

Yunoki, M., Tanaka, H., Urayama, T., Kanai, Y., Nishida, A., Yoshikawa, M., Ohkubo, Y., Kawabata, Y., Hagiwara, K., Ikuta, K.	Infectious prion protein in the filtrate even after 15 nm filtration	<i>Biologicals</i>	38	311-313	2010
--	--	--------------------	----	---------	------

バイオ医薬品におけるプリオンの問題  
—ヒト赤血球を原料とする人工酸素運搬体をめぐる問題—

柚木 幹弘, 萩原 克郎, 生田 和良

# バイオ医薬品におけるプリオンの問題 — ヒト赤血球を原料とする人工酸素運搬体をめぐる問題 —

## Current Situation of Prion Risks on Biological Products - Points on the Consideration for Prion Risk in Artificial Blood Products Derived from Human Red Cells -

榎木 幹弘<sup>(1,2,3)</sup>, 萩原 克郎<sup>(2)</sup>, 生田 和良<sup>(3)</sup>

Mikihiro Yunoki<sup>(1,2,3)</sup>, Katsuro Hagiwara<sup>(2)</sup>, Kazuyoshi Ikuta<sup>(3)</sup>

### 和文抄録

生体成分を原料とするバイオ医薬品やヒト血液成分を原料とする血漿分画製剤には感染性病原体の理論的混入リスクが存在する。そのため、製造工程における安全対策の導入と製造工程中の感染性病原体の不活化・除去能力の評価が求められている。本稿では、ヒト血液由来の赤血球を原料とする人工酸素運搬体を中心に、注目すべき感染性病原体のひとつであるプリオンの問題に関して、1) 疫学などの背景、2) 輸血領域で現在とられている施策、3) バイオ医薬品のプリオンに対する安全対策研究の現状、などについて概説する。

### Abstract

Biological products derived from animal materials and human blood theoretically carry the possible risks of contamination with infectious pathogens. Therefore, to employ the safety measures against the risks during manufacturing process, evaluation for pathogen inactivation and/or removal ability during the manufacturing process steps in individual products are required. Prion issue is an important risk factor of the biological / blood products. In this manuscript, points to consider the above possibility such as 1) epidemiology and background of prion issue, 2) safety measures against prion risks in blood transfusion and blood products fields, and 3) current situation through several researches against prion risks in the field, are summarized.

### Keywords

Prion, Biological product, Blood, Safety, vCJD

### 1. はじめに

抗体医薬を始めとするバイオ医薬品の基本的な製造手法は確立されており、原料や細胞由来の病原体混入リスクや製造工程における病原体等の不活化・除去能力の評価に関する多くの知見が集積されている。血液製剤や血漿分画製剤についても、多くの研究や対策の実施、教訓によって得られた数多くの知見の集積がある。一方、新しい領域の血液代替物は開発途上であるが故に、これらのリスク評価は研究成果の集積途上にあると言える。このような製剤には、その製剤特性を理解した上でバイオ医薬品や血液・血漿分画製剤で得られた知見からそのリスク

の全容を俯瞰し、製造工程をデザインした上で、その製剤のリスクを評価する必要がある。本稿では研究開発途上の血液代替物の一つであり、日本の献血血液由来の赤血球を原料とする人工酸素運搬体を中心にバイオ医薬品におけるプリオン問題の現状について概説する。

### 2. BSE 及び vCJD の発生

1986年、英国においてこれまでに確認されていない神経症状を呈するウシの疾患が流行していることが報告された。この疾患は狂牛病 (Mad Cow Disease) と一般的に報道されたが、学

(1) 榎ベネシス安全管理部 品質安全対策グループ 〒541-8505 大阪市中央区北浜2-6-18 Pathogenic Risk Management, Benesis Corp. Pathogenic Risk Management, Benesis Corporation, 2-6-18, Kitahama, Chuo-ku, Osaka, 541-8505 Japan.

