

200936008A

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 北本 哲之

平成22年(2010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

- PMCA法を用いた滅菌法評価に関する研究 . . . . 10  
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 . . . . 14  
毛利資郎（動物衛生研究所 プリオン病研究センター）

- 5%次亜塩素酸ナトリウム 1N水酸化ナトリウムで消毒後に超音波  
洗浄の有無による鋭敏な器具の形状変化について . . . . 22  
秋田定伯（長崎大学医学部 歯学部附属病院）

- プリオン病 滅菌における海外情報収集 . . . . 26  
太組一朗（日本医科大学武蔵小杉病院）

- プリオン滅菌の現実的方法論の検討 . . . . 29  
大久保憲（東京医療保健大学 医療情報学科）

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表 . . . . 34

## IV. 研究成果の刊行物・印刷 . . . . 39

# 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

研究代表者：北本 哲之（東北大学大学院医学系研究科・教授）

### 研究要旨

プリオン感染の現実的滅菌法の開発として、ヒトプリオンを用いて滅菌効果をみるという研究を行った。主な成果として、以下の点が明らかとなった。1) SDS 処理、オートクレーブ処理、アルカリ (NaOH) 処理の全ての処理は単独処理による完全な滅菌効果は得られなかった。2) SDS 処理で、ステンレス針の摩耗等を検討したが50回繰り返す煮沸処理においても蒸留水煮沸と同様摩耗処理は認められなかった。しかしながら、SDS の残渣を取り除くには、そのたびに超音波処理が必要なことを明らかとした。一方、同じ処理をアルカリ処理で行ったところステンレス針の摩耗を認めた。3) 単独処理では不完全な滅菌効果しか認められなかった処理であるが、SDS 処理+オートクレーブ処理、アルカリ処理+オートクレーブ処理の2種類の処理方法が現時点で完全な滅菌効果のあることを明らかとした。ただし、121℃のオートクレーブでは若干ながら感染性が残り、134℃のオートクレーブの併用が効果的であることを明らかとした。

研究分担者：毛利 資郎（動物衛生研究所 プリオン病研究センター）  
秋田 定伯（長崎大学病院・助教）  
太組 一郎（日本医科大学武蔵小杉病院 脳神経外科）  
大久保 憲（東京医療保健大学・医療情報学科 学科長・教授）

### 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

#### 1. 各種滅菌法のヒト・プリオンでの検討

ヒト・プリオンとして sCJD MM1 を用いて、その脳乳剤中にステンレススチールワイヤー (SSW) を入れて汚染させ、その後SSWを乾燥させてからヒト型

ノックインマウスの脳内に埋め込んだ。感染実験に用いたノックインマウスは、ヒトとマウスのキメラ型の遺伝子導入マウス (Ki-ChM マウス) を使用した。定量性を検討するために、脳乳剤ホモジネートそのものを段階希釈して接種するグループと段階希釈した脳乳剤にSSWを汚染させ、そのSSWを投与したグループで感染実験を行った。各種滅菌法の検討には、10%脳乳剤に汚染させたSS針を用いて検討した。

## 2. 各種滅菌法による手術器具の摩耗の検討

SDS 煮沸法とアルカリ処理などによるステンレス注射針の劣化の研究を行った。また、SDS 煮沸の後の超音波処理の有無で、超微形態学的な差異が生じるのか否かを検討した。

## 3. バイオアッセイに代わる滅菌評価方法の開発

ヒト・プリオンに関して、手術器具汚染が完全に除去できるのかの検討には、バイオアッセイがゴールドスタンダードであることは間違いないが、次々と新しい洗浄剤などが開発されそれを評価するにはバイオアッセイ系では時間と費用の面から対応できない。そこで、できるかぎり定量的に滅菌効果を評価する方法を検討した。

## 4. プリオン滅菌法の各国での取り組みの検討

プリオンの滅菌に関して、各国の取り組みで錯綜している部分が存在するのは何よりも完全な滅菌法が存在しないという事実に基づくものであろう。しかしながら、常に新しい滅菌法の情報を得るという努力と現実的な各国の対応情報は、本研究に無くてはならないものである。太組・大久保協力研究員によって、それぞれの情報を報告検討した。

### (倫理面への配慮)

本研究は、直接ヒトを対象とした研究ではなく、動物モデルを用いた感染実験が主な研究対象である。動物倫理に関しては、所属する施設の実験動物委員会で承認を受けている。

## **C. 研究結果**

### 1. 各種滅菌法のヒト・プリオンでの検討

(1) end-point titration として、MM1 の脳乳剤を  $10^{-8}$  まで希釈したが、ホモジネートでは  $10^{-4}$  希釈で全動物が発病したが、 $10^{-6}$  希釈で 1 匹発病が認められたに過ぎないが、SSW 実験では  $10^{-6}$  希釈ではすでに全動物が発病し、 $10^{-7}$  や  $10^{-8}$  でも 1 匹発病している。つまり、SSW での汚染の方が微量で感染が成立することが明らかになった。これは、手術器具の滅菌法を考えた時には、脳ホモジネートより SSW での汚染の方が、滅菌に抵抗性を示すことが明らかとなった。

(2) 現在単独処理の滅菌法としては、アルカリ処理、SDS 処理、オートクレーブ処理があげられる。オートクレーブでは、 $121^{\circ}\text{C}$  20 分が  $251 \pm 27$  日 (6/6)、 $134^{\circ}\text{C}$  20 分が  $250 \pm 51$  日 (6/6)、1N NaOH 処理が  $256 \pm 4$  日 (6/6)、SDS 処理が  $278 \pm 20$  日 (6/6) で全動物が発病した。残念ながら、単独処理では SSW 汚染を完全に除去できないことが明らかとなった。これらの結果から、CJD のガイドラインの滅菌処理に関する記載を、完全な滅菌法はないと改める必要性がでてきた。

