

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患克服研究事業

プリオン病 2 次感染に対する現実的滅菌法の開発研究

平成 1 9 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 北本 哲之

平成 2 0 年 ( 2 0 0 8 年 ) 3 月

# 目 次

ページ

## I. 総括研究報告書

- プリオン病2次感染に対する現実的滅菌法の開発研究 . . . . 1  
北本 哲之 (東北大学大学院医学系研究科)

## II. 分担研究報告書

- プリオン感染実験 . . . . 10  
異常化の起こりやすいプリオン蛋白の設計に関する研究  
北本 哲之 (東北大学大学院医学系研究科)

- 手術器具付着ヒトプリオンの現実的除染方法の開発 . . . . 13  
毛利 資郎 (動物衛生研究所 プリオン病研究センター)

- SDS処理によるステンレス刃の切れ味定量解析 . . . . 16  
赤池 義明 (テルモ株式会社 富士宮工場)

- SDS処理によるステンレス刃の電顕的検討 . . . . 18  
秋田 定伯 (長崎大学医学部 歯学部附属病院)

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表 . . . . 23

## IV. 研究成果の刊行物・印刷 . . . . 27

# 総括研究報告

## プリオン病2次感染に対する現実的滅菌法の開発研究

主任研究者：北本 哲之 東北大学大学院医学系研究科・教授

### 研究要旨

本研究は、世界最高感度のヒト化マウスモデルを利用して、ヒト・プリオンの滅菌を定量的に評価し、現実的な滅菌法を開発することを目的としている。本年度は、すでに SDS 煮沸滅菌法を評価すべく感染実験を始めたところである。さらに、SDS 以外の滅菌法も評価すべく情報収集も行い始めた。本年度の特筆すべき成果として以下の結果を得た。プリオン滅菌に有効な SDS 煮沸を50回繰り返してもステンレス注射針の切れ味、超微形態が蒸留水煮沸となんら変わらず、ほとんど腐食しないということが明かとなった。さらに、SDS 滅菌後に通常の流水洗浄では SDS 成分が残存するが、超音波洗浄をおこなうとこのような SDS 残存を防ぐことを明かとした。

### 分担研究者

毛利資郎	動物衛生研究所 プリオン病研究センター・センター長
赤池義明	テルモ株式会社富士宮工場 工場長代理
秋田定伯	長崎大学医学部・歯学部附属病院・助教

## A. 研究目的

プリオン病の 2 次感染に対する現実的滅菌法を樹立することが本研究の目的である。

## B. 研究方法

### SDS 滅菌法

#### ○ ヒトプリオンを使った滅菌法

従来の滅菌法の検討に使用されたプリオンは、スクレピーモデル動物、CJD モデルマウス、BSE モデルマウスというようにヒトのプリオンを使用した検討ではなかった。そこで、本研究ではモデル動物ではなく実際にヒトのプリオン、中でもわが国の CJD サーベイランスによって最も多い CJD の MM1 (コドン 129 Met/Met で異常プリオン蛋白がタイプ 1) のプリオンを用いてヒトプリオンに対して高い感受性を示す Ki-ChM マウスを用いて感染実験を行った。具体的な方法は毛利らの報告書に記載されている。

#### ○ SDS による器具の耐久性試験：定量

SDS 滅菌法を導入にあたり、手術器具の磨耗、切れ味の劣化などが懸念された。この危惧に対して、SDS 煮沸法を 50 回繰り返し手術器具の切れ味がどう変化するかをシュミレーションする実験を計画した。具体的な方法は、赤池らの報告書に譲るが注射針の切れ味を定量化することによって、3% SDS 煮沸と蒸留水での煮沸で注射針の切れ味を比較検討した。

#### ○ SDS による器具の耐久性試験：定性

SDS 耐久性試験のもうひとつの検討方法は、直接注射針を走査型電子顕微鏡で観察するという方法をとった。具体的な方法は、秋田らの報告書を参照していただ

きたい。

### その他の滅菌法

SDS 以外でも、諸外国で導入している方法があればその有効性、手術器具の耐久性などを検討する。これは、本研究の班員以外からの情報も現実的滅菌法の開発・改善には必要と考え将来の CJD ガイドラインに反映すべく本研究で行うこととした。

### 諸外国での情報収集

わが国は、未曾有の硬膜移植後 CJD を経験しており諸外国以上に CJD などの 2 次感染を防ぐ必要性がある。しかしながら、あらゆる手術器具に臨床応用でき、しかも完全なプリオンの滅菌法が存在しない現状では諸外国での現状対策、新しい滅菌法の導入状況など世界に対して情報受信を怠ってはならない。そこで、本年度途中からタクミ先生の参加を願い来年度から本格的に海外調査を行う予定である。