(2) 酪農学園大学大学院獣医学研究科 病原体リスク管理学講座 School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University

(3) 大阪大学微生物病研究所 ウイルス免疫分野 Department of Virology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University

論文受付 2010年1月23日 論文受理 2011年1月24日

術的には伝染性海綿脳症 (Transmissible Spongiform Encephalopathy, TSE) のひとつであり、ウシ海綿状脳症 (Bovine Spongiform Encephalopathy, BSE) と名付けられた。このBSE発生の原因が、ヒツジのTSEであるスクレイピーに感染した個体を含む肉骨粉の摂取によることが指摘され、BSEは羊のTSEの原因物質による感染によって生じることが疑われた。英国の公衆衛生当局は、英国内の家畜飼料からこの肉骨粉を排除する決定と、ウシ全頭モニタリング制度を導入することにより、更なる流行の拡大を抑止した。BSEは全世界的に流行する事が懸念されたが、そのほとんどが英国での発生にとどまり1992年をピーク (年間発生頭数約37,000頭) にその発生は減少した (Fig. 1)<sup>1,2)</sup>。

日本においては2001年にBSEの発生が初めて確認され、その後、英国と同様の全頭モニタリング制度の導入と全頭検査が導入された。日本では2010年12月現在で総計36例の発生が確認されている<sup>3)</sup>。

ところが、1996年に英国においてこれまでに確認されていない病態を呈するクロイツフェルトヤコブ病 (Creutzfeldt-Jakob Disease, CJD) が報告された。この新しいヒトの疾患はこれまでのCJDとは違い若年性であることが特徴であるとされ、変異型CJD (Valiant CJD, vCJD) と命名された。このvCJDはBSE同様にほとんどが英国で発見され、その流行パターンがBSEのパターンと相関関係にあることから、vCJDの原因がBSE発症ウシ由来の原料の摂取によるものと疑われた。このvCJDはBSE同様に全世界的に流行・拡大することが懸念されたが大流行には至らず、全世界の現時点での総発生数は221名となっている。一番多く発生した英国では2000年に28例の発生をピークとした現時点の総計174名 (内、生存4例)、続いてフランスの2005-2006年の6例をピークとする総計25名であった (図1)<sup>2,4)</sup>。日本においては2004年にvCJD患者が1名 (英国渡航歴有) 発生している<sup>5)</sup>。

