中の 14-3-3 蛋白、神経特異的エノラーゼ、S100 蛋白などが診断補助マーカーとして使用されている¹³⁾。また、MRI の拡散強調画像や FLAIR (fluid attenuated inversion recovery) 画像が早期診断に応用されている¹⁴⁾。しかし、牛の検査を考えると、髄液の採取や MRI 検査は実用的ではない。

2001 年に、プリオン感染動物の骨髄や末梢血単核球で、赤芽球分化関連因子(後に遺伝子産物が α ヘモグロビン安定化因子 [AHSP] であることが判明)の遺伝子発現が低下することが報告され、PrP 以外の診断マーカーとして診断への応用が期待された¹⁵⁾。しかし現在まで、AHSP が BSE 感染の診断マーカーとして機能するかは不明である。また、2001 年にプリオン感染動物の尿中に蛋白質分解酵素抵抗性の PrP が検出されることが報告され、尿検査によるプリオン感染診断法開発の機運が高まった¹⁶⁾。しかし、尿中 PrP と目されていた蛋白が、細菌の外膜蛋白である可能性も指摘されており、尿中 PrP の存在自体も不透明な状況にある¹⁷⁾。

おわりに

10 以上の BSE 迅速検査キットが開発された。その中でも性能の良いキットは、迅速検査用としては、PrP^{Sc} 検出感度が比較的高いという印象を持つ。より簡便で高感度な診断法は理想であるが、一足飛びに達

成できるものではない。今後、BSEを含めた動物プリオン病の診断法の開発は、1)感度を損なうことなく簡便化を図る、2)試料調整が煩雑、あるいは高価な測定機器が必要でも高感度化を押し進める、3)PrP^{Sc}以外の診断マーカーを標的とした生前診断法の開発、の3つの方向性があると思われる。BSE生前診断法の開発への要望が多く聞かれるが、ここ数年で実用的なものが開発される見込みは低い。有用な診断マーカーの発見など、研究面でのブレイクスルーに期待したい。

謝 辞

英国 BSE 牛脳材料を分与いただいた動物衛生研究所・プリオン病研究センター・横山隆博士に感謝致します。また、PrP^{Sc}検出感度に関する試験は、厚生労働科学研究費の補助を受けて実施したものです。

【文 献】

- 1) Kitamoto T, Muramoto T, Mohri S, et al.: Abnormal isoform of prion protein accumulates in follicular dendritic cells in mice with Creutzfeldt-Jakob disease. *J Virol* 65 : 6292-6295, 1991
- 2) Furuoka H, et al.: Effective antigen-retrieval method for immunohistochemical detection of abnormal isoform of prion proteins in animals. *Acta Neuropathol* 109 : 263-271, 2005
- 3) Moynagh J, Schimmel H, & Kramer GN: The evaluation of tests for the diagnosis of transmissible spongiform encephalopathy in bovines. European Commission, 1999
- 4) Schimmel H, et al.: The evaluation of five rapid tests for the diagnosis of transmissible spongiform encephalopathy in bovines (2nd study), European Commission, 2002
- 5) Philipp W, et al.: The evaluation of 10 rapid post mortem tests for the diagnosis of transmissible spongiform encephalopathy in bovines, European Commission, 2004
- 6) Safar J, et al.: Eight prion strains have PrP^{Sc} molecules with different conformations. *Nat Med* 4 : 1157-1165, 1998
- 7) Deslys JP, et al.: Screening slaughtered cattle for BSE. *Nature* 409 : 476-478, 2001
- 8) Safar JG, et al.: Measuring prions causing bovine spongiform encephalopathy or chronic wasting disease by immunoassays and transgenic mice. *Nat Biotechnol* 20 : 1147-1150, 2002
- 9) Schmerr MJ, et al.: Use of capillary electrophoresis and fluorescent labeled peptides to detect the abnormal prion protein in the blood of animals that are infected with a transmissible spongiform encephalopathy. *J Chromatogr A* 853 : 207-214, 1999
- 10) Bieschke J, et al.: Ultrasensitive detection of pathological prion protein aggregates by dual-color scanning for intensely fluorescent targets. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 : 5468-5473, 2000
- 11) Kitamoto T, et al.: Follicular dendritic cell of the knock-in mouse provides a new bioassay for human prions. *Biochem Biophys Res Commun* 297 : 280-286, 2002
- 12) The Scientific Steering Committee: TSE infectivity distribution in ruminant tissues (state of knowledge, December 2001), European Commission, 2002
- 13) Zerr I & Poser S: Clinical diagnosis and differential diagnosis of CJD and vCJD. With special emphasis on laboratory tests. *APMIS* 110 : 88-98, 2002
- 14) Collie DA, et al.: Diagnosing variant Creutzfeldt-Jakob disease with the pulvinar sign: MR imaging findings in 86 neuropathologically confirmed cases. *AJNR Am J Neuroradiol* 24 : 1560-1569, 2003
- 15) Miele G, Manson J, & Clinton M: A novel erythroid-specific marker of transmissible spongiform encephalopathies. *Nat Med* 7 : 361-364, 2001
- 16) Shaked GM, et al.: A protease-resistant prion protein isoform is present in urine of animals and humans affected with prion diseases. *J Biol Chem* 276 : 31479-31482, 2001
- 17) Furukawa H, et al.: A pitfall in diagnosis of human prion diseases using detection of protease-resistant prion protein in urine. Contamination with bacterial outer membrane proteins. *J Biol Chem* 279 : 23661-23667, 2004

2. 人獣共通感染症としてのプリオン病

堀内 基広

北海道大学・大学院獣医学研究科・プリオン病学講座

1996年に変異型クロイツフェルト・ヤコブ病(vCJD)の存在が報告されてから、プリオン病は人獣共通感染症と認識されるようになった。2001年には我が国でもBSE感染牛が見つかり、大きな社会問題となった。欧州におけるBSE発生は減少傾向にあり、英国におけるvCJDの発生も減少傾向が認められるが、欧州以外の国でのBSEの発生、輸血によるvCJDの伝播、日本におけるvCJD患者の発生など、危惧していたことが次々に現実となった。BSEの感染拡大防止と撲滅には、BSEスクリーニング/サーベイランス、特定危険部位の除去、飼料規制の継続が必要である。また、輸血用血液、医薬品原料などのプリオン汚染を摘発して排除するためには、高感度プリオン検出技術の開発が望まれる。さらに、人プリオン病の治療法確立も重要な課題である。

vCJDの発生状況

vCJDの発生数を図1に示した。英国では2004年から減少傾向が認められる。これまでにvCJDを発症した患者はPrPコドン129のアミノ酸多型がM/Mであるので、M/Mタイプの人における発生はこのまま減少していくかもしれない。一方、英国で虫垂あるいは扁桃除去手術の試料を免疫組織化学により調べた結果、3/12,674がPrP^{Sc}陽性であった。この結果を英国の人口に外挿すると、3,800名程度の感染者が存在するという試算も報告されている¹⁾。

英国以外では、フランスで11例、イタリア2例、アイルランド、カナダ、アメリカ各1例、2005年に入り、オランダ、日本でvCJD患者が報告された。日本のvCJD症例は、短期間の英国滞在中に感染を受けたと考えられている。食肉等を介する場合、感染成立は、摂取量や摂取形態のみならず、侵入門戸への到達などの確率論にも依存する。短期間の滞在中に感染を受ける可能性も十分に考えられる。あるいは、PrP以外にvCJDの感受性に関与する遺伝背景や

環境要因があるかもしれない。英国の虫垂の検索結果と合わせて、潜在的なvCJD感染の可能性を軽視できる状況ではないと思われる。

BSE実験感染羊の血液の輸血により病気が伝達されたことから、輸血によるvCJDの伝播が危惧されていたが、現実のものとなった。一例(PrPコドン129:M/M)は、献血の3年半後にvCJDを発症した人由来の赤血球を輸血された6年半後にvCJDを発症した²⁾。もう一例(PrPコド

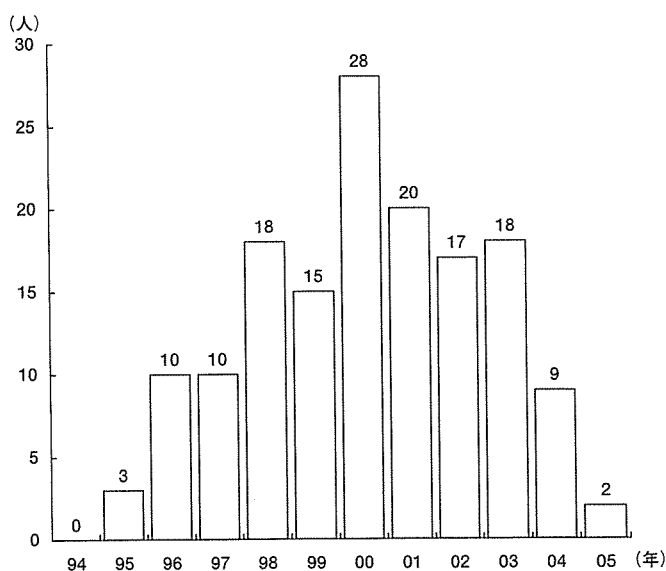


図1 英国におけるvCJD患者数の推移

連絡先

〒060-0818 札幌市北区北18条西9丁目

TEL : 011-706-5293

FAX : 011-706-5293

E-mail : horiuchi@vetmed.hokudai.ac.jp

ン129：M/V)は、献血の18ヶ月後にvCJDを発症した人由来の赤血球を輸血された人で、5年後に腹大動脈瘤破裂により死亡した。この患者の脾臓からPrP^{Sc}が検出されたが、脳からは検出されなかった³⁾。この患者が将来vCJDを発症したかは知ることができない。しかしこの事例から、PrP コドンM/VあるいはV/Vの人がvCJDに感染する可能性は否定できなくなった。