(3) 異なる滅菌法を組み合わせることは有効であるという事実である。アルカリ処理+オートクレーブ処理、SDS 処理+オートクレーブ処理を組み合わせることで感染性を確実に低下させることができることが明らかとなった。複合的な滅菌法は、単独処理が無効と解ってから系統的に行ったためまだ十分な観察期間に達していないが、NaOH+オートクレー

ープ処理では完全と言えないまでも121℃処理で351±143日(3/6)、134℃処理で545日(1/6)と効果的であった。またSDS+オートクレーブ処理では121℃処理で425日(1/6)、134℃処理で600日を超えて発病していない。SDS+オートクレーブ処理は、現在経過観察中の新しい感染実験もあり、完全な滅菌処理と判定するにはマウスの寿命いっぱい観察する必要があり、さらに1年間の経過観察が必要である。

## 2. 各種滅菌法の後処理

(1) 手術で頻用されるメス刃、カヌラ針を用いて、電顕での形態変化を観察したところ、SDS処理後経時的に堆積物、付着物の増加を認め、針では内腔の狭いものでより顕著であった。さらに超音波洗浄機を用いてその洗浄効果を検討したところ、刃、針先の摩耗は認めず、3% SDS煮沸消毒の手術器具への直接的な機械的变化はないと推察された。手術器具の3% SDS煮沸処理とその後の超音波洗浄は外科器具などの鋭利なものにも形態の損傷を与えずに効果的な堆積物除去が可能であると思われた。

(2) アルカリ処理後の、電顕での形態変化を観察したところSDS処理と異なり、針先の摩耗が認められた。繊細な手術器具への応用には留意すべきである。

## 3. バイオアッセイに代わる滅菌評価方法の開発

SSWにプリオンで汚染し、バイオアッセイを行うという方法は高い感度そして直接ヒト・プリオンを用いるという利点などゴールデン・スタンダードであるこ

とは間違いない。しかし、経過観察期間として最低2年間、できれば3年弱という長期間が必要である。そこで、PMCA法を用いて短期間に感度良く定量的にアッセイ出来る方法の開発を試みた。脳ホモジネートを用いたPMCA法では最低 $10^{-9}$ までのプリオンをアッセイ可能であったが、プリオンに汚染させたSSWでは、その定量的な検出の限界が $10^{-7}$ であった。SSWを用いたアッセイ法は手術器具の滅菌としては理想的であるが、この100倍の感度の低さからモデルとしては脳ホモジネートを用いたPMCA法を採用すべきであると考えた。

## 4. プリオン滅菌法の各国での取り組みの検討

(1) 情報収集として、今年度は特にフランスでの取り組みを中心に検討した。また、英国、オーストリアの研究者との情報交換も行った。

(2) プリオン病への特別な滅菌処理を行っているかのアンケート調査を行った。プリオン感染に関しては、十分な対策が取られていないのが現状であった。

## D. 考察

当初予定していた、滅菌法に関しては全て研究期間内にバイオアッセイのデータを出すことができた。また、それぞれの滅菌法の手術器具への影響も検討することができた。

学術的および国際的な意義に関しては、滅菌法を単独で用いるよりコンビネーションでもちいるとプリオンの滅菌効果が劇的に上昇することを見出した点が新しい。

社会的意義に関して、従来からマウスのプリオンで完全に滅菌できると考えられていた SDS 処理を用いてもヒト・プリオンでは不完全な滅菌効果しか得られないことが明らかとなった点である。プリオン滅菌に関して大幅なガイドラインの修正が必要になった。

## E. 結論

滅菌効果の確認のための感染実験に関しては、SDS 処理も含めて全ての試みた単独処理による確実なプリオン滅菌は不可能であった。この単独処理が不完全滅菌という事実を健康危機情報として報告する。さらに、本研究で、異なる滅菌処理を組み合わせることにより、滅菌効果を劇的に上昇させることが明らかになった。さらに、どのコンビネーション処理が完全な滅菌効果に至るのか検討する必要性が出てきた。

## F. 健康危険情報

従来のマウス・プリオンを用いた滅菌効果と異なり、ヒトのプリオンの完全な滅菌として、SDS 処理、アルカリ処理、オートクレーブ処理では不完全であることが明らかとなった。現実的な滅菌法としては、SDS 処理+134℃のオートクレーブ処理 またはアルカリ処理+134℃のオートクレーブ処理が有効であることが明らかとなった。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Hizume M, Kobayashi A, Teruya K, Ohashi H, Ironside JW, Mohri S, Kitamoto T. Human Prion Protein (PrP) 219K is converted to PrPSc but shows heterozygous inhibition in variant Creutzfeldt-Jakob

disease infection. *J Biol Chem.* 2009, 284: 3603-3609

Hamaguchi T, Noguchi-Shinohara M, Nozaki I, Nakamura Y, Sato T, Kitamoto T, Mizusawa H, Yamada M. Medical procedures and risk for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease, Japan, 1999-2008. *Emerg Infect Dis.* 2009 Feb;15(2):265-71.

Hiraga C, Kobayashi A, Kitamoto T. The number of octapeptide repeat affects the expression and conversion of prion protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 382:715-719.