### バイオアッセイ法の改良

最近明らかになったことに、最高感度の検出法と考えられた PMCA 法に弱点が存在するという報告が挙げられる。プリオンという感染因子なしで、PMCA 法によって異常型プリオン蛋白が生成されるというのである。学問的にはこの事実は大きな進歩であるが、検査法としては大きな弱点をさらけ出したことになる。例えば、CJD の患者から異常型プリオン蛋白が増幅できたとしても、それが血液中にあったプリオンを増幅したのではなく単に試験管内でプリオンを新しく生成したという可能性が否定できなくなったのである。プリオンの検査として大きな期待を抱かせた PMCA 法に限界が見えてきたのである。同様に、動物モデルとして一斉を風靡したトランスジェニック法も高発現モデルでは、プロ

テアーゼ抵抗性のプリオン蛋白が出現することや、プリオン病以外の神経症状が出てくるなどの問題点が出てきたのである。そこで、ノックインマウスの作製による生理的な発現状態でいかに効率良く異常化するプリオン蛋白を設計するかという研究が必要になってきた。詳しい方法は、北本らの報告書を参照していただきたい。

#### (倫理面への配慮)

本研究はヒトを対象とした研究ではなく、実験動物を用いたプリオンの滅菌法の開発実験であるので、特段の倫理面への配慮は必要としない。現時点では、動物愛護の観点から各施設の動物実験指針にしたがって研究を行っている。

### C. 研究結果

#### SDS 滅菌法

##### ○ ヒトプリオンを使った滅菌法

SDS 煮沸を含めた滅菌処理を行った後、処理したワイヤーを Ki-ChM マウスに投与している。現在は、経過観察中。また、定量解析を行うために、10倍ごとに限界希釈したMM1のサンプルも同時に投与して経過観察中である。具体的な結果はまだ得られていないが、実験手技などは毛利らの報告書に記載されている。

##### ○ SDS による器具の耐久性試験：定量

SDS 煮沸法を50回繰り返し手術器具の切れ味がどう変化するかをシュミレーションする実験を行った。具体的な結果は、赤池らの報告書に譲るが注射針の切れ味を定量化することによって、3% SDS 煮沸と蒸留水での煮沸で注射針の切れ味を比較検討したところ、蒸留水煮沸と3%

SDS 煮沸による違いは検出できなかった。つまり、切れ味などの評価としてSDS 煮沸を50回繰り返しおこなっても蒸留水による煮沸結果と同じであることが明かとなった。

##### ○ SDS による器具の耐久性試験：定性

SDS 煮沸後に直接注射針を走査型電子顕微鏡で観察するという方法をとった。具体的な結果は、秋田らの報告書を参照していただきたいが、まとめるとSDS 煮沸を繰り返し単に流水中で注射針を洗うだけではSDSの析出物が注射針に付着してくることが明らかとなった。また、注射針自体の劣化は、蒸留水で煮沸するのと変わらないことを明らかとした。同時に行っていた赤池らの報告によると、SDS 処理後に注射針を超音波にて洗浄することによって秋田らの報告した析出物が確認されず、蒸留水で煮沸した針と形態的には変化のないことが報告された。これは、重要な所見である。まとめると、SDS 処理後の手術器具の洗浄には超音波処理洗浄が非常に有効であることが走査顕微鏡での観察で明かとなった。

#### その他の滅菌法

本年度の班会議では、今後検討する課題として①アルカリ処理の滅菌効果と手術器具への影響、②プレバキュームによるオートクレーブ処理が候補として上がった。

#### 諸外国での情報収集

来年度の予定として太組先生の参加により本格的に海外調査を行う予定である。

#### バイオアッセイ法の改良

今年度は、正常型プリオン蛋白のMNRによる構造解析が行われているコドン121～コドン160の40コドン分を野生

型と19種類のアミノ酸に置換した約800分子のプリオン蛋白に関する結果を報告する。

● 異常化効率が10倍以上のアミノ酸置換

野生型アミノ酸(コドン)置換型アミノ酸という表記に統一して報告する。異常化効率が画期的に上昇したアミノ酸置換は、V121I, Y127Iの2種類のアミノ酸置換であった。それぞれ、23倍、13倍と野生型に比べて異常化の起こりやすい置換であった。

● 異常化効率が4倍以上のアミノ酸置換10倍未満4倍以上の異常化効率を示したアミノ酸置換は、Y127L, Y127M, L129V, S131F, S131Y, M133I, M133W, M137Q, M137S, M137T, M137V, D143I, D143Q, R155K, Y156Fという15種類のアミノ酸置換であった。