BSEの発生状況

英国では1992年をピークにBSEの発生が減少していたが、2004年について年間の発生が1,000頭を割った。また、EU諸国でも発生数は減少傾向にある⁴⁾。一方、カナダ、イスラエル、日本、アメリカ、とEU以外の国でもBSE感染牛が摘発されており、EU以外にも感染は拡大している。汚染状況が低いと考えられる地域では、BSEのサーベイランスを強化しない限り、真の汚染状況は判らない。

日本では2001年9月に一例目が確認された。翌10月には、食肉に供される牛全頭と対象とした検査が開始され、2004年4月から、24ヶ月齢以上の死亡牛全頭を対象とした検査が完全に実施された。BSE発生頻度が高い死亡牛の検査の開始が遅れたことが、我が国のBSE汚染状況を把握する上で障害となったのは残念である。これまで、約450万頭以上が検査され、17頭のBSE感染牛が摘発された⁵⁾。

当初摘発されていた牛は1995～96年にかけて生まれた

個体であったことから、この時期にリスクが一時的にあったとも考えられた。しかし、2004～2005年の検査では、1999～2000年に生まれた牛3頭が摘発されたことから、その後も感染源が国内に存在したことが明らかとなった(図2)。1999～2000年生まれのBSE牛の感染源が、国内のBSEがレンダリングを経てリサイクルされた結果なのか、海外からの飼料などの輸入によるものかは判らない。BSEの潜伏期は4～6年であり、汚染度が低ければ潜伏期は長くなることから、2000年以降に生まれた牛がBSE好発年齢に入るのは今後である。また、2001年の肉骨粉等動物由来飼料使用の法規制後に生まれた牛でのBSE発生頻度により、規制の実効性と規制後のBSE汚染状況が明確になると思われる。従って2001年以降に生まれた牛がBSE好発年齢に達するまでは、対象となる牛のBSEサーベイランスは継続する必要がある。BSEの感染源は飼料と考えられる。肉骨粉の使用は2001年に法的に規制された。国内で使用する飼料に占める輸入配合飼料の割合は0.5%程度と低いが、輸入配合飼料の規制は殆どない。仮に国内での動物由来飼料の規制が効果を発揮していると考えれば、海外からの汚染源の侵入を断つことに一層の注意を払う必要がある。

日本ではBSE被疑牛からBSE感染牛が摘発された例はない。これまで摘発された24ヶ月齢以上のBSE感染牛は、健康牛としてと畜場で処理されたものが5頭、と畜場で病

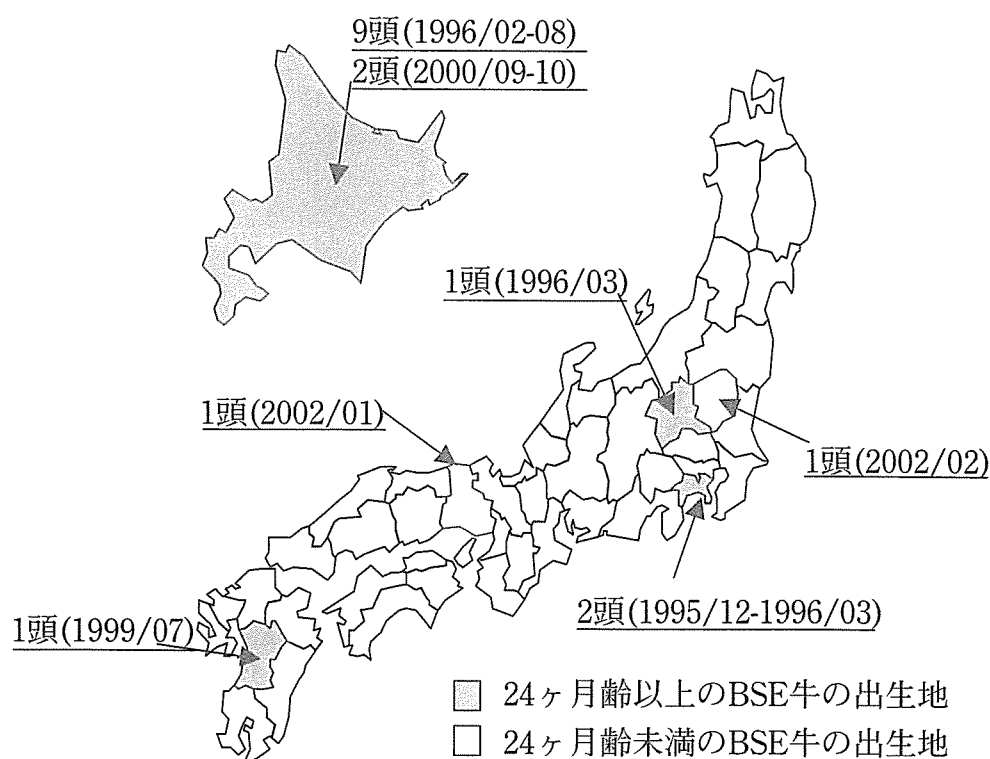


図2 日本のBSE牛の出生地と出生時期

畜として処理された個体が5頭、死亡牛などの検査で摘発された個体が5頭である．と畜場で病畜として処理された牛および死亡牛は、EUではリスク牛に分類される．EUの分類に拠って日本のBSEの発生頻度を計算すると、リスク牛で20倍ほど高いことがわかる（表1）．

BSE 迅速検査用キットとその評価

1998年にプリオニクス社が、世界初のBSE検査キット“Prionics-Check”を販売した．その後、Bio-Rad社、Enfer社が、BSE検査キットを発売し、2000から2001年にかけてEU諸国でBSE検査が実施されるようになった．ECでは3度BSEの迅速検査法の評価を実施し、これまでに19キットが評価を受けた（表2）^{6,8)}．そのうち12キットがフィールド試験を終了して、EC（現在はEuropean Food Safety Authority, EFSA）の承認を受けている．

BSE 迅速検査キットは、ウエスタンブロット（Prionics-Check WB）、2種の抗体を使用する sandwich-ELISA（Platelia BSE Kit, FRELISA BSE, Prionics-Check LIA, aCDI など）、PrP^{Sc}を選択的に結合するポリマーを使用した直接 ELISA（Enfer BSE Kit, IDEXX HerdCheck BSE Atigen Test Kit）、filter-ELISA（CediTect BSE test）、イムノクロマト法（Prionics-Check PrioSTRIP）に大別される（表2）．各々のキットにはそれぞれ特徴がある．Platelia BSE Kit は試料調整の簡便化に成功した一例である．Enfer BSE Kit や IDEXX HerdCheck BSE は PrP^{Sc}を選択的に結合する化学物質をコートしたプレートを使用している点が特徴である．IDEXX 社のキットでは Microsens Biotechnology 社がライセンスを有する Seprion と呼ばれる化学ポリマーを使用している．この化学ポリマーは PrP^{Sc}に対する選択性が高いらしく、IDEXX 社のキットでは試料

表 1 我が国の BSE 陽性率

	A	B	A + B	C
区分	農水 死亡牛など (24ヶ月齢以上)	厚労 病牛としてと畜 (24ヶ月齢以上)	EU のリスク牛に 相当する集団 (24ヶ月齢以上)	厚労 健康牛としてと畜 (30ヶ月齢以上)
検査頭数	145,373	19,879	165,252	1,740,937
BSE 陽性牛数	5	5	10	5
陽性率 (100 万頭当たり)	34.4	251.5	60.5	2.9

表 2 EC による BSE 迅速検査キットの評価

	会社など	キット名	原理/特徴	検出法	検出限界
第一回 (1999 年) 4 社	Prionics, Switzerland	Prionics-Check WB	WB	化学発光	10 ⁻¹ (15/20)
	Enfer Technology, Ireland	Enfer TSE Kit	直接 ELISA	化学発光	10 ^{-1.5} (20/20)
	CEA (Bio-Rad), France	Platelia BSE detection Kit	Sandwich-ELISA	発色	10 ^{-2.5} (18/20)
第二回 (2002 年) 5 社	ID Lelystad, Netherlands	NA	Filter-assay / 変性・未変性測定	化学発光	1: 81 (4/4)
	Prionics, Switzerland	Prionics-Check LIA	Sandwich-ELISA	化学発光	1: 243 (2/4)
	USDA (InPro), USA	aCDI	Sandwich-assay / 変性・未変性測定/PTA 沈殿	時間分解蛍光	10 ^{-2.0} (2/4)
	MRC prion unit, Imperial College, UK	NA	Sandwich-assay	電子化学発光	1: 270 (10/12)
第三回 (2004 年) 10 社	CEDI Diagnostic, Netherlands	CediTect BSE test	Filter-assay / 変性・未変性測定	化学発光	>1: 200 (5/6)
	Fujirebio, Japan	FRELISA BSE	Sandwich-ELISA	発色	>1: 200 (6/6)
	IDEXX Laboratories, USA	IDEXX HerdChek BSE Antigen Test Kit, EIA	直接 ELISA / PK 処理無	発色	1: 800 (5/6)
	Institut Pourquier, France	Institut Pourquier Speed'it BSE	Sandwich-ELISA	化学発光	1: 64 (4/5)
	Labor Diagnostik Leipzig GmbH, Germany	Priontype post mortem	Sandwich-ELISA / PK 処理無	発色	1: 25 (4/4)
	Prionics, Switzerland	Prionics-Check PrioSTRIP	Lateral flow	目視	1: 100 (16/16)
	Roboscreen GmbH, Germany	Roboscreen Beta Prion BSE EIA Test Kit	Sandwich-ELISA	発色	>1: 200 (6/6)
	Roche Diagnostics GmbH, Germany	Roche Applied Science PrionScreen	Sandwich-ELISA	発色	1: 100 (10/12)
	Enfer Scientific, Ireland	Enfer TSE Kit v2.0 (autom. Sample prep.)	直接 ELISA	化学発光	>1: 200 (10/12)