Kobayashi A, Hizume M, Teruya K, Mohri S, Kitamoto T: Heterozygous inhibition in prion infection—The stone fence model. *Prion* 2009, 3:27-30

Shinde A, Kunieda T, Kinoshita Y, Wate R, Nakano S, Ito H, Yamada M, Kitamoto T, Nakamura Y, Matsumoto S, Kusaka H. The first Japanese patient with variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD). *Neuropathology* (in press)

Hama T, Iwasaki Y, Niwa H, Yoshida M, Hashizume Y, Kitamoto T, Murakami N, Sobue G. An autopsied case of panencephalopathic-type Creutzfeldt-Jakob disease with mutation in the prion protein gene at codon 232 and type 1 prion protein. *Neuropathology.* 2009 (in press)

Shimizu H, Yamada M, Matsubara N, Takano H, Umeda Y, Kawase Y, Kitamoto T, Nishizawa M, Takahashi H. Creutzfeldt-Jakob disease with an M232R substitution: report of a patient showing slowly progressive disease with abundant

plaque-like PrP deposits in the cerebellum. *Neuropathology*. 2009 (in press)

Iwasaki Y, Kizawa M, Hori N, Kitamoto T, Sobue G. A case of Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome with the P105L prion protein gene mutation presenting with ataxia and extrapyramidal signs without spastic paraparesis. 2009 Sep;111(7):606-9.

Yamada M, Noguchi-Shinohara M, Hamaguchi T, Nozaki I, Kitamoto T, Sato T, Nakamura Y, Mizusawa H. Dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease in Japan: Clinicopathological and molecular characterization of the two distinct subtypes. *Neuropathology*. 2009 29:609-618

Kobayashi A, Asano M, Mohri S, Kitamoto T. A traceback phenomenon can reveal the origin of prion infection. *Neuropathology*. 2009 29:619-624

Hamaguchi T, Noguchi-Shinohara M, Nozaki I, Nakamura Y, Sato T, Kitamoto T, Mizusawa H, Yamada M. The risk of iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease through medical and surgical procedures. *Neuropathology*. 2009, 29:625-631

Ikawa M, Yoneda M, Matsunaga A, Nakagawa H, Kazama-Suzuki A, Miyashita N, Naiki H, Kitamoto T, Kuriyama M. Unique clinicopathological features and PrP profiles in the first autopsied case of dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease with codon 219 lysine allele observed in Japanese population. *J Neurol Sci*. 2009 (in press)

Yoshida H, Terada S, Ishizu H, Ikeda K, Hayabara T, Ikeda K, Deguchi K, Touge T, Kitamoto T, Kuroda S. An autopsy case of Creutzfeldt-Jakob disease with a V180I

mutation of the PrP gene and Alzheimer-type pathology. *Neuropathology*. 2009 (in press)

Terada T, Tsuboi Y, Obi T, Doh-Ura K, Murayama S, Kitamoto T, Yamada T, Mizoguchi K. Less protease-resistant PrP in a patient with sporadic CJD treated with intraventricular pentosan polysulphate. *Acta Neurol Scand*. 2009 (in press)

Kobayashi A, Sakuma N, Matsuura Y, Mohri S, Aguzzi A, Kitamoto T. Experimental verification of a traceback phenomenon in prion infection. *J. Virol*. 2010.84(7):3230-3238.

Hizume M, Kobayashi A, Mizusawa H, Kitamoto T. Amino acid conditions near the GPI anchor attachment site of prion protein for the conversion and the GPI anchoring. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2010.391:1681-1686

S. Fukuda, Y. Iwamaru, M. Imamura, K. Masujin, Y. Shimizu, Y. Matsuura, Y. Shu, M. Kurachi, Y. Murayama, S. Onoe, K. Hagiwara, T. Sata, S. Mohri, T. Yokoyama, H. Okada. (2009) Intraspecies transmission of L-type-like bovine spongiform encephalopathy detected in Japan. *Microbiol. Immunol*.53:704-707

Y. Shimizu, Y. Ushiki-K., Y. Iwamaru, T. Muramoto, T. Kitamoto, T. Yokoyama, S. Mohri, Y. Tagawa. (2010) A novel anti-prion protein monoclonal antibody and its single-chain fragment variable derivative with ability to inhibit abnormal prion protein accumulation in cultured cells. *Microbiol. Immunol*.54(2):112-121



Masujin K, Shu Y, Okada H, Matsuura Y, Iwamaru Y, Imamura M, Mohri S, Yokoyama T: Isolation of two distinct prion strains from a scrapie-affected sheep. Arch. Virol. 2009.154: 1929-1932.

境 隆博、田崎 公、倉富英治、中野 基、安楽邦明、秋田定伯、矢野浩規、田中克己、平野明喜. 8字真皮縫合法の検討. 形成外科 52: 451-456, 2009

Akita S, Akino K, Yakabe A, Tanaka K, Anraku K, Yano H, Hirano A. A basic fibroblast growth factor is beneficial for post-operative color analysis in split-thickness skin grafting. Wound Repair Regen., in press

Akita S, Akino K, Hirano A, Ohtsuru A, Yamashita S. Mesenchymal stem cell therapy for cutaneous radiation syndrome. Health Physics, in press.

秋田定伯【Regenerative Medicine 期待される21世紀の新しい医療】感覚器・皮膚・粘膜 皮膚の再生医療の実際と課題 総合臨床 58: 118-123, 2009

秋田定伯 最新の創傷治癒・創傷治療 治療 91: 255-263, 2009

秋田定伯、平野明喜 特集 口唇裂二次修正術 2.鼻翼基部 顎裂骨移植の有用性 PAPER 28: 30-37, 2009

秋田定伯 【特集】細胞増殖因子と創傷治療 白血病抑制因子(LIF) 形成外科 52: 491-499, 2009

秋田定伯 【ケロイド・肥厚性瘢痕癬痕の最新の治療】ケロイド・肥厚性瘢痕癬痕の評価・分類 国際比較 PEPARS 33: 1-6, 2009

秋田定伯 【血管奇形の治療戦略】静脈奇形の硬化療法 硬化剤の選択について 形成外科 52: 1161-1171, 2009

秋田定伯 特集「創傷治療」プライマリ・ケアで対処できる多種多様な“キズ”とその最新知見! 編集 秋田定伯、南山堂、東京、2009年、195ページ

Akita S Editorial, “Progress in Bioengineered Alternative Tissue”, Journal of Wound Technology, Editor, Akita S, Editions MF, Paris, 2009, 79 pages

Takumi I, Goto M, Akimoto M. A Giant Subcutaneous Forehead Abscess and Epidural Extension Caused by Frontal Mucocoele. J Neurol Neurosurg Psychiatry 80 (9): 996-997. (2009).