● 異常化を抑制するアミノ酸置換  
本報告では余りにも多くてリストアップすることはしないが、ほとんど異常化をしないアミノ酸置換も確認している。将来的には、異常化を抑制する効果があるのかどうかを検討する予定である。

#### D. 考察

予定していた研究以外に、その他の滅菌法の検討や諸外国での情報収集などプリオン滅菌法に関して総合的に取り組むようになってきた。本研究は、タイトル通り現実的に応用可能なプリオン滅菌法を樹立することであるので、最新の情報に基づいてヒトのプリオン滅菌効果を検証してゆく予定である。

さらに、モデル動物に対しても現状のヒトのプリオンに対して世界最高感度のKi-ChMモデルをさらに改良してゆく予定で

ある。

#### E. 結論

本年度、明らかになった最大の成果は、プリオン滅菌に有効なSDS煮沸を50回繰り返してもステンレス注射針の切れ味、超微形態が蒸留水煮沸となんら変わらず、ほとんど腐食しないということが明かとなった。

さらに、SDS滅菌後に通常の流水洗浄ではSDS成分が残存するが、超音波洗浄をおこなうとこのようなSDS残存を防ぐことを明かした。

#### F. 健康危機情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Noguchi-Shinohara M, Hamaguchi T, Kitamoto T, Sato T, Nakamura Y, Mizusawa H, Yamada M.:

Clinical features and diagnosis of dura mater graft associated Creutzfeldt Jakob disease. *Neurology*. 69:360-367, 2007.

Shin RW, Ogino K, Shimabuku A, Taki T, Nakashima H, Ishihara T, Kitamoto T. Amyloid precursor protein cytoplasmic domain with phospho-Th668 accumulates in Alzheimer's disease and its transgenic models: a role to mediate interaction of Abeta and tau. *Acta Neuropathol*. 113: 627-636, 2007.

Hamaguchi T, Noguchi-Shinohara M, Nakamura Y, Sato T, Kitamoto T.

Mizusawa H, Yamada M.:  
Ophthalmic surgery in prion diseases.  
Emerg Infect Dis. 13:162-164, 2007.

Kobayashi A, Asano M, Mohri S, Kitamoto T.:  
Cross-sequence transmission of sporadic  
Creutzfeldt-Jakob disease creates a new  
prion strain. J Biol Chem. 282:  
30022-30028, 2007.

Iwasaki Y, Mimuro M, Yoshida M,  
Hashizume Y, Ito M, Kitamoto T,  
Wakayama Y, Sobue G.:  
Enhanced Aquaporin-4 immunoreactivity  
in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease.  
Neuropathology. 27:314-323, 2007.

Shiga Y, Satoh K, Kitamoto T, Kanno S,  
Nakashima I, Sato S, Fujihara K, Takata  
H, Nobukuni K, Kuroda S, Takano H,  
Umeda Y, Konno H, Nagasato K, Satoh A,  
Matsuda Y, Hidaka M, Takahashi H,  
Sano Y, Kim K, Konishi T, Doh-Ura K,  
Sato T, Sasaki K, Nakamura Y, Yamada  
M, Mizusawa H, Itoyama Y.:  
Two different clinical phenotypes of  
Creutzfeldt-Jakob disease with a M232R  
substitution.  
J Neurol. 2007 (in press)

Yoshioka M, Murayama T, Miwa T, Miura  
K, Takata M, Yokoyama T, Nishizawa K  
and Mohri S: Assessment of Prion  
Inactivation by a Combined Use of 4  
*Bacillus*-derived Protease and SDS.

Biochemistry & Molecular Biology.  
Oct;71(10): 2565-8, 2007

Murayama Y, Yoshioka M, Okada H,  
Takata M, Yokoyama T and Mohri S:  
Urinary Excretion and Blood Level of  
Prions in Scrapie Infected Hamsters.  
Journal of General Virology. 88:  
2890-2898, 2007

Suyama K, Yoshioka M., Akagawa M,  
Murayama Y, Horii H, Takata M,  
Yokoyama T and Mohri S: Assessment of  
Prion Inactivation by Fenton Reaction  
Using Protein Misfolding Cyclic  
Amplification and Bioassay. Bioscience,  
Biotechnology, and Biochemistry. 71(8):  
2069-2071, 2007

Suyama K, Yoshioka M., Akagawa M.,  
Murayama Y., Horii H., Takata M.,  
Yokoyama T. and Mohri S.: Prion  
inactivation by the Maillard reaction.  
Biochem Biophys Res Commun.: 356:  
245-248,2007.doi:10.1016/j.bbrc.  
2007.02.113