第一回から第三回まで、エントリーしたキットの中で、感度と特異性をクリアしたキットのみ表に示した

調整に PK を使用していない． aCDI と CediTect BSE test では，PrP^{Sc} を変性および未変性の条件で抗体との反応性を解析する． PrP^{Sc} は未変性条件下では抗 PrP 抗体のエピトープをあまり露出していないが，変性に伴いエピトープが露出し，抗体の反応性が上昇する．変性・未変性条件下で構造の変化に伴う抗体の反応性の差を測定することで S/N 比の向上が見込まれる． InPro 社はこの特徴から “CDI (conformation dependent immunoassay)” と呼んでいる． PrP^{Sc} の濃縮にリンタングステン酸（PTA）を使用した点も aCDI の特徴の一つである⁹⁾．

現在の技術水準では，感度および特異性は 100% 一致す

ることは最低条件であり，検出限界がキットの性能を見極める判断材料となる．三回の評価報告を総合的に判断すると，良好な検出限界を示すキットは 1：200 以上の希釈でも陽性の反応を呈している．つまり，BSE 発症牛の延髄に蓄積している PrP^{Sc} の 1/200 程度の量の PrP^{Sc} が蓄積している感染牛を摘発可能な感度を有している．

PrP^{Sc} の検出感度

図 3 に国内 4 例目と 7 例目の BSE の検査結果を示した． 4 例目は ELISA の吸光度が 3.0 以上であり，確認検査でも WB および IHC で PrP^{Sc} の蓄積が確認でき，HE 標本でも

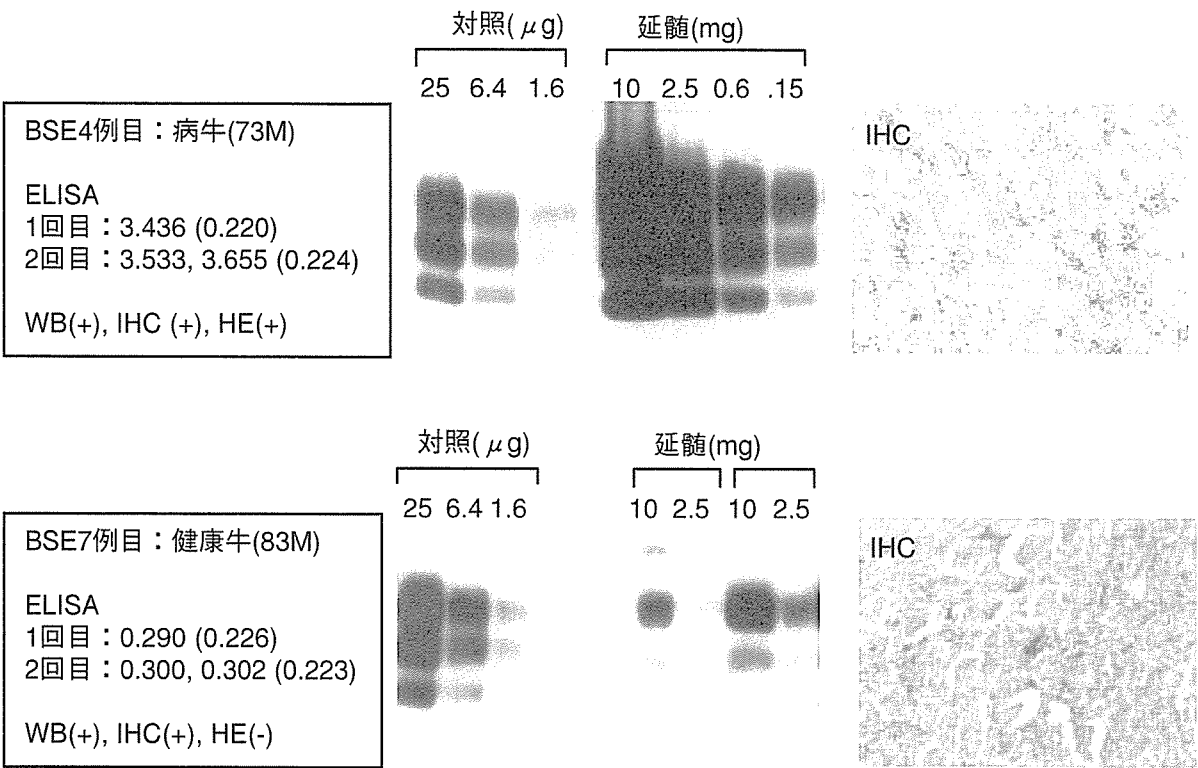


図 3 BSE 検査結果

上段（国内 4 例目），下段（国内 7 例目）． ELISA のカッコ内の値はカットオフ値． 迷走神経背側核の免疫組織化学（IHC）を示した． 7 例目は ELISA の値はカットオフ値よりも僅かに高い程度であるが，WB，IHC とも明らかに陽性像を呈した．

表 3 PrP^{Sc} の検出限界

		OB-ELISA			WB
		発色（TMB）	化学発光（CSPD）	化学発光（CSPD） + PTA 沈殿	
マウス スクレイパー	脳希釈	4 ⁻⁷	4 ⁻⁸	4 ⁻⁹	NT
	組織当量（ng）	920	230	125 ~ 50	NT
	感染価（LD ⁵⁰ ）	400	100	25	NT
BSE 牛	延髄希釈	2 ⁻⁹	2 ⁻¹¹ (=10 ^{-3.3})	NT	NA
	組織当量（μg）	33	8	NT	2 ~ 8

神経細胞および神経網の空胞変性が認められた。一方、7例目はELISAの吸光度が0.3とカットオフ値よりも僅かに高いだけであった。確認検査ではWBおよびIHCで明らかな陽性所見が認められたが、HE標本では空胞変性は認められなかった。この例から、WBおよびIHCが確認検査として十分な感度を有していること、また、予想通りHE標本による検索は感度が低いことも確認できた。

PrP^{Sc}の免疫生化学的検出法の感度は、プリオン感染価にするとどの程度であろうか？ 一例として、表3にOB-ELISA (FRELISA BSEのプロトタイプ) によるPrP^{Sc}検出とバイオアッセイから得られたプリオン感染価を比較した結果を示した。OB-ELISA (発色法) ではスクレイピー感染マウス脳の 4^{-7} 希釈 (920 ng 組織相当), OB-ELISA (化学発光) では 4^{-8} 希釈 (230 ng 組織相当) まで検出できた。バイオアッセイから得られた感染価に換算すると発色法で約400 LD₅₀, 発光法で100 LD₅₀が検出限界である。試料調整にリンタングステン酸 (PTA) 沈殿法を導入すると⁹⁾, さらに4倍感度が上昇した。つまり、現時点でELISAをベースにしたPrP^{Sc}の検出感度は、25 LD₅₀程度ということになる。また、OB-ELISA (化学発光) でBSE感染牛脳からPrP^{Sc}を検出した場合、 $10^{-3.3}$ ($8 \mu\text{g}$ 組織相当) 希釈まで検出可能であった。計算上、BSE牛の脳に蓄積するPrP^{Sc}量の1/2000が検出限界となる。また、確認検査用WBでは検出限界はBSE発症牛脳2~8 μg 組織相当であった。試料調整法にPTA沈殿法などを導入してさらに濃縮すると、一レーンあたりにアプライできる組織当量が増すので、WBの感度がさらに上昇する。このように高感度化したWBを用いて、日本で発生したBSE牛の末梢神経、副腎などでもPrP^{Sc}が僅かに検出されている¹⁰⁾。

Platelia BSE Kitの牛PrP^{Sc}検出限界は1/300~1/1,000希釈で、RIIIマウスにおけるバイオアッセイと比較した場合、同キットでのBSEプリオン検出限界は1LD₅₀程度と報告されている¹¹⁾。RIIIマウスは野生型マウスの中ではBSEに感受性が高い系統であるが、ウシPrP発現トランスジェニック (Tg) マウスを用いたバイオアッセイのほうが1000倍程度感度が高いと考えられている¹²⁾。SafarらはCDIでBSE牛の脳を 10^{-4} 希釈してもPrP^{Sc}を検出可能であり、CDIによるPrP^{Sc}検出感度はウシPrP-Tgマウスを用いたバイオアッセイの検出感度と同程度であると報告している¹²⁾。