Takumi I, Akimoto M. One-stage reconstruction using a vascularized calvarial flap for intractable scalp ulcers in relation with cranial implants without removing the whole prosthesis. Neurosurg Rev. 32(3), 363-368, 2009. (DOI 10.1007/s10143-009-0196-2)

Takumi I, Akimoto M. Advantage of Catcher's mask cranioplasty for post-surgical infectious skin trouble. Childs Nerv Syst. 25: 493-495, 2009. (E pub 2009 Jan 17, DOI: 10.1007/s00381-008-0793-3)

児玉南海雄, 太組一朗. プリオン病感染予防ガイドライン(2008年版), p11-13, p84-91

大久保憲. 感染制御に関する最近の動き -CJD プリオンへの対応も含めて-. 病院設備 2009; 51(2): 141-143.

大久保憲 (訳) : 第 30 回日本手術医学会  
特集 (1) グローバルシンポジウム  
Lecture1-4. 日本手術医学会誌 2009;  
30(1): 11-27.

大久保憲. 手術室での感染防止. 中田精  
三編著. 手術室看護の知識と実際 メデ  
ィカ出版 東京 2009. P66-87.

## 2. 学会発表

毛利資郎. 動物モデルを用いたプリオン  
病の伝播研究. プリオン研究会(蔵王),  
8月2009年

秋田定伯, 今泉敏史, 秋野 公造, 平野明  
喜. 間葉系幹細胞を用いた神経再生と  
創傷治癒 第 1 回日本創傷外科学会  
(東京), 1月17日, 2009年

秋田定伯, 秋野 公造, 大津留 晶, 山下  
俊一. 難治性放射線潰瘍に対する自家  
脂肪組織由来幹細胞の開発臨床研究 原  
子力安全委員会 原子力施設等防災専門  
部会 被ばく医療分科会第 21 回 会合,  
4月14日, 東京, 虎ノ門三井ビル

秋田定伯, 草竹兼司, 平野明喜. 頭蓋顔  
面領域の血管奇形エコーガイド下硬化療  
法と顔面部再建について 第 52 回日本  
形成外科学会 (口演) (横浜), 4月22日  
-24日

Akino K, Imaizumi T, Hirano A, Akita S,  
Role of SHC signaling protein in neural  
differentiation and mesenchymal stem cell  
wound healing. Wound Healing Society,  
Dallas, April 26-29, 2009

Akita S, Akino K, Kinoshita N, Hirano A,  
Yamahita S. Role of mesenchymal stem

cells in radiation injuries. Wound Healing  
Society, Dallas, April 26-29, 2009

秋田定伯 当科における血管奇形の治療  
戦略 第 37 回日本血管外科学会 (パネ  
ル) (名古屋), 5月14日, 2009年

Akita S Learning in wound care form the  
Japanese perspective 19<sup>th</sup> EWMA,  
Helsinki, plenary lecture, May 20-22, 2009

Akita S How to diagnose and treat aged  
difficult wounds. European Academy of  
Wound Technology, Elancourt, July 6-8,  
2009

秋田定伯 静脈奇形の症状と治療 第 1  
回血管腫・血管奇形講習会、教育講演、  
札幌、7月17日、2009年

Akita S, Akino K, Kinoshita N, Hirano A,  
Yamashita S. Mechanism and treatment  
with mesenchymal stem cells in radiation  
injuris. ETRS/WHIS joint meeting,  
Limoges, August 25-29, 2009

秋田定伯, 秋野公造, 平野明喜, 大津留  
晃, 山下俊一. 自家脂肪組織由来幹細胞  
を用いた放射線障害の再生医療. 第 13  
回放射線事故医療研究会、招待講演、札  
幌、9月5日、2009年

秋田定伯, 吉本 浩, 古川洋志, 藤岡正  
樹, 平野明喜, 山本有平, 山下俊一. 放  
射線、HIV 関連リポデストロフィー  
克服に向けて-脂肪由来幹細胞移植の有  
用性- 第 18 回日本形成外科学会 基礎  
学術集会、シンポジウム、10月2日、2009  
年

大芦孝平, 秋田定伯, 古川洋志, 中島正  
洋, 平野明喜, 山本有平. HIV 関連リポ  
デストロフィー克服に向けて-移植脂

肪の血流と生着率の関係評価のための動物実験モデル作成- 第 18 回日本形成外科学会 基礎学術集会、パネルディスカッション、10月2日、2009年

木下直志、津田雅由、Rodrigo Hamuy、平野明喜、秋田定伯 ミニブタモデルを用いたエクスパンダーと放射線照射に対する bFGF の放射線防護効果の検討 第 18 回日本形成外科学会 基礎学術集会、10月1日、2009年

Akita S, Kusatake K, Hirano A. Efficacy of sclerotherapy-based reconstruction for craniofacial vascular malformation. 19<sup>th</sup> Japan-China Plastic Surgery Joint meeting, Yokohama, October 5, 2009.