Akita S, Akino K, Yakabe A, Imaizumi T,  
Tanaka K, Anraku K, Yano H, Hirano A.  
Combined surgical excision and radiation  
therapy for keloid treatment. J Craniofac  
Surg, 18: 1164-1169, 2007

攝田麻里、安倍久仁子、林徳真吉、木下直江、  
今泉敏史、野中大樹、皆川知広、秋田定伯、  
上谷雅孝、平野明喜

多毛を伴った fibrous hamartoma of  
infancy の一例  
臨床皮膚科 61: 263-266, 2007

諸藤陽一、松尾孝之、竹下朝規、林健太郎、  
黒川季代子、秋田定伯、永田 泉  
開頭術と顔面神経側頭枝損傷に対する神  
経意匠術を一期的に行った症例  
Neurosurgical Emergency 12: 100-106,  
2007

Imaizumi T, Akita S, Akino K, Hirano A  
Acceleration of sensory neural  
regeneration and wound healing with  
human mesenchymal stem cells in  
immunodeficient rats. Stem Cells, 25:  
2956-2963, 2007

Nakashima M, Yano H, Akita S,  
Tokunaga K, Anraku K, Tanaka K,  
Hirano A. Traumatic unilateral  
temporomandibular joint dislocation  
overlooked for more than two  
decades. J Craniofac Surg, 18:  
1466-1470, 2007

秋田定伯  
臨床各領域の動向 2006-2007  
「形成外科」  
治療 89: 107-110, 2007

秋田定伯  
F G F 製剤の治療効果について  
PEPARS 16: 54-63, 2007

秋田定伯

FGF による皮膚損傷修復作用  
細胞 39: 352-358, 2007

Akita S, Akino K, Hirano A, Ohtsuru A,  
Yamashita S. Reconstruction for local  
radiation injuries and proposed  
regeneration therapy for acute systemic  
radiation injuries.  
Radiation Risk and Perspectives edited  
by Shibata Y, Namba H, Suzuki K and  
Tomonaga M. Elsevier, International  
Congress Series 1299, Amsterdam, 2007,  
Pp. 196-202, total 298 pages.

秋田定伯、秋野公造、今泉敏史、田中克己  
安楽邦明、矢野浩規、平野明喜  
広範囲熱傷患者における血中白血球抑制  
因子の上昇  
日本熱傷学会会誌、印刷中、2007年

Akita S, Akino K, Tanaka K, Anraku K,  
Hirano A. A basic fibroblast growth  
factor improves lower extremity wound  
healing with a porcine-derived skin  
substitute. J Trauma, in press

Akino K, Akita S, Yakabe A, Mineda T,  
Hayashi T, Hirano A. Human  
mesenchymal stem cells may involve in  
keloid pathogenesis. Int J Dermatol., in  
press.

## 2. 学会発表

Fujita Y, Matsuura Y, Ishikawa Y,  
Somerville R.A., Kitamoto T, Yokoyama  
T, Mohri S. Heat resistance of BSE

infectivity by dehydration of materials.  
PRION2007, Edinburgh, 2007.

秋田定伯、平野明喜

線維芽細胞増殖因子-2 は下腿創傷治癒  
の質を改善する

第 50 回日本形成外科学会 (口演) (東  
京)、4 月、2007 年

Akita S, Akino K, Hirano A.

Fibroblast growth factor-2 improves the  
quality of lower extremity wound  
healing.

2007 Wound Healing Society Annual  
Meeting, Tampa, April-May, 2007.

Yakabe A, Akita S, Fujioka M, Hirano  
A.

Easy and objective skin color analysis  
in plastic surgery

2007 Wound Healing Society Annual  
Meeting, Tampa, April-May, 2007.

秋田定伯

ケロイドの国際分類比較

第 2 回癬痕・ケロイド治療研究会 【パネ  
ルディスカッション】《ケロイドの分類》、  
2007 年 8 月、東京

Akita S

Novel therapeutic approach using  
reconstructive surgery, cytokine and  
human bone-marrow derived  
mesenchymal stem cells.