PrP^{Sc}の増殖抑制とプリオン病治療薬の候補

PrP^{Sc}の蓄積を阻害する物質は、プリオンの増殖を抑えると考えられることから、プリオン病の治療薬の候補となり得る。これまでに、プリオン持続感染神経芽細胞 (Sc⁺MNB) を用いて、多くの候補が得られている。硫酸デキストランや硫酸ペントサンなどの硫酸多糖体¹³⁾, ポリエン系抗生物質¹⁴⁾, ポルフィリン誘導体¹⁵⁾, キナクリンなどのアクリジン誘導体^{16,17)}, クロルプロマジンなどのフェノチアジン誘導体¹⁷⁾, 分枝ポリアミン¹⁸⁾, システインプロテアーゼインヒビター¹⁶⁾, タンニン酸などのポリフェノール類¹⁹⁾, アミロイド結合性色素²⁰⁾, PrPペプチド²¹⁾, β -breaker peptide²²⁾, 変異PrP²³⁾, siRNA²⁴⁾, 抗PrP抗体など、数多くの例が挙げられる。これらの一部は、in vivoでも試験されているが、予防という観点からは効果が期待できるものがあるが、治療という観点からは、現状では効果が期待できるものは多くない。今後、候補物質の作用機序の解析、投与方法や薬物動態の検討などを進めるこ

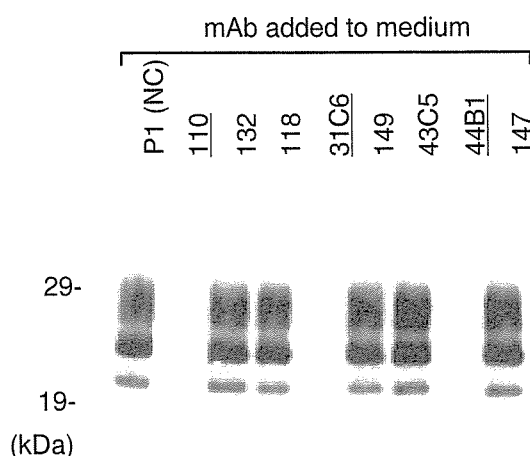


図4 抗PrP抗体によるPrP^{Sc}産生抑制

プリオン持続感染マウス神経芽細胞を抗PrP抗体で処理後にPrP^{Sc}をWBにより検出した (左)。表には、抗体が認識するエピトープ、細胞膜上PrP^Cとの反応性 (FACS), およびPrP^{Sc}産生抑制のED₅₀を示した。Lは連続エピトープ, DCは非連続エピトープ。

mAb	Epitope	FACS	PrP ^{Sc} inhibition (ED ₅₀)
110	L, 59-89	+	+
132	L, 119-127	—	—
118	L, 137-143	—	—
31C6	L, 143-149	+	+
149	L, 147-151	—	—
43C5	L, 163-169	—	—
147	L, 219-229	—	—
44B1	DC, 155-231	+	+
72	DC, 89-231	+	+

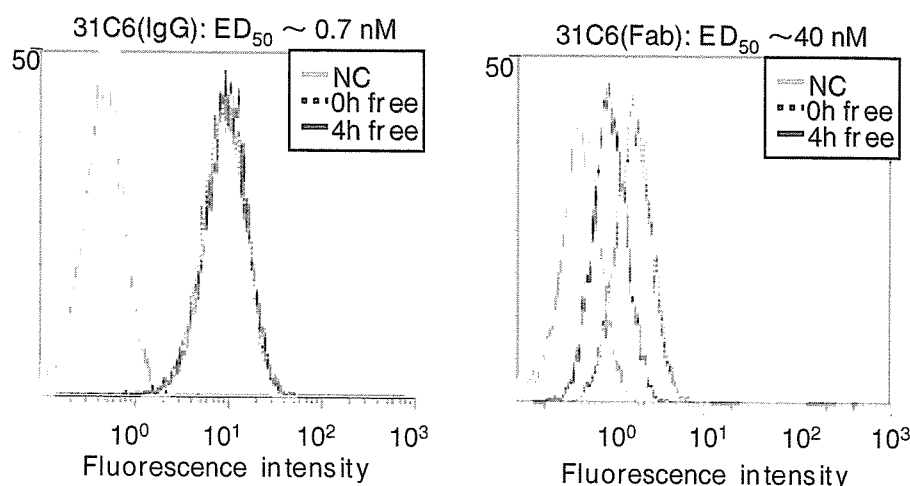


図5 PrP^C-抗体複合体の動態

マウス神経芽細胞を mAb31C6 (IgG), およびその Fab'フラグメント存在下で1時間培養後直ちに (0 hr), あるいは抗体除去後に抗体非存在下で細胞を4時間培養し (4 hr), PrP^C-抗体複合体をFACSにより検出した。

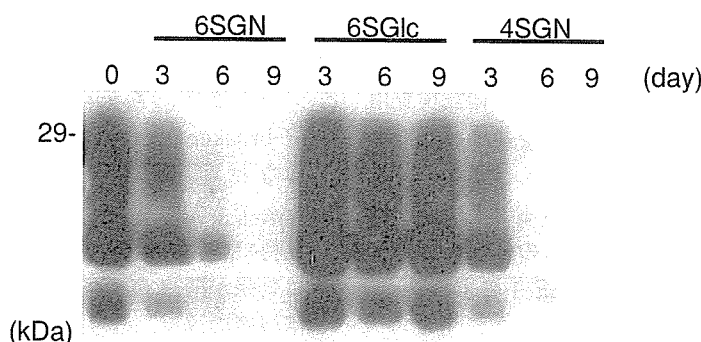


図6 人工合成硫酸化糖による PrP^{Sc} 産生抑制

プリオン持続感染マウス神経芽細胞を合成硫酸化糖存在下で培養後に, PrP^{Sc} を WB により検出した。6SGN: 6-sulfo-GlcNAc; 4SGN: 4-sulfo-GlcNAc; 6SGlc: 6-sulfo-Glc.

とで, 効果的な治療法が見つかることが期待される。本稿では抗 PrP 抗体と硫酸多糖体の PrP^{Sc} 産生抑制について述べる。

1) 抗 PrP 抗体の抗プリオン活性

PrP の第一 α ヘリックスと反応する抗体を Sc⁺NMB 培養液に添加して培養すると, PrP^{Sc} が消失することが報告された^{25,26)}。筆者らは9種の異なるエピトープを認識する抗 PrPmAb パネルを用いて同様の実験を行なったところ, mAb が認識するエピトープとは関係なく, 細胞膜上の PrP^C と強く反応する mAb に PrP^{Sc} 増殖抑制効果が認められた (図4)²⁷⁾。抗体が PrP^C と結合すると抗体-PrP^C 複合体が細胞膜上に停留する。抗体を Fab'にすると, Fab-PrP^C 複合体の細胞膜上の停留は IgG に比べると弱く, PrP^{Sc} 産生抑制効果も減少する (図5)。これらの結果は, 抗体が結合すると PrP^C が通常の分解経路に移行せず, PrP^{Sc} 産生の基質と

なる PrP^C が供給されなくなることが, 抗 PrP 抗体の PrP^{Sc} 増殖抑制の機構の一つであることを示唆している。勿論, 抗体が PrP^C 上の特定のエピトープに結合することで, PrP^C 上にある PrP^{Sc} への結合ドメインをブロックする結果, PrP^C が PrP^{Sc} に結合できなくなる可能性もある。細胞内において PrP^{Sc} は生成と分解が行われており, 基質 (PrP^C) の供給が不十分になると PrP^{Sc} は分解されて消失すると考えられる。

抗 PrP 抗体がプリオン感染を防御することも報告されている。mAb6H4 を B 細胞上に IgM として発現する Tg マウスは, プリオンの腹腔内接種に抵抗性となる²⁸⁾。この Tg マウスでは脾臓に PrP^{Sc} の蓄積が認められないので, 末梢組織におけるプリオンの感染成立を阻害していると考えられる。また, 抗 PrP 抗体の受動免疫が末梢からのプリオン感染を病御できる²⁹⁾。プリオンを腹腔内接種後, 7 ~ 30 日

後に受動免疫を開始しても防御効果がある。受動免疫を開始した時点では既に脾臓で PrP^{Sc} が検出されることから、末梢のリンパ系組織では感染が成立している。しかし発病を阻止できることから、抗 PrP 抗体の受動免疫は、プリオンが末梢組織から中枢神経系組織へ侵入する過程を阻止すると思われる。この受動免疫ではプリオンの脳内接種に対する防御効果ない。プリオンを末梢から感染させる以前に組換え PrP 免疫した場合には防御効果はあるが、プリオン接種後に免疫しても防御効果は殆ど認められない³⁰⁾。従ってこれらの結果は、抗 PrP 抗体がプリオン感染初期の段階を標的とした予防法開発に応用可能であることを示唆している。