Akita S. Bioengineered alternative tissues. North American Academy of Wound Technology, Norwalk, October 27, 2009.

秋田定伯 わが国のH I V関連リポDESTロフィーの実態と治療展望 第 23 回日本エイズ学会、サテライトシンポジウム、10月27日、2009年

大芦孝平、秋田定伯、中島正洋、平野明喜、山本有平。脂肪移植方法による移植後吸収の変化の検討 第 23 回日本エイズ学会、サテライトシンポジウム、10月27日、2009年

Akino K, Imaizumi T, Hirano A , Akita S. Role of the neural adaptor protein, Shc, on mesenchymal stem cell wound healing and scar process. 第 39 回日本創傷治癒学会 Japan-Korea Joint session、指名講演、東京、12月9日、2009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

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 21 年度 分担研究報告書

PMCA 法を用いた滅菌法評価に関する研究

研究分担者：北本 哲之（東北大学大学院医学系研究科・教授）  
研究協力者：竹内 敦子（東北大学大学院医学系研究科）

研究要旨

異常プリオン蛋白の *in vitro* 増幅系として注目される Protein Misfolding Cyclic Amplification (以下 PMCA) 法を用いて、プリオン滅菌法の効果を評価する方法を検討した。①異なる方法で滅菌したハムスタークレイピー263K 感染脳ホモジネート、あるいは②汚染された手術器具を想定し、段階的に希釈した感染脳ホモジネートを付着させたワイヤーから、それぞれ異常プリオンタンパク質 (PrP<sup>Sc</sup>) をマルチラウンド PMCA によって増幅し、増幅産物である proteinase K (PK) 抵抗性プリオンタンパク質 (PrP<sup>res</sup>) の定量的解析を行った。

A. 研究目的

プリオンは通常の滅菌法に抵抗性を示す。従って、有効な滅菌法の確立のみならず、その滅菌効果を評価することが必要となる。マウスを用いたバイオアッセイは最も高感度な評価法であるが、莫大な費用と時間を要することが問題であった。これに対し PMCA 法は、バイオアッセイと比較してはるかに迅速に PrP<sup>Sc</sup> を増幅することが可能である。本研究は、PMCA 法を利用した迅速かつ高感度なプリオン滅菌法評価系を確立することを目的とする。

B. 研究方法

汚染源としてハムスタークレイピー263K 株感染脳ホモジネートを用いた。

1) 最終濃度 1% (w/v) となる感染脳ホモジネートを、異なる滅菌法 (①アルカリクリーナー; 0.125M NaOH 含有、70°C, 30 分、②3% (w/v) SDS, 100 °C, 5 分、③1 N NaOH, 室温 2 時間、④2 N NaOH, 室温 1 時間) にてそれぞれ処理した。処理後、10%正常脳ホモジネートで 1/100 に希釈し、マルチラウンド PMCA によって残存する PrP<sup>Sc</sup> を増幅した。同時に、10<sup>-5</sup> から

10<sup>-12</sup> まで希釈した未処理の 10% 感染脳ホモジネートを PMCA に供し、対照区とした。増幅産物をそれぞれ PK 処理 (100 µg/ml, 37°C, 30 分) した後、PrP<sup>res</sup> をウェスタンブロット法により検出した。

2) 汚染された手術器具を想定し、ステンレススチールワイヤー (以下 SSW; SUS316, 直径 0.3 mm, 長さ 3.0 mm) を 10<sup>-1</sup> から 10<sup>-9</sup> まで希釈した感染脳ホモジネートに 1 時間浸漬し、一晚乾燥させた。その後汚染 SSW を 10%正常脳ホモジネートに投入し、付着した PrP<sup>Sc</sup> をマルチラウンド PMCA によって増幅、PK 処理 (50 µg/ml, 37°C, 1 時間) し、ウェスタンブロット法により検出した。

(倫理面への配慮)

本研究では東北大学における動物実験等に関する規程に基づいて採取された臓器を使用して実験を行っている。

C. 研究結果

マルチラウンド PMCA では、PrP<sup>Sc</sup> が微量であるほど増幅にかかるラウンド数が多くなることから、PrP<sup>res</sup> が検出されたラウンド数を比較することで残存する

PrP<sup>Sc</sup> を定量的に解析することが可能であった。脳ホモジネートを用いた PMCA では、10<sup>-9</sup> 希釈まで定量的解析が可能であり、NaOH 処理と比較してアルカリクリーナーまたは SDS 処理による不活化効果が顕著に高かった。SSW に付着させた PrP<sup>Sc</sup> についても、PMCA による増幅と定量的解析が可能であったが、SSW を用いた場合、10<sup>-7</sup> 希釈まで定量可能であった。また、感染脳を添加しない全てのサンプルで、PrP<sup>res</sup> は検出されなかった。

#### D. 考察

脳ホモジネートを用いた場合、10<sup>-9</sup> 希釈から PrP<sup>res</sup> 検出までにかかる日数は約 10 日であり、数 100 日を要するバイオアッセイと比較して圧倒的に迅速かつ、より高感度な定量的解析が可能であった。一方、SSW に付着させた感染脳からの増幅効率は脳ホモジネートを用いた場合よりも低く、検出感度は 100 倍程度低下した。このことから、SSW を用いるよりも感染脳ホモジネートを用いたほうが高感度に滅菌効果进行评估できると考えられた。

#### E. 結論

PMCA 法によって、滅菌法の不活化効果を定量的に評価できた。また、脳ホモジネートを用いた場合でも、10<sup>-9</sup> 以下の希釈からは PMCA 法による定量的解析は困難であることが示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Hizume M, Kobayashi A, Teruya K, Ohashi H, Ironside JW, Mohri S, Kitamoto T. Human Prion Protein (PrP) 219K is converted to PrP<sup>Sc</sup> but shows heterozygous inhibition in variant Creutzfeldt-Jakob disease infection. *J Biol Chem*. 2009, 284: 3603-3609

2) Hamaguchi T, Noguchi-Shinohara M, Nozaki I, Nakamura Y, Sato T, Kitamoto T, Mizusawa H, Yamada M. Medical procedures and risk for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease, Japan, 1999-2008. *Emerg Infect Dis*. 2009 Feb;15(2):265-71.