Scientific-Practice Conference “Cell  
technologies and regenerative

medicine”, Saint Petersburg State  
Medical Institution “Pokrovskaya  
Municipal Hospital”, Invited Lecture,  
September 24, St. Petersburg, 2007

Akita S

Stem cell therapy and Plastic surgical  
management for local radiation injury.  
2<sup>nd</sup> International Seminar-“Radiation  
Medicine in Research and Practive”,  
Wuerzburg, Germany, Invited  
Symposium,  
October 4-5, 2007

秋田定伯

座談会 Part II～何故、私はこの研究をし  
ているのか～

第 16 回日本形成外科学会 (神戸)、  
10 月、(企画、発表、座長)、2007 年

秋田定伯、秋野公造、平野明喜

創傷治癒促進から癬痕改善へ連動するヒ  
ト間葉系幹細胞

第 16 回日本形成外科学会 (神戸)、  
10 月、2007 年

秋田定伯、平野明喜

5HT<sub>2A</sub> 受容体拮抗薬を血管化結合織膜弁  
に用いた下肢虚血モデルでの血流回復と  
創傷治癒促進

第 16 回日本形成外科学会 (神戸)、  
10 月、2007 年

秋田定伯、矢加部 文、秋野公造、平野明  
喜

皮膚色差解析にいたる術前後、カラーマッチ

の検討

16回日本形成外科学会（神戸）、10月、  
2007年

秋田定伯

創傷治癒促進から瘢痕改善へ関連する間  
葉系幹細胞

第37回 日本創傷治癒学会 主題演題、  
12月、2007年

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定も含む。）

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

# 分 担 研 究 報 告

## プリオン感染実験

### 異常化の起こりやすいプリオン蛋白の設計に関する研究

主任研究者： 北本 哲之 東北大学大学医学系研究科・教授

#### 研究要旨

ヒトプリオンに対するモデル動物は、我々が作成した Ki-ChM（キメラ型プリオン蛋白ノックインマウス）が弧発性CJDのMM1プリオンに対して世界最高感度を有する。しかし、その感度を用いても150日という潜伏期間が必要である。この感度をさらに上げるために、遺伝子導入するプリオン蛋白の分子を改良することが本研究の目的である。本年度は、プリオン蛋白の1つのコドンのアミノ酸置換によって異常化効率を20倍以上に上げることが明らかとなった。ヒトプリオンに対する感染性モデル動物は、これらのプリオン蛋白の分子設計の改良によってさらに高い感度のモデルを樹立できる可能性を示した。

#### A. 研究目的

プリオン蛋白とプリオン病の感染実験の結果から、一般的には感染因子プリオンと同じシークエンスのプリオン蛋白をもつ動物が発病に対して感受性が高いと考えられてきた。しかしながら、その常識が覆される知見がでてきた。その代表例が、感染性プリオン病の感染実験である。具体的には、vCJDプリオンの感染実験はヒト型プリオン蛋白の129Met, 219Gluという遺伝子型をもつ実験動物が最適だと考えられてきたが、実はウシ型プリオン蛋白をもつ実験動物の方が高感度であることを明らかにしている(Asano et al, 2006)。そこで、プリオンを構成するアミノ酸配列よりも優れた感受性のアミノ酸配列が存在するという仮説の元にプリオン蛋白を設計することによってさらに高い

感受性をもつモデル動物の作製が可能となり、ヒトへのプリオン感染の安全性を担保するのが本研究の目的である。

#### B. 研究方法

プリオン感染細胞を用いたアッセイ：スクレピー・プリオンに感染した神経芽細胞種培養細胞(ScN2aと略す)にマウスのプリオン蛋白の各コドンを19種類のアミノ酸に置換したプリオン蛋白遺伝子を導入し、導入したプリオン蛋白の異常化効率を野生型のアミノ酸と比較した。導入したアミノ酸置換を有する変異型プリオン蛋白を同定するために、マウスのプリオン蛋白に3F4またはT41というエピトープを導入し、マウスのプリオン蛋白の異常化と導入した変異型プリオン蛋白の異常化を区別した。プリオン蛋白の異

常化は、プリオン蛋白が界面活性剤存在下でも不溶性となり、さらにプロテアーゼ抵抗性を有するように構造変化する現象を指標に Western blot 後、画像解析装置にて測定した。

(倫理面への配慮)

主な実験は、培養細胞を用いた異常化効率を検討する実験であるので、特別な倫理面への配慮は不要である。

### C. 研究結果

検討するアミノ酸置換を導入するコドンは、異常型プリオン蛋白を構成するコドン90～コドン230の配列の範囲である。140以上のコドンを野生型と他の19種類のアミノ酸に置換するので最低でも2800のシーケンスの異なるプリオン蛋白の異常化を検討することになる。

今年度は、正常型プリオン蛋白のMNRによる構造解析が行われているコドン121～コドン160の40コドン分を野生型と19種類のアミノ酸に置換した約800分子のプリオン蛋白についての結果を報告する。