2) 硫酸化糖の抗プリオン活性

硫酸デキストランや硫酸ペントサン (PPS) などの硫酸化糖は、プリオン接種と同時に投与すると、プリオン感染を防御することが古くから報告されていた^{31,32)}。その後、硫酸化糖が Sc⁺MNB の PrP^{Sc} 増殖を阻害することも報告された¹³⁾。硫酸化糖の PrP^{Sc} 増殖抑制機構として、PrP^C のエンドサイトーシスを促進して PrP^C の分解を促進するなど、PrP^C の代謝経路に影響をおよぼす可能性が示唆されている^{27,33)}。しかしポリアニオンという性質から、末梢から投与しても血液脳関門の通過は期待できない。堂浦らは、PPS の脳室内投与が、プリオン感染マウスで有意な延命効果があることを報告した³⁴⁾。この発見をもとに、英国で人プリオン病患者の PPS 投与が開始されている。GAG のような天然型の硫酸化糖は硫酸化部位がランダムに硫酸化されているので、構造活性相関を解析することが困難である。硫酸化糖の抗プリオン活性に重要な基本構造が判るならば、より高い抗プリオン活性を持つ硫酸化糖の開発につながる事が期待できる。筆者らは、部位特異的に硫酸基やアセチル基が配座する人工合成硫酸化糖とそのポリマーの PrP^{Sc} 産生抑制効果について検討しているが、4 位または 6 位の硫酸基と 2 位の N-アセチル基を有するグルコース配糖体が PrP^{Sc} 産生抑制活性があることを見出している (図 6, 未発表)。

おわりに

“プリオン” の概念が提唱されてから 20 年以上が経過した。難解な感染症の病原体の謎も徐々に紐解かれつつある。しかし、プリオンおよびプリオン病に対峙するためには、プリオン増殖の分子機構解明、神経変性機序の解明など、一層の基盤研究の進展が不可欠である。我が国では、今後数年間は BSE 感染牛が散発的に摘発されることが予想される。BSE の感染拡大防止には、BSE スクリーニング/サーベイランス、特定危険部位の除去、飼料規制を継続する必要がある。BSE は牛から人へ感染が拡大し、さらに輸血により人から人へ感染が広がることも明らかとなった。医薬品原料などのプリオン汚染の評価、その他の汚染源の摘発

のためには、高感度プリオン検出技術の開発が望まれる。

脳内の PrP^{Sc} 増殖を抑えることで、病気の進行を抑制できるかもしれない。培養細胞レベルの実験系では PrP^{Sc} 増殖抑制活性を有する物質が数多く報告されている。しかし、血液-脳関門の通過、あるいは毒性の問題など、治療法開発には多くの課題が残されている。今後は、in vivo の試験により、これらの問題を解決し、実用的かつ効果的な治療法の模索に力を注ぐ必要がある。PrP^{Sc} の増殖阻害により病気の進行は抑えられるかもしれないが、回復を考えた場合、変性した神経組織の再生も考慮する必要があるだろう。PrP^{Sc} の増殖抑制効果と神経再生効果を併せ持つ治療法は、効果的な治療法を提供するかもしれない。

謝 辞

研究材料および情報を提供いただいた、動物衛生研究所・プリオン病研究センター・品川森一、横山隆、国立感染症研究所・佐多徹太郎、山河芳男、の諸先生に感謝致します。また、ここに示した結果の一部は、帯広畜産大学・古岡秀文、名古屋大学・西田芳弘、産業技術総合研究所・鶴沢浩隆、の諸先生との共同研究によるものです。

文 献

- 1) Hilton DA, Ghani AC, Conyers L, Edwards P, McCardle L, Ritchie D, Penney M, Hegazy D, Ironside JW. : Prevalence of lymphoreticular prion protein accumulation in UK tissue samples. *J Pathol* 203: 733-739, 2004.
- 2) Llewelyn CA, Hewitt PE, Knight RS, Amar K, Cousens S, Mackenzie J, Will RG. : Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet* 363: 417-421, 2004.
- 3) Peden AH, Head MW, Ritchie DL, Bell JE, Ironside JW. : Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient. *Lancet* 364: 527-529, 2004.
- 4) OIE : Number of reported cases of bovine spongiform encephalopathy (BSE) in farmed cattle worldwide. http://www.oie.int/eng/info/en_esbmonde.htm
- 5) 牛海綿状脳症 (BSE) 関係] ホームページ (Q & A など) <http://www.mhlw.go.jp/kinkyu/bse.html>
- 6) The evaluation of tests for the diagnosis of transmissible spongiform encephalopathy in bovines. European Commission, 1999.
- 7) The evaluation of five rapid tests for the diagnosis of transmissible spongiform encephalopathy in bovines (2ND study), European Commission, 2002.
- 8) The evaluation of 10 rapid post mortem tests for the diagnosis of transmissible spongiform encephalopathy in bovines, European Commission, 2004.
- 9) Safar J, Wille H, Itri V, Groth D, Serban H, Torchia M, Cohen FE, Prusiner SB. : Eight prion strains have PrP^{Sc} molecules with different conformations. *Nat*

- Med 4: 1157-1165, 1998.
- 10) Iwamaru Y, Okubo Y, Ikeda T, Hayashi H, Imamura M, Yokoyama T, Shinagawa M. : PrPSc distribution of a natural case of bovine spongiform encephalopathy. International Symposium Prion Disease Food and Drug Safety, Sendai, Japan 2004.
 - 11) Deslys JP, Comoy E, Hawkins S, Simon S, Schimmel H, Wells G, Grassi J, Moynagh J. : Screening slaughtered cattle for BSE. *Nature* 409: 476-478, 2001.
 - 12) Safar JG, Scott M, Monaghan J, Deering C, Didorenko S, Vergara J, Ball H, Legname G, Leclerc E, Solfrosi L, Serban H, Groth D, Burton DR, Prusiner SB, Williamson RA. : Measuring prions causing bovine spongiform encephalopathy or chronic wasting disease by immunoassays and transgenic mice. *Nat Biotechnol* 20: 1147-1150, 2002.
 - 13) Caughey B, Raymond GJ. : Sulfated polyanion inhibition of scrapie-associated PrP accumulation in cultured cells. *J Virol* 67: 643-50, 1993.
 - 14) Mange A, Nishida N, Milharet O, McMahon HE, Casanova D, Lehmann S. : Amphotericin B inhibits the generation of the scrapie isoform of the prion protein in infected cultures. *J Virol* 74: 3135-3140, 2000.
 - 15) Caughey B, Horiuchi M, Demaimay R, Raymond GJ. : Inhibition of protease-resistant prion protein formation by porphyrins and phthalocyanines. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 12117-12122, 1998.
 - 16) Doh-Ura K, Iwaki T, Caughey B. : Lysosomotropic agents and cysteine protease inhibitors inhibit scrapie-associated prion protein accumulation. *J Virol* 74: 4894-4897, 2000.
 - 17) Korth C, May BC, Cohen FE, Prusiner SB. : Acridine and phenothiazine derivatives as pharmacotherapeutics for prion disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 9836-9841, 2001.
 - 18) Supattapone S, Wille H, Uyechi L, Safar J, Tremblay P, Szoka FC, Cohen FE, Prusiner SB, Scott MR. : Branched polyamines cure prion-infected neuroblastoma cells. *J Virol* 75: 3453-3461, 2001.
 - 19) Kocisko DA, Baron GS, Rubenstein R, Chen J, Kuizon S, Caughey B. : New inhibitors of scrapie-associated prion protein formation in a library of 2000 drugs and natural products. *J Virol* 77: 10288-10294, 2003.
 - 20) Ishikawa K, Doh-ura K, Kudo Y, Nishida N, Murakami-Kubo I, Ando Y, Sawada T, Iwaki T. : Amyloid imaging probes are useful for detection of prion plaques and treatment of transmissible spongiform encephalopathies. *J Gen Virol* 85: 1785-1790, 2004.
 - 21) Chabry J, Caughey B, Chesebro B. : Specific inhibition of in vitro formation of protease-resistant prion protein by synthetic peptides. *J Biol Chem* 273: 13203-13207, 1998.
 - 22) Soto C, Kascsak RJ, Saborio GP, Aucouturier P, Wisniewski T, Prelli F, Kascsak R, Mendez E, Harris DA, Ironside J, Tagliavini F, Carp RI, Frangione B. : Reversion of prion protein conformational changes by synthetic beta-sheet breaker peptides. *Lancet* 355: 192-197, 2000.
 - 23) Kaneko K, Zulianello L, Scott M, Cooper CM, Wallace AC, James TL, Cohen FE, Prusiner SB. : Evidence for protein X binding to a discontinuous epitope on the cellular prion protein during scrapie prion propagation. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 10069-10074, 1997.
 - 24) Daude N, Marella M, Chabry J. : Specific inhibition of pathological prion protein accumulation by small interfering RNAs. *J Cell Sci* 116: 2775-2779, 2003.
 - 25) Enari M, Flechsig E, Weissmann C. : Scrapie prion protein accumulation by scrapie-infected neuroblastoma cells abrogated by exposure to a prion protein antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 9295-9299, 2001.
 - 26) Peretz D, Williamson RA, Kaneko K, Vergara J, Leclerc E, Schmitt-Ulms G, Mehlhorn IR, Legname G, Wormald MR, Rudd PM, Dwek RA, Burton DR, Prusiner SB. : Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity. *Nature* 412: 739-743, 2001.
 - 27) Kim CL, Karino A, Ishiguro N, Shinagawa M, Sato M, Horiuchi M. : Cell-surface retention of PrPC by anti-PrP antibody prevents protease-resistant PrP formation. *J Gen Virol* 85: 3473-3482, 2004.
 - 28) Heppner FL, Musahl C, Arrighi I, Klein MA, Rulicke T, Oesch B, Zinkernagel RM, Kalinke U, Aguzzi A. : Prevention of scrapie pathogenesis by transgenic expression of anti-prion protein antibodies. *Science* 294: 178-182, 2001.
 - 29) White AR, Enever P, Tayebi M, Mushens R, Linehan J, Brandner S, Anstee D, Collinge J, Hawke S. : Monoclonal antibodies inhibit prion replication and delay the development of prion disease. *Nature* 422: 80-83, 2003.
 - 30) Sigurdsson EM, Brown DR, Daniels M, Kascsak RJ, Kascsak R, Carp R, Meeker HC, Frangione B, Wisniewski T. : Immunization delays the onset of prion disease in mice. *Am J Pathol* 161: 13-17, 2002.
 - 31) Ehlers B, Diringer H. : Dextran sulphate 500 delays and prevents mouse scrapie by impairment of agent replication in spleen. *J Gen Virol* 65: 1325-1330, 1984.
 - 32) Diringer H, Ehlers B. : Chemoprophylaxis of scrapie in mice. *J Gen Virol* 72: 457-460, 1991.
 - 33) Shyng SL, Lehmann S, Moulder KL, Harris DA. : Sulfated glycans stimulate endocytosis of the cellular isoform of the prion protein, PrPC, in cultured cells. *J Biol Chem* 270: 30221-30229, 1995.
 - 34) Doh-ura K, Ishikawa K, Murakami-Kubo I, Sasaki K, Mohri S, Race R, Iwaki T. : Treatment of transmissible spongiform encephalopathy by intraventricular drug infusion in animal models. *J Virol* 78: 4999-5006, 2004.