3) Hiraga C, Kobayashi A, Kitamoto T. The number of octapeptide repeat affects the expression and conversion of prion protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 382:715-719.

4) Kobayashi A, Hizume M, Teruya K, Mohri S, Kitamoto T: Heterozygous inhibition in prion infection—The stone fence model. *Prion* 2009, 3:27-30

5) Shinde A, Kunieda T, Kinoshita Y, Wate R, Nakano S, Ito H, Yamada M, Kitamoto T, Nakamura Y, Matsumoto S, Kusaka H. The first Japanese patient with variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD). *Neuropathology* (in press)

6) Hama T, Iwasaki Y, Niwa H, Yoshida M, Hashizume Y, Kitamoto T, Murakami N, Sobue G. An autopsied case of panencephalopathic-type Creutzfeldt-Jakob disease with mutation in the prion protein gene at codon 232 and type 1 prion protein. *Neuropathology*. 2009 (in press)

7) Shimizu H, Yamada M, Matsubara N, Takano H, Umeda Y, Kawase Y, Kitamoto T, Nishizawa M, Takahashi H. Creutzfeldt-Jakob disease with an M232R substitution: report of a patient showing slowly progressive disease with abundant plaque-like PrP deposits in the cerebellum. *Neuropathology*. 2009 (in press)

8) Iwasaki Y, Kizawa M, Hori N, Kitamoto T, Sobue G. A case of Gerstmann-Sträussler- Scheinker syndrome with the P105L prion protein gene mutation presenting with ataxia and extrapyramidal signs without spastic paraparesis. 2009 Sep;111(7):606-9.

9) Yamada M, Noguchi-Shinohara M, Hamaguchi T, Nozaki I, Kitamoto T, Sato T, Nakamura Y, Mizusawa H. Dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease in Japan: Clinicopathological and molecular characterization of the two distinct subtypes. *Neuropathology*. 2009 29:609-618

10) Kobayashi A, Asano M, Mohri S, Kitamoto T. A traceback phenomenon can reveal the origin of prion infection. *Neuropathology*. 2009 29:619-624

11) Hamaguchi T, Noguchi-Shinohara M, Nozaki I, Nakamura Y, Sato T, Kitamoto T, Mizusawa H, Yamada M. The risk of iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease through medical and surgical procedures. *Neuropathology*. 2009, 29:625-631

12) Ikawa M, Yoneda M, Matsunaga A, Nakagawa H, Kazama-Suzuki A, Miyashita N, Naiki H, Kitamoto T, Kuriyama M. Unique clinicopathological features and PrP profiles in the first autopsied case of dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease with codon 219 lysine allele observed in Japanese population. *J Neurol Sci*. 2009 (in press)

13) Yoshida H, Terada S, Ishizu H, Ikeda K, Hayabara T, Ikeda K, Deguchi K, Touge T, Kitamoto T, Kuroda S. An autopsy case of Creutzfeldt-Jakob disease with a V180I mutation of the PrP gene and

Alzheimer-type pathology. *Neuropathology*. 2009 (in press)

14) Terada T, Tsuboi Y, Obi T, Doh-Ura K, Murayama S, Kitamoto T, Yamada T, Mizoguchi K. Less protease-resistant PrP in a patient with sporadic CJD treated with intraventricular pentosan polysulphate. *Acta Neurol Scand*. 2009 (in press)

15) Kobayashi A, Sakuma N, Matsuura Y, Mohri S, Aguzzi A, Kitamoto T. Experimental verification of a traceback phenomenon in prion infection. *J. Virol*. 2010.84(7)3230-3238

16) Hizume M, Kobayashi A, Mizusawa H, Kitamoto T. Amino acid conditions near the GPI anchor attachment site of prion protein for the conversion and the GPI anchoring. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2010.391:1681-1686

2. 学会発表  
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  
なし  
2. 実用新案登録  
なし  
3. その他  
なし

## プリオン病2次感染に対する現実的滅菌法の開発に関する研究 「手術器具付着ヒトプリオンの現実的除染方法の開発」

研究分担者：毛利 資郎（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次感染を目的として、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、安全を検証するために、手術器具を模したワイヤーを用いて、滅菌法（不活化処理法）の評価を行った。本年度は昨年までに行った、熱処理、アルカリ（NaOH）処理、SDS加熱処理について、バイオアッセイの経過をまとめることに加えて、それぞれの処理方法を組み合わせた不活化処理、アルカリクリーナーによる洗浄処理を行い感染性の減弱についてバイオアッセイを行った。その結果、これまで効果があるとされてきたプリオン滅菌法の単独処理ではヒトプリオンを完全に不活化することは困難であることが判明した。しかしながら、それらの滅菌法を組み合わせることにより、効果的な滅菌結果が得られることが明らかとなった。

### 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おり、通常の滅菌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病院の現場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 型）を不活化対象材料として、ヒト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蛋白質遺伝子導入の KiChM マウスを用いて感染性の評価を