●異常化効率が10倍以上のアミノ酸置換野生型アミノ酸(コドン)置換型アミノ酸という表記に統一して報告する。異常化効率が画期的に上昇したアミノ酸置換は、V121I, Y127Iの2種類のアミノ酸置換であった。それぞれ、23倍、13倍と野生型に比べて異常化の起こりやすい置換であった。

●異常化効率が4倍以上のアミノ酸置換10倍未満4倍以上の異常化効率を示したアミノ酸置換は、Y127L, Y127M, L129V, S131F, S131Y, M133I, M133W, M137Q, M137S, M137T, M137V, D143I, D143Q, R155K, Y156Fという

15種類のアミノ酸置換であった。

●異常化を抑制するアミノ酸置換  
本報告では余りにも多くてリストアップすることはしないが、ほとんど異常化をしないアミノ酸置換も確認している。将来的には、異常化を抑制する効果があるのかどうかを検討する予定である。

### D. 考察

プリオンの感染実験には、感染因子と同じシーケンスのプリオン蛋白をもった実験動物というのが、ひところの常識であった。しかしながら、ヒトプリオンの感染実験にあたって、この常識を覆すような結果がでてきた。ヒトのMM1プリオンに関して、最適のモデルと考えられたヒト PrP129Met タイプのノックインマウスより、ヒトとマウスのキメラ型であるChM(キメラMet)タイプ of ノックインマウスの方が潜伏期間が短いという結果となった(Taguchi et al, 2004; Kobayashi et al, 2007)。これらの結果から、現時点で最も感受性の高いChMタイプのシーケンスもまだまだ改良の余地があることが明らかとなった。事実、本年度の研究で実証したように、たった1つのアミノ酸を別のアミノ酸に置換することによって、プリオン蛋白の異常化効率を20倍以上に伸ばすことが可能となったのである。異常化効率を改善することによって、さらに感度の高いモデル動物作製が可能となり、このような高感度のモデルを用いることによって、2次感染を防ぐ滅菌のリスクを高い信頼性によって評価できるのである。

### E. 結論

プリオン蛋白の1つのコドンのアミノ

酸置換によって異常化効率を 20 倍以上に上げることが明らかとなった。ヒトプリオンに対する感染性モデル動物は、これらのプリオン蛋白の分子設計の改良によってさらに高い感度のモデルを樹立できる可能性を示唆した。

#### F. 健康危機情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Noguchi-Shinohara M, Hamaguchi T, Kitamoto T, Sato T, Nakamura Y, Mizusawa H, Yamada M.:

Clinical features and diagnosis of dura mater graft associated Creutzfeldt Jakob disease. *Neurology*. 69:360-367, 2007.

Shin RW, Ogino K, Shimabuku A, Taki T, Nakashima H, Ishihara T, Kitamoto T.: Amyloid precursor protein cytoplasmic domain with phospho-Th668 accumulates in Alzheimer's disease and its transgenic models: a role to mediate interaction of Abeta and tau. *Acta Neuropathol*. 113: 627-636, 2007.

Hamaguchi T, Noguchi-Shinohara M, Nakamura Y, Sato T, Kitamoto T, Mizusawa H, Yamada M.:

Ophthalmic surgery in prion diseases. *Emerg Infect Dis*. 13:162-164, 2007.

Kobayashi A, Asano M, Mohri S, Kitamoto T.:

Cross-sequence transmission of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease creates a new prion strain. *J Biol Chem*. 282: 30022-30028, 2007.

Iwasaki Y, Mimuro M, Yoshida M, Hashizume Y, Ito M, Kitamoto T, Wakayama Y, Sobue G.:

Enhanced Aquaporin-4 immunoreactivity in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuropathology*. 27:314-323, 2007.

Shiga Y, Satoh K, Kitamoto T, Kanno S, Nakashima I, Sato S, Fujihara K, Takata H, Nobukuni K, Kuroda S, Takano H, Umeda Y, Konno H, Nagasato K, Satoh A, Matsuda Y, Hidaka M, Takahashi H, Sano Y, Kim K, Konishi T, Doh-Ura K, Sato T, Sasaki K, Nakamura Y, Yamada M, Mizusawa H, Itoyama Y.:

Two different clinical phenotypes of Creutzfeldt-Jakob disease with a M232R substitution. *J Neurol*. 2007 (in press)

##### 2. 学会発表

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む。)