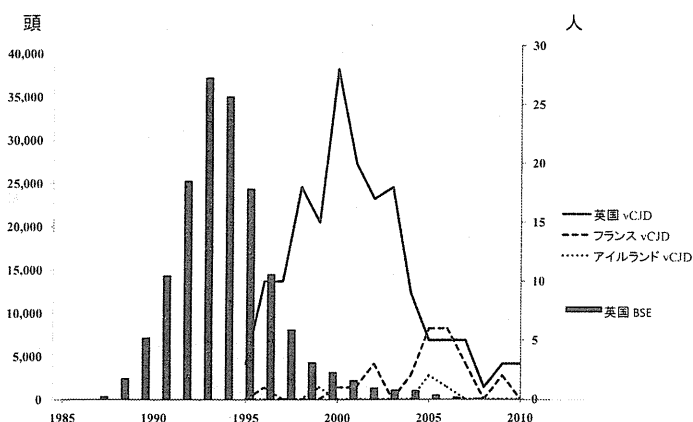


Fig. 1. BSEとvCJDの流行経過 (引用1) 2) より改変)。

### 3. 伝達性海綿状脳症の原因物質であるプリオン蛋白

CJD/vCJD, BSE, ScrapieなどのTSEの原因物質については長い間論争があったが、1982年にPrusinerがプリオン説を提唱したことで一定の収束を得た<sup>6)</sup>。プリオン (Prion) とは蛋白性の感染性粒子という意味であるProteinaceous Infectious Particleの短縮形造語であり、この感染性病原体はウイルス等と異なり遺伝情報を持たない蛋白質そのものである。ヒトの正常型プリオン蛋白 (Cellular Prion protein, PrP<sup>C</sup>) はCD230と同じで、第20番染色体にPRNP遺伝子としてコードされている<sup>7)</sup>。病原体としての感染性プリオン蛋白はウイルス等の外来性物質ではなく、宿主の蛋白分解酵素感受性で $\alpha$ ヘリックスリッチな構造をしているPrP<sup>C</sup>が $\beta$ シートリッチな構造をとる、蛋白分解酵素抵抗性 (Proteinase resistance prion protein, PrP<sup>Res</sup>) の構造に変換したものである。これを異常型プリオン蛋白と呼ぶが、PrP<sup>Res</sup>の種類により蛋白質分解酵素への抵抗性は同じではない。この構造変換はPrP<sup>Res</sup>を種として、体内のPrP<sup>C</sup>が徐々にPrP<sup>Res</sup>に変化・結合・集積するものと考えられている。また、感染性プリオン蛋白は単量体でなく重合体として存在していると考えられ、粒子径10nm以下の重合体は感染性がなく、20~25nmの粒子径のものが最も感染性が高いとの報告がある<sup>8)</sup>。通常病原体はその存続のために宿主に感染・増殖し、遺伝情報の伝達により子孫を増やすというのが一般的な理解である。しかしながら、このプリオンは存続させるべき遺伝情報を持たないことから、これまでの概念に一石を投じることになった。これらのプリオン蛋白は、高次構造の違いを除いて宿主蛋白そのものであることから、新しい感染性病原体の概念がここに確立することになった。

### 4. 社会の反応

BSEとvCJDの関連性が指摘された事は、畜産を中心とした食品安全上のBSE問題を再び惹起する事となった。さらに、感染性プリオン蛋白は蛋白分解酵素に抵抗性であるだけでなく、121℃のオートクレーブ滅菌にも耐えるなど不活化が困難であることから、医薬品領域においても大きな問題を惹起した。医薬品にはゼラチンカプセルなどウシ由来の原材料が数多く使用されていることから、日欧米の規制当局はプリオンに関するガイダンスの制定や行政指導をおこなった。厚生労働省も、1996年にメーカーに対してウシ由来原材料の使用実態と原産国の把握を求めた<sup>9)</sup>、そしてプリオンに対するリスク評価を2000年に求めた<sup>10)</sup>。メーカーはこのBSE問題に対応するとともに、可能なものについてはウシ由来以外の原料への切り替えを行った。

ヒトや動物組織を原料とする蛋白医薬製剤は、その製剤化工程で強力な蛋白変性操作は導入されていない。そこで、ヨーロッパの規制当局は1998, 2003, 2004, 2009, 2010年にプリオンのリスク評価に関する見解を発出した<sup>11, 12, 13)</sup>。日本においても2003年に厚生労働省よりプリオン対策強化が通知された<sup>14)</sup>。これを受け、ウシ組織抽出物由来の医薬品や血液製剤のメーカーは各蛋白医薬製剤に導入されている工程のプリオン除去能力