行った。また、陰性コントロールとして、アルツハイマー病患者由来の脳乳剤を用いた。

#### 2) 汚染手術器具を模したステンレスワイヤー

手術器具を模したステンレス製ワイヤー（SUS316、長さ 3mm、線径 0.3mm）を 2% Triton-X-100 溶液中で超音波処理し、蒸留水で洗浄後、37℃、60 分間乾燥させた。ヒト希釈脳乳剤に 30 分間浸漬し、一晚乾燥させた。同様に End-point titration assay のために、 $10^0$ - $10^8$  の脳乳剤、非汚染対照ワイヤーとしてとして PBS にそれぞれ浸漬後、乾燥したワイヤーを作製した。

#### 3) 滅菌処理

$H3 \times 10^1$  を接着させたワイヤーについて以下の滅菌処理を行った。

##### ①水洗

②オートクレーブ処理（121℃/20 分、134℃/20 分）

③蒸留水中にてオートクレーブ処理（121℃/20 分、134℃/20 分）



④最終濃度 3%の SDS 溶液にて 10 分間煮沸 (1.8-3.0% SDS)。

⑤最終濃度 3%の SDS 溶液にて 10 分間煮沸 (1.8-3.0% SDS) 後オートクレーブ処理 (121°C/20 分、134°C/20 分)

⑥処理開始時濃度 3.0%の SDS 溶液にて 5 分間煮沸。

⑦処理開始時濃度 3.0%の SDS 溶液にて 5 分間煮沸後、オートクレーブ処理 (121°C/20 分、134°C/20 分)

⑧処理開始時濃度 3.0%の SDS 溶液中に浸漬状態でオートクレーブ処理 (121°C/20 分、134°C/20 分)

⑨ 1M-NaOH 水溶液処理 (室温、1 時間)。

⑩ 1M-NaOH 水溶液処理 (室温、1 時間) 後オートクレーブ (121°C/20 分、134°C/20 分)

⑪ 2M-NaOH 水溶液処理 (室温、1 時間)

⑫ 2M-NaOH 水溶液処理 (室温、1 時間) 後オートクレーブ (121°C/20 分、134°C/20 分)

⑬最終濃度 3.0%の SDS 溶液 (pH8.0、12.8) 中で 5 分間煮沸。

⑭Alkaline cleaner (S クリーン)

55-R : 強アルカリ性タイプ

55-S : 界面活性剤配合タイプ

55-M : 弱アルカリ性、界面活性剤無配合タイプ

濃度 : 0.3% (標準使用濃度) , 2%、

温度 : 50°C, 90°C、時間 : 5 分、20 分

4) マウスによるバイオアッセイ

KiChM マウスはネンプター麻酔液 (0.01ml/g) を腹腔内投与後、特注の押し出し式注射針 (0.7×13mm) を使用して、マウス左脳にワイヤーを埋め込み、週 3 回以上の観察を行い、発症の有無を観察した。発症もしくは状態が悪くなったマウスは、安楽死の処置を行い、左脳をホルマリン固定し、病理組織切片を作成し、HE 染色と異常プリオン蛋白質 (PrP<sup>Sc</sup>) の免疫染色を行った。右脳は凍結保存し、ウェス

タンブロットティング (WB) を行った。病理組織学的診断および WB の結果により、どちらか一つでも陽性と判定された場合に、感染性有りと判定した。

(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. 結果

### 1) 希釈実験

ワイヤーに塗布したヒト CJD の感染価の基準作製のために行った End-point titration assay の結果を表 1 に示した。10<sup>1</sup>-10<sup>8</sup> の希釈脳乳剤 20 μl を直接脳内接種したマウスは 10<sup>-6</sup> まで感染が検出された。一方、10<sup>0</sup>-10<sup>-8</sup> の希釈脳乳剤を塗布したワイヤーでは、10<sup>-7</sup>、10<sup>-8</sup> でそれぞれ 1 頭の感染が確認され、希釈終末が求められなかった (表 1)。

### 2) 滅菌処理効果 (バイオアッセイ)

オートクレーブ滅菌による潜伏期間は無処理対照の水洗のみにワイヤー群に比べて延長はするものの 121°C/20 分 134°C/20 分のいずれもすべてのマウスが感染した (表 2)。

最終濃度 3%の SDS 溶液にて 10 分間煮沸 (1.8-3.0% SDS)、処理開始時濃度 3.0%の SDS 溶液にて 5 分間煮沸はいずれも全頭感染した。しかし、SDS 処理後にオートクレーブを行うことにより、最終濃度 3%SDS 溶液にて 10 分間煮沸 (1.8-3.0% SDS) 群では 121°C で 1 頭のみの感染 (1/6) があり、134°C オートクレーブ群では感染が成立しなかった (0/5)。SDS 濃度のより濃い、処理開始時濃度 3.0%の SDS 溶液にて 5 分間煮沸群では、オートクレーブ処理を加えることにより 480 日経過観察中であるが感染が認められていない。

1 M-NaOH 水溶液処理 (室温、1 時間) 群も全頭感染が認められ、2 M-NaOH 水溶

液処理（室温、1時間）群からも203日で1頭感染が認められている（表3）。1M-NaOH水溶液処理後にオートクレーブ処理を追加した群では121℃、20分処理では2頭感染が認められた（2/6）が、134℃、20分の処理群では800日を経過しても感染は認められていない。