Prion diseases as zoonosis

Motohiro HORIUCHI

Laboratory of Prion Diseases, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University
Kita 18, Nishi 9, Kita-ku, Sapporo 060-0818, JAPAN
E-mail : horiuchi@vetmed.hokudai.ac.jp

Prion diseases such as bovine spongiform encephalopathy (BSE) have been recognized as zoonosis since the existence of variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD) was reported in 1996. BSE became a serious social problem even in Japan after the first BSE case was found in 2001. The incidence of BSE in EU and UK appears declining, and the vCJD incidence also shows a tendency to decrease. On the contrary, fears for the spread of BSE became actual problems: BSE occurrence outside of EU, transmission of vCJD by blood transfusion, and the first vCJD case in Japan. To prevent further spread and to reduce the risk of BSE, it is important to continue BSE screening/surveillance, removal of specified risk materials from food and feed chains, and effective feed regulation. For the disclosure and elimination of prion-contaminated blood, materials for medical and pharmaceutical products and so on, it is required to improve the sensitivity of prion detection methods. Furthermore, it is also important to establish therapeutics of human prion diseases.

原 著

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

水沢左衛子^{1)h)} 岡田 義昭^{1)a)h)} 堀内 善信^{2)h)} 田中 建志^{3)h)}
佐藤 功栄^{3)b)} 金子 健二^{4)a)b)} 佐々木祐子^{5)b)} 田中 利明^{6)a)}
伴野 丞計^{7)a)} 友水 健雄^{4)h)} 速水 照一^{5)a)h)} 土方美奈子^{8)h)c)}
平子 一郎^{9)a)b)d)} 真弓 忠^{10)a)} 三上 貢一^{11)a)b)e)} 三代 俊治^{8)a)b)}
宮本 誠二^{12)a)h)} 牟田 健吾^{12)h)} Thomas Weimer^{13)h)}
Todd Gierman^{14)b)} 小室 勝利^{1)a)} 山口 照英^{15)a)}

- ¹⁾国立感染症研究所血液・安全性研究部, ²⁾国立感染症研究所細菌第二部, ³⁾埼玉県赤十字血液センター,
⁴⁾日本製薬株式会社, ⁵⁾株式会社ベネシス, ⁶⁾バクスター株式会社バイオサイエンス事業部,
⁷⁾日本赤十字社血漿分画センター, ⁸⁾東芝病院研究部, ⁹⁾バイエル薬品株式会社, ¹⁰⁾自治医科大学,
¹¹⁾アベンティス ファーマ株式会社, ¹²⁾財団法人化学及血清療法研究所, ¹³⁾アベンティス ベーリング,
¹⁴⁾バイエルヘルスケア, ¹⁵⁾国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞薬品部,
^{a)}血液事業部会安全技術調査会 血漿分画製剤の安全性確保対策の検討小委員会
(委員長: 国立医薬品食品衛生研究所 山口照英),
^{b)}NAT 国内標準品作製のための共同研究グループ
^{c)}現国立国際医療センター研究所呼吸器疾患研究部,
^{d)}現シェリング・プラウ株式会社, ^{e)}現バイエル薬品株式会社

(平成 17 年 1 月 5 日受付)

(平成 17 年 5 月 6 日受理)

ESTABLISHMENT OF THE FIRST NATIONAL STANDARD FOR NUCLEIC ACID AMPLIFICATION TECHNOLOGY ASSAY FOR HCV RNA

Saeko Mizusawa^{1)b)}, Yoshiaki Okada^{1)a)b)}, Yoshinobu Horiuchi^{2)b)}, Takeshi Tanaka^{3)b)},
Koei Sato^{3)b)}, Kenji Kaneko^{4)a)b)}, Yuko Sasaki^{5)b)}, Toshiaki Tanaka^{6)a)},
Tsugikazu Tomono^{7)a)}, Takeo Tomomizu^{4)b)}, Shouichi Hayami^{5)a)b)}, Minako Hijikata^{8)b)c)},
Ichiro Hirako^{9)a)b)d)}, Makoto Mayumi^{10)a)}, Koichi Mikami^{11)a)b)e)}, Shunji Mishiro^{8)a)b)},
Seiji Miyamoto^{12)a)b)}, Kengo Muta^{12)b)}, Thomas Weimer^{13)b)}, Todd Gierman^{14)b)},
Katsutoshi Komuro^{1)a)} and Teruhide Yamaguchi^{15)a)}

- ¹⁾Department of Blood and Safety Research, The National Institute of Infectious Diseases,
²⁾Department of Bacteriology II, The National Institute of Infectious Diseases,
³⁾Japanese Red Cross Saitama Blood Center, ⁴⁾Nihon Pharmaceutical Co. Ltd.,
⁵⁾Benesis Corporation, ⁶⁾Baxter Limited BioScience, ⁷⁾Japanese Red Cross Plasma Fractionation Center,
⁸⁾Department of Medical Science, Toshiba General Hospital, ⁹⁾Bayer Yakuhin Ltd.,
¹⁰⁾Jichi Medical School, ¹¹⁾Aventis Pharma Co. Ltd.,
¹²⁾The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute, ¹³⁾Aventis Behring Ltd., ¹⁴⁾Bayer Healthcare,
¹⁵⁾Division of Cellular and Gene Therapy Products, National Institute of Health Science,

^{a)}Subcommittee on Safety for Plasma-Derived Products

(Chairman : Teruhide Yamaguchi, National Institute of Health Sciences),

^{b)}Working Group on the Establishment of National Standards for Nucleic Acid Technology Assay,

Present address ; ^{c)}Department of Respiratory Diseases, Research Institute,

International Medical Center of Japan., ^{d)}Schering-Plough K.K., ^{e)}Bayer Yakuhin, Ltd.

The First WHO International Standard for HCV RNA for Nucleic Acid Amplification Technology (NAT) Assay (96/790) was established in 1997. The aim of our collaborative study was the establishment of the Japanese National Standard for HCV RNA calibrated against the WHO International Standard. The candidate materials were evaluated in the following two steps. First, titers of two HCV positive plasma (119 and 122) diluted in cryosupernatant were evaluated, and plasma 122 was chosen as the source plasma for the candidate for the national standard. Then, candidate 122 was prepared by diluting the source plasma to approximately 10^5 international units (IU)/ml in cryosupernatant. The relative potency of the candidate was measured against the International Standard by the end-point method. Seven laboratories from three countries participated in the collaborative study. Four laboratories used the Roche Amplicor assay (Version 1) and 3 laboratories used in-house PCR methods. There was reasonable agreement among the mean estimates from the laboratories. The overall mean potency of the candidate relative to the International Standard was $10^{5.00}$ ($10^{4.80} \sim 10^{5.20}$) IU/ml. The sample was accepted as the first Japanese national standard and assigned a titer of 100,000 IU/ml. Each vial of the National Standard contains 0.5 ml of HCV plasma (genotype 1b) diluted in cryosupernatant and should be stored at -80°C .