の評価を行い、必要に応じてプリオンに対するリスク低減のために、ウシ原産国の変更や新たな工程の導入を実施した。

## 5. CJDの疫学

ヒトのプリオン病であるCJDには孤発性CJD (Sporadic CJD, sCJD)、家族(遺伝)性CJD (Familial CJD, fCJD)、医原性CJD (iatrogenic CJD, iCJD)そしてvCJDがある。sCJDは55歳以上のヒトに約100万人に1人の割合で発症するCJDであるが、輸血などを通じてのヒト-ヒト感染例の報告は現時点ではない。医薬品への感染性プリオン蛋白の混入リスクが高いもののひとつに、輸血を始めとする血液製剤がある。献血後にvCJDに感染していることが判明したドナー由来の血液製剤を輸血された事例が英国で確認され、現時点で受血者4名がvCJDに感染したと考えられている<sup>15)</sup>。2010年のWHO見解ではヒト血液は低感染性組織のカテゴリーに分類され、vCJDの感染性あり、CJDは感染性なしと判断されている<sup>16)</sup>。更に、英国では血友病患者もモニタリングされている。本年、死亡した血友病患者の病理解剖を行ったところ、脾臓に異常型プリオン蛋白が発見された<sup>17)</sup>。この患者は生前に神経症状を発症していなかったにも関わらずvCJDに感染していた。英国健康保健局 (Health Protection Agency, HPA) 及び米国食品医薬品局 (Food and Drug Administration, FDA) は見解を出したが、そのリスクレベルの変更は行わなかった<sup>18,19)</sup>。この事例は輸血製剤だけではなく血漿分画製剤でもリスクが残存することを示すことになった。2010年、欧米の規制当局はそれぞれ、メーカーが実施する製剤のリスクアセスメントに関するガイダンス(改定案)を発表した<sup>11,13,20)</sup>。また、他の医原性感染として硬膜移植、ヒト脳下垂体由来製剤(成長ホルモンなど)、角膜移植や手術器具を介しての感染も認められている<sup>21,22)</sup>。

日本ではCJDのサーベイランスが実施されており、1999年から2009年までの間に確認された1324例のCJDは、sCJDが1019例(77%)、fCJDが220例(16.6%)、iCJD(全例硬膜移植)が80例(6.0%、期間外を加えると総計138名)、vCJDが1例(0.1%)、分類できないCJDが4例(0.3%)であった<sup>22)</sup>。この中で実際に輸血によるリスクがあると考えられるドナーとなりうるのはiCJDとvCJD患者由来であるが、手術歴などの確認によりiCJD患者がドナーになる可能性を排除しており、現実にはvCJDのリスクを検討する必要がある。日本のvCJDは現時点で1例であるが、英国渡航に由来してvCJDに感染するリスクと、その感染者が献血し、輸血を通して国内で感染が拡大するリスクを検討したところ、2007年までに0.06人が発症し、ポアソン分布を適用すると少なくとも1人の発生は否定できないが、2人以上の発生は極めて低いという結果が得られた。次に輸血による感染予測が行われた。モデル予測は、1) 1990年に20代前半の感染者が1名存在し、2) 輸血感染による潜伏期間は食餌による感染時と同じ、3) 汚染血の輸血で必ず感染、4) 輸血歴のある人や海外渡航歴のある人の献血制限は実施しない、5) 輸血経験者の死亡率は増加しないという条件で実施した。その結果、感染者数は2003年ごろにピークを迎え、累

積発症者数の増加は2010年代の前半でほぼ終わり、0.563人という結果となった。これらの結果から、現在のBSE/vCJDの疫学状況等の知見が大きく変化しない限り、2010年以降の日本における輸血によるvCJD感染が現実に発生する可能性は非常に低いと考えられる<sup>23)</sup>。

## 6. 血液及び血液成分のリスクとその低減策

プリオンリスクの実効的対策は、検査によるリスク排除である。現在、日本ではウシに対して世界でも例を見ない全数検査を行っており、世界的にも最高レベルの対策を取っている。これに加えて、餌の管理、臨床症状のモニタリング、イヤータグによる全数管理、屠場での解体方法や交差汚染の管理など、多くの対策を組み合わせることによってその安全性を確保している。ヒトのvCJDについてもウシの場合と同様に多数の検体を迅速に安価に検査する方法を開発する必要がある。vCJD検査の産業応用できる手法として、蛋白分解酵素を用いないELISA法が提案されている<sup>24)</sup>。しかしながら産業応用可能でCJD/vCJDに有効な検査手法は現時点で開発されていない<sup>25)</sup>。