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

## 手術器具付着ヒトプリオンの現実的除染方法の開発

分担研究者：毛利資郎（動物衛生研究所 プリオン病研究センター・センター長）  
研究協力者：倉知恵美（動物衛生研究所 プリオン病研究センター）

### 研究要旨

手術器具を介したプリオン病の2次感染の防止のため、一般の病院で応用可能な現実的滅菌法の基礎となる科学的データを集積し、安全を検証することを目的として、手術器具を模したワイヤーを用いて、不活化評価を行った。ワイヤーは SUS316、線径 0.3mm、長さ 3mm とし、ヒト孤発性 CJD 由来プリオンを吸着乾燥後、マウス脳内に埋込みバイオアッセイを行っている。現在、感染実験途中でマウスを観察中であるが、まだ結果は得られていない。

### A. 研究目的

クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) をはじめとするプリオン病の病原因子であるプリオンは、通常の病原体とは異なり、熱や消毒液に対して強い抵抗性を有している。したがって、通常の消毒法では感染性が消失しないことが知られている。このことから、脳外科等の手術に使用した器具のプリオンに対する滅菌については一般病院では対策が困難とされている。

手術器具を介したプリオン病の2次感染を防止するために一般の病院で応用可能な現実的滅菌法の基礎となる科学的データを集積し、安全を検証することがこの研究の目的である。

### B. 研究方法

#### 1) プリオンとモデルマウス

孤発性 CJD プリオン (MM1) を不活化材料として、このプリオンに対して最も感受性

の高い、ヒト-マウスキメラ型プリオン遺伝子を発現する Ki-ChM マウスを感染性評価に用いた。

2) 手術器具を模したステンレスワイヤー（以下、ワイヤー）の規格を決めるために、ワイヤーの材質、長さ、マウスへの脳内埋込の方法について検討した。

3) 汚染（感染性）の基準作製のために、PBS にて  $10^{-1}$  から  $10^{-8}$  に希釈したプリオン乳剤にワイヤーを 30 分間浸漬後、一晚乾燥させ、各群 6 頭のマウス脳内に接種した。

4) 10% 脳乳剤に浸漬後のワイヤーを水洗、オートクレーブ (121°C、20 分)、水溶液中でオートクレーブ (121°C、20 分) 3% SDS200ml 溶液中で 10 分間煮沸、3% SDS で 10 分間煮沸 + オートクレーブ (121°C、20 分)、1N NaOH 水溶液 1.5ml 中で室温 60 分をそれぞれ行い、マウスの脳内に接種した。コントロールとして PBS に浸漬したワイヤーを用いた。

5) 古い手術器具を想定して、ヤスリがけ処理をしたワイヤーに4)の処理を実施した。  
(倫理面への配慮)

独立行政法人 農業食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所の動物実験要領に則り、動物実験計画の承認を受け、動物実験を行っている

### C. 研究結果

ワイヤーを検討した結果、材質としてはSUS316のステンレスとした。マウスへの埋込について予備実験を行い、線径 0.3mm、長さ 3mm が適当であると判断した。感染除去効果を半定量的に判定するための基準線を作製するための希釈材料による感染実験を開始した。

オートクレーブ (121°C、20 分)、水に浸したままオートクレーブ(121°C、20 分) 3% SDS200ml 溶液中で 10 分間煮沸、3% SDS で 10 分間煮沸+オートクレーブ (121°C、20 分)、1N NaOH 水溶液 1.5ml 中で室温 60 分の処理をそれぞれ施された汚染ワイヤーを、マウス脳内へ埋め込み、マウスを観察中である。今のところ変化は認められていない。

### D. 考察

全ての感染実験は現在進行中である。今後、班会議で指摘されたほとんどの病院で院内感染用に備わっている 134°Cのオートクレーブ処理を行うこととした。また、次年度には pH4 以下の SDS 処理、アルカリ洗剤での洗浄処理を加えて、バイオアッセイを行う予定である。

### E. 結論

現在、マウス感染試験中で結論は出ていない。

### F. 健康危機情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Yoshioka M, Murayama T, Miwa T, Miura K, Takata M, Yokoyama T, Nishizawa K and Mohri S: Assessment of Prion Inactivation by a Combined Use of 4 *Bacillus*-derived Protease and SDS. *Biochemistry & Molecular Biology*. Oct;71(10): 2565-8, 2007

Murayama Y, Yoshioka M, Okada H, Takata M, Yokoyama T and Mohri S: Urinary Excretion and Blood Level of Prions in Scrapie Infected Hamsters. *Journal of General Virology*. 88: 2890-2898, 2007

Suyama K, Yoshioka M., Akagawa M, Murayama Y, Horii H, Takata M, Yokoyama T and Mohri S: Assessment of Prion Inactivation by Fenton Reaction Using Protein Misfolding Cyclic Amplification and Bioassay. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 71(8): 2069-2071, 2007