Key words : HCV, The WHO International Standard, National Standard, Nucleic acid technology (NAT) assay, Blood safety

1. はじめに

供血者のC型肝炎ウイルス(HCV)に対する抗体スクリーニングを実施したにもかかわらずヨーロッパとアメリカ合衆国では血漿分画製剤によるHCVの感染が報告された。これは、HCVに感染してから抗体が検出されるまでのウィンドウ期の血漿が原料血漿に混入していたためと考えられた¹⁾²⁾。そこで、血液製剤のより一層のウイルス学的安全性の確保を目的としてヨーロッパでは1999年7月1日から原料血漿プールでHCV-RNAの核酸増幅検査(NAT)を実施することになった。すでにイギリスをはじめオランダ、ドイツ、イタリア、アメリカ合衆国の各国では標準品やランコントロールを作製しており、NATを実施する施設で使用されていたが、HCV-RNA量がコピー数やgenome equivalent等まちまちの単位で表示されていたので、標準品のHCV-RNA量やNAT法の感度を相互に比較することが出来なかった。イギリスのNIBSCによってHCV-RNA

の国際標準品作製のための国際共同研究が組織され、1997年10月にWHO国際標準品(96/790)が制定され、国際単位を用いて各国参照品の力価を比較することが可能になった³⁾⁴⁾。わが国においては厚生省告示第427号によって、平成13年3月1日から製造され、又は輸入される血液製剤の原料血漿についてB型肝炎ウイルスDNA、C型肝炎ウイルスRNA及びヒト免疫不全ウイルスRNAに対するNATを実施しなければならないことに改められた。実際にはそれ以前に日本赤十字社の献血血液とすべての血漿分画製剤製造所の原料血漿プールについてHCV-RNAのNATが実施された。しかし、施設ごとにNAT法が異なり、自家標準品やキットの標準品の表示単位が統一されていなかったため、それぞれの施設での感度や精度を比較・評価することができなかった。国際単位で表示された広く認められた標準品を用いて感度や精度を測定することにより、施設間の比較や評価が可能になると考えられた。一方、国際標準品

はその配布数も限られており、国際標準品に対して較正された我が国独自の国内標準品の作製が望まれていた。そこで、血漿分画製剤の安全性確保対策の検討小委員会（以下、小委員会と略）はHCV-RNA量を国際単位で表示した国内標準品を作製するための共同研究を組織し、第一次HCV-RNA国内標準品を作製したので報告する。国際標準品はgenotype 1であるが、国内標準品は我が国で最も頻度の高いgenotype 1bとした。現在、さまざまなウイルスについて臨床や研究の場でNATが実施されているが、国内標準品として定められたものはまだない。その意味で、本標準品は我が国で初めて作製されたウイルスのNATのための国内標準品でもある。

2. 材料および方法

1) 国内標準品候補の原料血漿の選択

日本赤十字社より供与されたHBs抗原、抗HIV-1/2抗体、HBV-DNA、HIV-RNAのすべてが陰性で、HCV陽性の血漿の中から日本で最も高頻度に見られるgenotype 1bの2つの血漿（119と122）を標準品の原料候補とした。各原料血漿の一部を脱クリオプール血漿で約 10^6 国際単位（IU）/mlに希釈して -80°C で凍結・保存した試料を調製し、HCV-RNA国際標準品とともに参加施設に配布した。各施設は測定ごとに新しいバイアルの候補品を脱クリオ血漿で希釈して10倍希釈系列（ 10^{-1} から 10^{-7} ）を調製することとし、日を替えて2回定性的な方法でエンドポイントの測定を実施した。一重測定を原則としたが、日常的に二重測定を実施している場合は二重測定した（第1回測定）。このとき使用した国際標準品は小分けして -80°C に凍結保存して第2回測定に用いた。

2) HCV-RNA国内標準品候補の作製と評価

1) で選択した血漿122（PHA力価 2^{14} 、RNA量 $2\sim 3\times 10^6$ IU/ml、容量185ml）をあらためて約 10^6 IU/mlに脱クリオ血漿で希釈、0.5mlずつガラス瓶に分注し -80°C で凍結して、HCV-RNA国内参照品候補122（候補品）とし、参加施設に送付した。各施設は初回は10倍希釈系列で予備的なエンドポイントを測定し、より正確なエンドポイントの値を得るために2回目以降はそのエンドポイン

トをはさんで7段階の $10^{0.5}$ 希釈系列を測定ごとに調製し、日を替えて4回測定を実施した（第2回測定）。参加施設から返送された結果を集計して、HCV-RNA国内標準品候補のWHO国際標準品に対する力価を推定した。

3) 参加施設と測定方法

日常的にHCV-NATを実施している9施設（国内6施設、米国2施設、ヨーロッパ1施設）に候補品を配布し、7施設（国内5施設、米国1施設、ヨーロッパ1施設）から試験結果が返送された。核酸の抽出と増幅の方法は各施設の任意の方法で実施した。

4) 測定値の分析

候補品、国際標準品についてそれぞれのエンドポイント濃度の対数値の平均を求め、その比を国際標準品に対する候補品の対数相対力価とする。施設ごとに国際標準品に対する候補品の対数相対力価とその95%信頼区間を推定した。7施設から得られた対数相対力価の加重平均を求めて候補品の対数相対力価を推定した。対数相対力価の真数は国際標準品に対する候補品の相対力価を現すので、真数の値を国際標準品の力価に乗じて候補品の力価を推定した。

3. 結果

1) 参加施設が実施した測定方法

血漿分画製剤製造所5施設（国内3、海外2）、公的機関1施設、その他1施設の合計7施設から結果が返送された。Table 1に参加施設を表すコード番号、抽出法、検出法を示す。4施設がアンプリコアHCV（Ver. 1）変法、2施設が自家法のnested PCR法、1施設が自家法のsingle PCR法を用いて測定した。反応当たりの試料の量は40～400 μ lの血漿に相当した。

2) 原料血漿の選択

国内標準品は様々なNAT法に使用されるので、候補品にふさわしい原料を選択する目的で、第一回測定では2つのHCV陽性血漿119と122を希釈した試料を配布して測定した。大きな相違がなかったので、より多くの標準品の作製が可能のように容量の大きい血漿122を候補品の原料として選択した。血漿122のHCVコア領域の塩基

Table 1 Assays used in the collaborative study.

Laboratory	Assay	Extraction ^a	Eq. Vol. Amplified ^b
1	Amplicor	R&D	100
2	In-house single PCR	In-house NaI	40
3	Amplicor	Amplicor	50
4	Amplicor	R&D	100
5	Amplicor	QIAamp	400
6	In-house nested PCR	R&D	100
7	In-house nested PCR	R&D	100

a) R&D : Smi-test EX-R&D (Nippon Genetics Co. Ltd.)

Amplicor : Amplicor HCV version 1 (Roche)

QIAamp : QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN)

b) Eq. Vol. Amplified: the equivalent volume of sample that was amplified in an assay

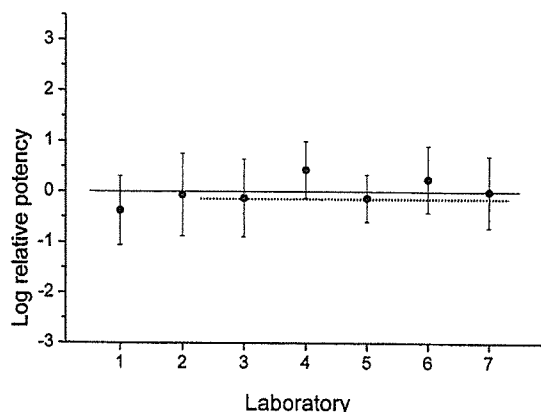


Fig. 1 Log relative potency of candidate 122 to the international standard (96/790). The laboratory code number and assay methods are explained in Table 1. The solid line indicates the mean log relative potency calculated from all data, $-0.001 (-0.204 + 0.201)$. The dotted line indicates the mean log relative potency calculated from the data excluding those of the laboratories 1 and 2, $+0.066 (-0.161 + 0.292)$.

配列を決定して genotype 1b であることを確認した。

3) 候補品 122 の国際標準品 (96/790) に対する力価の推定

あらためて候補品を送付し、7施設において $10^{0.5}$ 稀釈系列で測定した(第2回測定)。5施設で独立の4回の測定、2施設で各2回繰り返し測定を独立に4回行った。エンドポイント法により国際標準品に対する候補品の対数相対力価を求め

Table 2 Estimated log potency of candidate 122 calibrated against the international standard (96/790). Overall (a) = the overall mean log potency calculated from all laboratories. Overall (b) = the overall mean log potency calculated from data excluding those of laboratories 1 and 2.

Laboratory	log ₁₀ IU/ml		
	Mean	Minimum	Maximum
1	4.63	3.94	5.31
2	4.94	4.12	5.75
3	4.88	4.11	5.66
4	5.44	4.88	6.00
5	4.88	4.41	5.34
6	5.25	4.59	5.91
7	5.00	4.29	5.71
Overall (a)	5.00	4.80	5.20
Overall (b)	5.07	4.84	5.29

た。なお、エンドポイントが最大希釈と同等となった場合は最大希釈をエンドポイントとした。また、不連続な陽性結果を含む場合は希釈率の高いほうをエンドポイントとした。施設毎に候補品の国際標準品に対する対数相対力価とその95%信頼区間を求め、全施設の測定結果を用いて候補品の国際標準品に対する対数相対力価を推定した。Fig. 1に示すように全施設の結果は誤差の範囲で一致し、国際標準品に対する候補品の対数相対力価の平均は $\log 10^{-0.001}$ であった。WHO国際標準品(96/790)の力価は 10^5 IU/ml であるから、候補品の力価は $10^{5.00} (10^{4.80 \sim 5.20})$ IU/ml、即ち 100,000 IU/ml

と推定された (Table 2).

参加7施設中, 施設1では測定4回中3回でエンドポイントが最大希釈と同等となった. また施設2では不連続な陽性結果が多く, 測定結果のばらつきが大きかった. そこで, この2施設を除く5施設の測定結果を用いて分析した結果, 5施設の結果は誤差の範囲で一致し, 国際標準品に対する候補品の対数相対力価の平均は $\log_{10} 0.066$ であった (Fig. 1). よって, 候補品の力価は $10^{5.07}$ ($10^{4.84 \sim 5.29}$) IU/ml, 即ち 116,300 IU/ml と推定され, 全施設の結果を用いた分析結果と有意な相違は認められなかった (Table 2). 最尤法で本研究の測定値を分析すると候補品の推定力価は $10^{5.07}$ ($10^{4.86 \sim 5.30}$) IU/ml となり, 2つの分析法による推定値はよく一致した.