血液は主に赤血球、血小板、白血球、血漿の画分に分けることができる。プリオン蛋白は細胞膜上に存在すると考えられていることから、血液細胞が輸血領域における主なプリオン伝播リスクであると考えられる。輸血によるvCJD感染リスクの低減策を講じる必要があるが、献血基準の中にCJD/vCJDリスクを低減させる問診項目として英国などの滞在歴を設定し、ドナーの適格性を確保している。また、白血球除去フィルターがプリオン除去に効果があるとされ、その効果が確認されているものもある<sup>25,26)</sup>。血漿分画製剤の原料となる血漿については、更に6カ月の貯留保管を行った後に日本赤十字社からメーカーに出荷されることにより、採血(原料)段階でのリスク低減を行っている。更に、血漿分画製剤の製造工程においてプリオンを除去する工程を導入することによりその安全性の確保に努めている<sup>27)</sup>。

## 7. 人工酸素運搬体

現在開発研究が進められている人工酸素運搬体の種類はいくつかあるが、その多くはヒト赤血球よりヘモグロビンを抽出・精製した高純度・高濃度のヒトヘモグロビン(Hb)溶液を原料とし、脂質二重膜で包埋したりポソーム型又は非カプセル型架橋修飾・PEG修飾の形状をとる<sup>28)</sup>。ヒト赤血球の大きさは約8 $\mu$ m、精製したHbは約4nmの大きさであり、これを小胞体に包埋した時の小胞体径は約200~250nmである<sup>28,29)</sup>。これらの運搬体はHbをヒト赤血球から得ていることから、ドナー由来の病原体の混入が理論的なリスク因子として存在する。この人工酸素運搬体に使用されるHbは赤血球を出発原料として精製されるが、Hbの大きさが約4nmに対して、異常型プリオン蛋白単分子の分子量は約30,000、感染性プリオン蛋白の粒子は10nm以上の重合体<sup>3)</sup>と考えられる。Hbの精製工程におけるプリオン除去は血漿分画製剤の製造工程に導入されているプリオン除去手法を応用可能であると考えられ、人工酸素運搬体の製