Suyama K, Yoshioka M., Akagawa M., Murayama Y., Horii H., Takata M., Yokoyama T. and Mohri S.: Prion inactivation by the Maillard reaction. *Biochem Biophys Res Commun*.: 356: 245-248, 2007. doi:10.1016/j.bbrc. 2007.02.113

## 2. 学会発表

Fujita Y, Matsuura Y, Ishikawa Y, Somerville R.A., Kitamoto T, Yokoyama T, Mohri S:Heat resistance of BSE infectivity by dehydration of materials. PRION2007, Edinburgh, 2007.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む。)

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## SDS 処理によるステンレス刃の切れ味定量解析

分担研究者： 赤池 義明      テルモ株式会社富士宮工場 工場長代理

### 研究要旨

プリオン病2次感染に対する現実的滅菌法として検討されている、3%ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）水溶液による煮沸消毒操作により、ステンレス（SUS304）製手術器具等の刃類の耐久性（劣化レベル）について、注射針をモデルとして検討を行った。

その結果、3%SDS水溶液による10分間煮沸消毒を50回繰り返したものと、イオン交換水による10分間煮沸消毒を50回繰り返したものの間には、形態的にも、注射針の針先の切れ味にも大きな変化は認められず、3%SDS水溶液による煮沸消毒はステンレス（SUS304）に対して、大きな影響やダメージを与えるものでは無いことが確認された。

### A. 研究目的

プリオン病の2次感染に対する現実的滅菌法として検討されている、3%SDS水溶液による煮沸消毒が、ステンレス鋼製手術用器具等の刃類に与える影響を調査し、現実的滅菌法としての可能性について、基礎的評価を行った。

### B. 研究方法

ステンレス鋼製手術用器具の刃類のモデルとして、ディスプレイブル注射針用カメラ（金属針部分 素材SUS304）を用いて、イオン交換水を対照として、繰り返し3%SDS水溶液による煮沸消毒操作を50回まで行い、その際の電顕写真による形態上の変化と注射針の切れ味に関する変化を確認した。

### （倫理面への配慮）

基礎評価段階でもあり、人や動物を用いた評価ではなく、形態上の変化や物理学的な数値を測定することで、倫理面のリスクを排除した。

### C. 研究結果

3%SDS水溶液による煮沸消毒と、一般的に医療現場で行われている（イオン交換水による）煮沸消毒の比較では、ステンレス鋼（SUS304）製の刃には、形態上も切れ味の面でも大きな差異は認められなかった。

単純に煮沸消毒を繰り返す評価系Ⅰに加え、実際の刃物としての使用を考慮した評価系Ⅱとして、煮沸消毒後、毎回シリコーンゴムシートに刺通する操作を加えて、変化を追跡した。

その評価系に於いても、イオン交換水による煮沸消毒との間には大きな差は認められなかった。但し、単純に煮沸消毒を繰り返した系よりも、切れ味の指標である刺通抵抗値で比較すると、測定部位によっては寧ろシリコーンゴム刺通を加えた系の方が切れ味が良い、つまり刺通抵抗値が僅かにではあるが一旦低下し、その後上昇するも、煮沸消毒のみに比べると低い値を維持する場合があるという結果が得られた。

#### D. 考察

今回の結果からは、3% SDS 水溶液による10分間煮沸消毒を行った場合、手術用器具の刃類に最も一般的に使用されているステンレス鋼 (SUS 304) は、腐食など著しい変化は認められず、非常に鋭敏に刃の切れ味を評価できるカヌラの刺通抵抗でも大きな差が認められなかったことから、当該器具類の実際的滅菌法として、この観点からは大きな問題は無いと推定された。

又、評価系Ⅱで評価系Ⅰよりも刺通抵抗値が小さくなる場合が認められた理由として、シリコーンゴム中に含まれる未架橋のシリコーン油がカヌラに付着して、摩擦を小さくしている可能性が考えられた。

しかし、この問題の結論を出すには、更なる確認と検証が必要である。

#### E. 結論

プリオン2次感染に対する現実的滅菌法として検討されている3%ドデシル硫酸ナトリウム水溶液による煮沸消毒は、注射針モデルで評価した結果、ステンレス鋼 (SUS 304) 製手術用器具の刃類に対し、腐食等の大きな変化を生じさせることは無く、刃類

の切れ味に関しても、大きな低下を引き起こさないものと判断された。

#### F. 健康危機情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

該当なし

##### 2. 学会発表

該当なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む。)

##### 1. 特許取得

該当なし

##### 2. 実用新案登録

該当なし

##### 3. その他

該当なし