最終濃度3.0%のSDS溶液（pH8.0、12.8）中で5分間煮沸群では360日で経過観察中であるが、今のところ感染は全く認められていない（表3）

Alkaline cleaner（Sクリーン）洗浄群は観察期間が短いため、まだ、バイオアッセイのマウスを観察中である。（データ省略）。

#### D. 考察

プリオン滅菌法として一般的に推奨されている不活化処理法の中から、病院の現場で応用可能であると考えられる現実的滅菌処理法を選択し、ヒトプリオンの不活化効果について感染性を指標としたバイオアッセイを行い評価した。その結果、一般的に推奨されているプリオン滅菌法単一の処置では感染性を完全に消滅させることができなかった。このことは、たとえば、スクレイピープリオンで高い滅菌効果が得られた方法であっても（Fichet *et al.*, 2004, Lemmer *et al.*, 2008）、ヒトプリオンでの感染性を消滅させることは困難であることを示している。これまで推奨されてきたSDS処理法単独でヒトプリオンの感染性を消滅させることは不可能であったが、134℃のオートクレーブ処理を加えることにより感染性を完全に除去できることから、病院の手術現場でもオートクレーブをかける前にSDS処理を行えば感染性の完全な除去が行えることが示された（表2）。現在、接種後480日経過して観察中であるが、3%SDS溶液に浸漬したままオートクレーブをかけることにより省力的で完全な滅菌方法となることが期待できる（表3）。

アルカリ処理も同様に、1M、2Mのアル

カリ溶液中で室温1時間処理をしても感染性は消滅しないが、134℃のオートクレーブ処理を追加することにより、感染性を完全に消滅できることが示された（表3）。

#### E. 結論

一般的に推奨されているプリオン滅菌法単一の処置ではヒトプリオンの感染性を完全に消滅させることができないことを明らかにした。一方、3%SDS処理5分、あるいは1M-NaOH水溶液処理（室温、1時間）の後の134℃のオートクレーブ処理により、感染性の消滅が実証された。このことから、オートクレーブ処理の前に3%SDS処理5分、あるいは1M-NaOH水溶液処理（室温、1時間）の工程を入れることが、病院の現場で対応可能な現実的滅菌方法として有効であることが明らかとなった。

バイオアッセイが終了後、手術器具による2次感染を防止する新しいプリオン滅菌法として厚生労働省の「プリオン病感染予防ガイドライン」に提案する予定である。

表1. 希釈乳剤接着Wireを埋め込んだマウスの発症状況と潜伏期間

Dilution of inoculum	Diseased /Inoculated	Mean survival time $\pm$ S.D. (days)
H3 $\times 10^{-1}$	5/5	140.2 $\pm$ 7.6 (133 ~ 153)
H3 $\times 10^{-2}$	6/6	155.5 $\pm$ 6.9 (150 ~ 164)
H3 $\times 10^{-3}$	6/6	184.0 $\pm$ 22.3 (157 ~ 220)
H3 $\times 10^{-4}$	6/6	219.3 $\pm$ 21.3 (206 ~ 261)
H3 $\times 10^{-5}$	3/6	240.3 $\pm$ 65.2 (195 ~ 315, >512)
H3 $\times 10^{-6}$	1/6	328, 532 <
H3 $\times 10^{-7}$	0/6	532 <
H3 $\times 10^{-8}$	0/6	532 <
Wire H3 $\times 10^0$	6/6	201.0 $\pm$ 82.0 ( 84 ~ 323)
Wire H3 $\times 10^{-1}$	6/6	174.2 $\pm$ 10.5 (162 ~ 187)
Wire H3 $\times 10^{-2}$	6/6	180.8 $\pm$ 23.7 (153 ~ 211)
Wire H3 $\times 10^{-3}$	6/6	215.3 $\pm$ 47.6 (167 ~ 294)
Wire H3 $\times 10^{-4}$	5/6	196.6 $\pm$ 13.2 (183 ~ 215, >713)
Wire H3 $\times 10^{-5}$	6/6	254.2 $\pm$ 71.7 (215 ~ 400)
Wire H3 $\times 10^{-6}$	6/6	240.0 $\pm$ 56.1 (169 ~ 301)
Wire H3 $\times 10^{-7}$	1/6	287, >713
Wire H3 $\times 10^{-8}$	1/6	314, >713
Wire 1 $\times$ PBS	0/6	>713
Wire AD $\times 10^{-1}$	0/6	>678

表2 熱処理、SDS 処理およびそれらの複合処理

Treatments	Fine surface wire		Pathology	
	affected / implanted	Incubation period (mean days)	positive ( days)	Negative ( days)
Rinsed in dH <sub>2</sub> O and dry	6/6	206.8 ± 18.8	188,188,195 , 218,221,231	
AC.# 121°C, 20min.	6/6	251.0 ± 27.0	218,228,242 , 260,267,291	
AC. 134°C, 20min.	6/6	250.3 ± 51.2	209,209,242 , 242,252,348	
AC. in dH <sub>2</sub> O, 121°C, 20min.	5/5	225.6 ± 25.6	188,225,225 , 230,260	
AC. in dH <sub>2</sub> O, 134°C, 20min.	6/6	249.8 ± 49.9	200,217,223 , 258,262,339	
SDS 1.8-3.0%, boiling, 10min.	6/6	278.0 ± 20.0	253,256,280 , 287,287,305	
SDS 1.8-3.0%, boiling, 10min. +AC. 121°C, 20min.	1/6	425	425	662,728,775 , 798,810
SDS 1.8-3.0%, boiling, 10min. +AC. 134°C, 20min.	0/5			579,790,790 , 796,800
3.0%SDS, boiling, 5min.	5/5	292.6 ± 40.8	251,267,286 , 302,357	
3.0%SDS, boiling, 5min. + AC. 121°C, 20min.	0/6	>480		
3.0%SDS, boiling, 5min. + AC. 134°C, 20min.	0/6	>480		
AC. (121°C, 20min.) In 3.0%SDS	0/6	>480		307
AC. (134°C, 20min.) in 3.0%SDS	0/6	>480		

# AC. : autoclaving