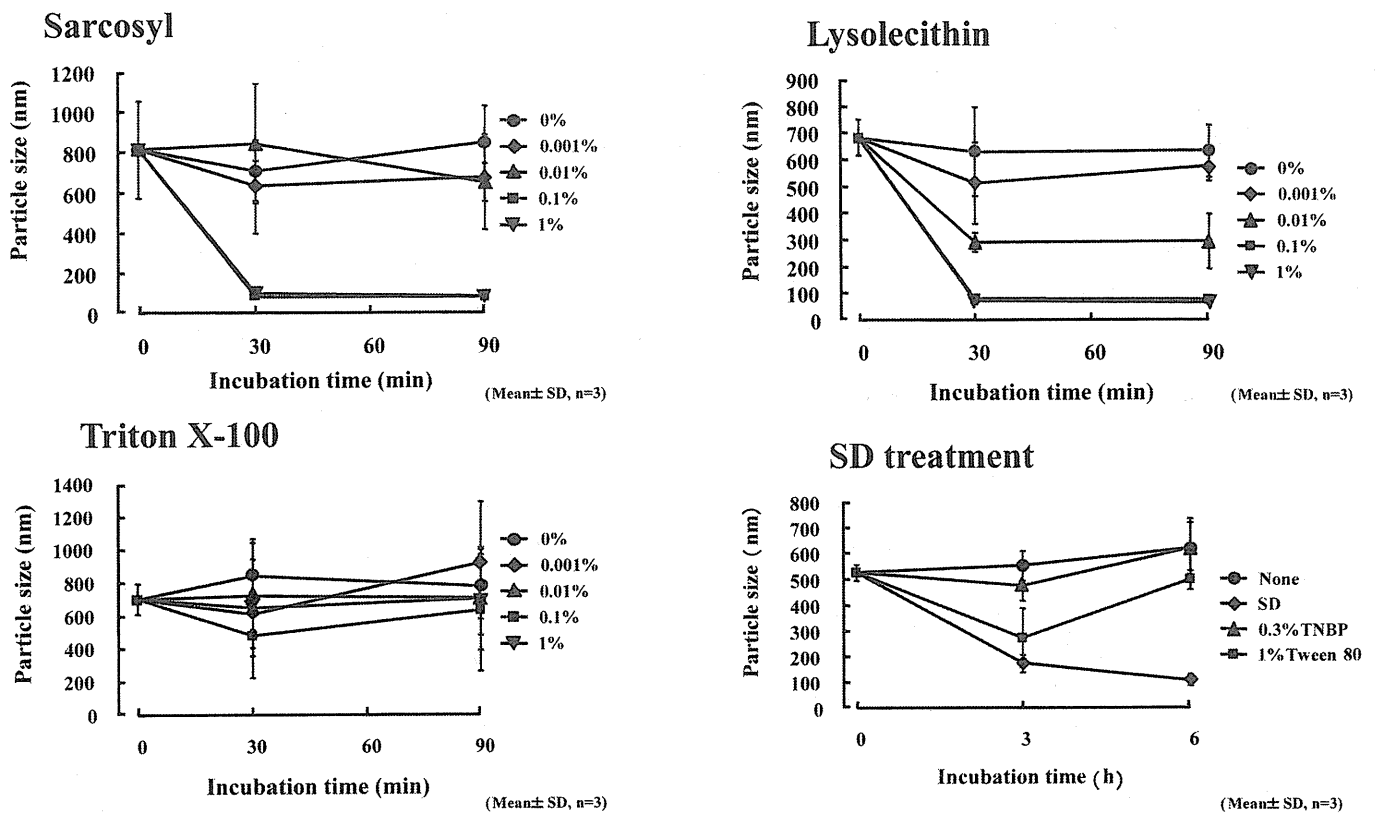


Fig. 2. 界面活性剤処理による263K株感染ハムスター脳由来マイクロソーム画分の粒子径変化 (文献30より引用)。

造工程にプリオン除去工程を導入するには赤血球からヘモグロビンを精製する過程に導入するのが適している。

#### 8. 工程評価を行う上でのプリオン材料調製法の問題

プリオン除去に関する工程評価を行う場合、感染動物の脳を出発材料として調製することが一般的である。プリオン研究初期には脳ホモジネート (Brain Homogenate, BH) を用いていたが、その後は精製操作を加えて膜画分 (Microsomal Fraction, MF) が主に使われるようになった。本来、工程評価に用いるプリオン材料は感染動物の血液や血漿を用いることが望ましい。しかしながら、血液から工程評価に用いることができる量の感染性プリオン蛋白を得ることは困難であり、このMFを使用せざるを得ない。しかしながらMFは工程評価に用いる材料として最適化されたものではなかった。

そこで私たちは、ヒツジのスクレイピー株 (Hamster adopted scrapie ハムスター263K) を用いてこのMFの粒子径に着目した工程評価材料としての適格性を検討した。MFの平均粒子径は約800nm程度あったのに対して、Sarcosyl や Lysolecithin や超音波処理によって短時間で、約200nm以下の平均粒子径にすることができた。ウイルス不活化に用いられるSD処理は用いられる Tri (n-butyl) phosphate (TNBP) と Polyoxyethylensorbitan monooleate (Tween80) を組み合わせて長時間処理しないと平均粒子径を200nm以下に出来な