以上の結果から, 候補品122の国際標準品に対する力価は $10^{5.00}$ IU/ml と推定され, 力価100,000 IU/ml の国内標準品として1999年12月に小委員会承認された.

4. 考 察

一般に個々の施設で国際標準品に対する2次標準品を作製すると新たな誤差が生じるので, 異なる2次標準品を用いて測定した結果を相互に比較するのは困難である. HCV-RNA NAT 試験において異なる施設間での測定値の比較や施設毎の検出感度の管理を実施するためには性状が詳しく調べてある広く認められた共通の標準品が必須である. 本共同研究によってわが国で初めて, 国際単位表示されたHCV-RNAの国内標準品が制定された. 候補品の95%信頼区間は力価 $10^{5.00}$ IU/ml に対して $10^{4.80 \sim 5.20}$ IU/ml であった. また参加施設のなかの力価の最大は $10^{5.44}$ IU/ml (施設4), 最小は $10^{4.63}$ IU/ml (施設1) で $10^{0.81}$ 倍の相違であった (Table 2). これらの値はエンドポイントの測定を $10^{0.5}$ 倍希釈系列で実施したことを考慮すると十分に小さいといえる. これは本共同研究の参加施設を日常的にHCV-NATを実施している信頼性の高い施設に限ったためと考えられる. 国内標準品は分与される予定であるので, 血液製剤の安全性確保のためのNAT試験法や診断薬の評価, 臨床

検査センターにおけるHCV-RNA検査の評価に広く用いられるようになれば, 相互の性能を容易に比較することが可能になり, 試験法・検査技術の向上が期待できる. 各施設で国内標準品を用いて繰り返し測定することにより有効検出限界の推定値を得ることが可能である. こうして得られた有効検出限界をもとに, たとえば95%陽性反応を得られる濃度と50%陽性反応を得られる濃度の標準品を常に測定に加えた測定結果を集積し, 継続的に各試験法の感度管理の精度向上を図ることが望まれる.

5. 結 論

血漿のHCV-RNAのNATのための国内標準品を作製した. 国内標準品はHCV抗体陽性のHCV genotype 1b陽性血漿を脱クリオ血漿で希釈し, 0.5ml ずつバイアルに分注, -80°C で凍結保存したもので, その力価は100,000 IU/ml である.

謝辞: 本研究で作製した国内標準品は国内献血血液から製造された. 本共同研究は厚生労働省科学研究費補助金「医薬安全総合研究事業, 血液製剤の安全性向上に必要な試験法評価法の開発と改良に関する研究」の助成により行われた.

文 献

- 1) Yu MW, Mason BL, Guo ZP, Tankersley DL, Nedjar S, Mitchell FD, Biswas RM, Nübling CM, Willkommen H, and Lower J: Hepatitis C transmission associated with intravenous immunoglobulins. *Lancet*, 345: 1173—1174, 1995.
- 2) Vrielink H, van der Poel CL, Reesink HW, Zaaijer HL, Lelie PN: Transmission of hepatitis C virus by anti-HCV-negative blood transfusion. *Vox Sang*, 68: 55—56, 1995.
- 3) Saldanha J, Lelie N, Heath A and WHO Collaborative Study Group: Establishment of the first international standard for nucleic acid amplification technology (NAT) assays for HCV RNA. *Vox Sang*, 76: 149—158, 1999.
- 4) Saldanha J, Heath A, Lelie N, Pisani G, Nübling M, Yu M and The Collaborative Study Group: Calibration of HCV working reagents for NAT assays against the HCV international standard. *Vox Sang*, 78: 217—224, 2000.

特 論

動物由来感染症としてのプリオン病

堀内基広

Prion diseases as infectious disease transmissible from animals to humans

Motohiro Horiuchi

Laboratory of Prion Diseases, Graduate School of Veterinary Medicine,
Hokkaido University

Abstract

Prion diseases such as bovine spongiform encephalopathy (BSE) have been recognized as zoonosis since the existence of variant Creutzfeldt–Jakob disease (vCJD) was reported in 1996. After then, BSE became a serious social problem all over the world. The incidence of BSE in EU and UK appears declining, and the vCJD incidence also shows a tendency to decrease. On the contrary, fears for the spread of BSE became actual problems: BSE occurrence outside of EU, introduction of BSE to other ruminants, and transmission of vCJD by blood transfusion. To prevent further spread of animal prion diseases and to reduce their risk to human being, active surveillance for animal prion diseases, removal of specified risk materials from food and feed chains, and effective feed regulation for livestock should be important. For the disclosure and elimination of prion-contaminated blood, materials for medical and pharmaceutical products, it is required to improve the sensitivity of prion detection methods. Furthermore, establishment of the therapeutics for human prion diseases is urgent problem.

Key words: prion, BSE, CJD

はじめに

プリオン病は原因論から感染性、遺伝性、孤発性に分類される(表1)。動物のプリオン病は病原体(プリオン)が体外から侵入することが原因の感染性プリオン病である。ヒツジのスクレイピーとシカの慢性消耗病(CWD)は自然状態でそれぞれの宿主で感染が成立する。牛海綿状脳症(BSE)以下の動物プリオン病はプリオンに汚染された飼料の給餌が原因である。

ヒトのプリオン病のうち, kuru, 医原性 Creutzfeldt–Jakob 病(iCJD), および BSE がヒトに伝播した変異 CJD は感染性プリオン病に分類される。家族性 CJD, Gerstmann–Sträussler 症候群, および致死性家族性不眠症の遺伝性プリオン病は PrP 遺伝子の変異が原因である。ヒトのプリオン病の約 80% を占める孤発性 CJD は, プリオンの感染および PrP 遺伝子の変異とは関連がなく, 孤発性プリオン病に分類される。

表 1 プリオン病の分類

動物のプリオン病	宿主, 発生動物
スクレイピー	ヒツジ, ヤギ
慢性消耗病 (chronic wasting disease: CWD)	シカ, エルク
牛海綿状脳症 (bovine spongiform encephalopathy: BSE)	ウシ
伝達性ミンク脳症 (transmissible mink encephalopathy: TME)	ミンク
猫科動物の海綿状脳症 (feline spongiform encephalopathy: FSE)	家猫, ピューマ, チーター, オセロットなど
その他の反芻動物の海綿状脳症	クドゥー, エランド, ニアラ, オリックスなど

ヒトのプリオン病	原因
Creutzfeldt-Jakob 病 (CJD)	
孤発性 Creutzfeldt-Jakob 病 (sCJD)	孤発 (不明)
家族性 Creutzfeldt-Jakob 病 (fCJD)	遺 伝
医原性 Creutzfeldt-Jakob 病 (iCJD)	感 染
変異 Creutzfeldt-Jakob 病 (vCJD)	感 染
Gerstmann-Straüssler 症候群 (GSS)	遺 伝
家族性致死性不眠症 (FFI)	遺 伝
クールー	感 染

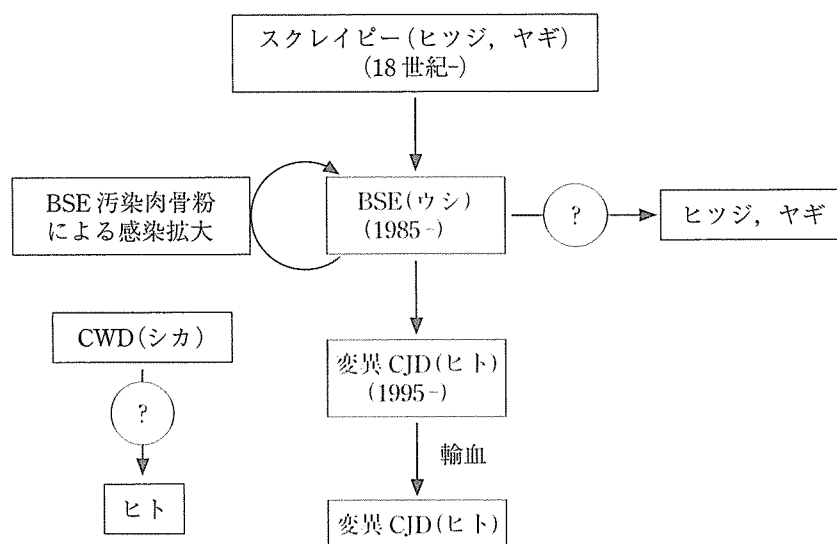


図 1 動物プリオン病の感染の拡大

1. 感染の拡大

a. 動物種を越えた感染の拡大 (図 1)

BSE の発生原因はヒツジスクレイピー病原体に汚染された肉骨粉の給餌と考えられている (ヒツジ起源説)。イギリスでは 1920 年頃から蛋白質源として肉骨粉を濃厚飼料や代用乳に添加して使用していたが, BSE の発生は 1985 年以降であるので, BSE の発生には何らかの要因

が関与している。この要因はレンダリング工程の簡略化であると推測されている。1980 年以前は熱処理, それに続く有機溶媒による獣脂の抽出が行われていた。この一連の工程によりスクレイピー病原体は不活化されていたと考えられる。しかし, 1980-83 年にかけて有機溶媒抽出が行われなくなった。その結果, 病原体が完全に不活化されずに肉骨粉中に残存したと考えられている。また, BSE の発生はウシの孤発性