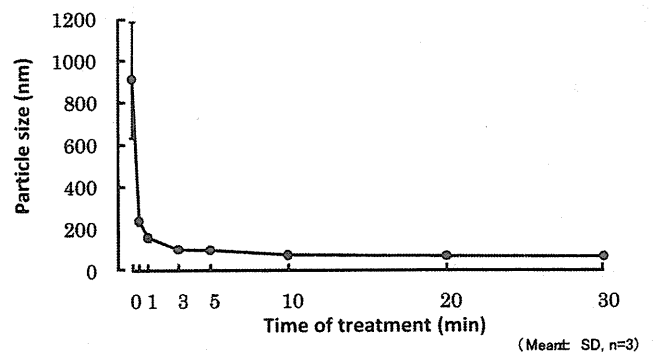


Fig. 3. 超音波処理による263K株感染ハムスター脳由来マイクロソーム画分の粒子径変化 (文献30より引用)。

った。これに対して、Polyoxyethylene-p-isooctylphenol (Triton X-100) は平均粒子径に影響を与えなかった (Fig. 2, 3)<sup>30)</sup>。また、MFをPBSに添加し220nm, 100nm, 75nm, 35nm, 19nm, 15nmのろ過膜でろ過したところ、100nmと75nmのろ過膜の結果において超音波処理の有無で除去効果 (除去指数, Log Reduction Factor, LRF) に差が生じた (Table 1)<sup>30)</sup>。このことより、工程評価に用いるプリオン材料はSarcosilやLysolecithinなどの界面活性剤処理や超音波処理を行う事が望ましいことが明らかになった。なお、超音波処理

Table 1. PBS中の263K株異常型プリオン除去（文献30より引用）.

公称膜孔径	PVDFフィルター				Planovaフィルター					
	220nm		100nm		72nm		35nm		15nm	
超音波処理	あり	なし	あり	なし	あり	なし	あり	なし	あり	なし
ろ過前	4.2/3.5	3.5/4.2	4.2/3.5	3.5/4.2	4.2/4.2	3.5/4.2	4.2/4.2	3.5/4.2	4.2/4.2	3.5/4.2
ろ過後	3.8/3.8	3.1/3.8	3.8/3.1	2.4/3.1	2.4/2.4	<1.0/<1.0	<1.0/<1.0	<1.0/<1.0	<1.0/<1.0	<1.0/<1.0
除去指数	0.4/-0.3	0.4/0.4	0.4/0.4	1.1/1.1	1.8/1.8	≥2.5/≥3.2	≥3.2/≥3.2	≥2.5/≥3.2	≥3.2/≥3.2	≥2.5/≥3.2

ウエスタンブロッティング（WB法）による評価.

数値はNon-detectable endpoint法によって求めた総Log<sub>10</sub>値で示した.

したMFは組成の変化がなく、工程サンプルに与える影響は最小限に止めることができるが、界面活性剤処理したMFは界面活性剤が残存することから工程サンプル及び評価に与える影響を考慮する必要がある.

次に、このプリオン材料が工程評価を行う上で、血液中の感染性プリオン蛋白をどこまで反映・再現させているかという問題がある。輸血でvCJDが伝播することが報告されており、血液細胞画分には膜結合蛋白であるプリオン蛋白が含まれることは予測できる。しかしながら血漿には感染性プリオン蛋白が細胞断片として含まれるのか、それとも可溶化画分として存在するのかについては不明な点が多い。私たちは血漿分画製剤の製造工程に導入されているウイルス除去膜（平均膜孔径15nm）を用いて、実際の製造条件を模倣してプリオン蛋白の除去性能を評価した。この15nmのろ過膜はバイオ医薬品分野に産業応用できる世界で最も公称膜孔径の小さなウイルス除去膜である。この膜処理により、ウエスタンブロッティング（WB）法による評価でろ液中の異常型プリオン蛋白は検出限界以下にまで除去され3.5Log以上の除去指数を示した。これに対して、動物への接種実験ではろ液中の感染性プリオン蛋白は4.0Log以上の除去指数を示したものの、一部のサンプルで感染性を認めた。更にこの15nmろ液を150,000g、1時間の超遠心操作を行い、得られた上清画分と沈殿画分について感染実験を行った。この超遠心条件はプリオン蛋白を濃縮する時に採用されている条件であるが、驚くべきことに両方の画分に感染性が認められた（Table 2）<sup>30,31</sup>。感染動物の脳ホモジネートの超遠心上清に感染性が認められることはBerardiらが報告している<sup>32</sup>が、この上清画分に残存する感染性プリオン蛋白が15nmの膜を通過することが可能であることは新しい知見である。一方、Silveiraらは約20～25nmの重合体が最も感染性が高く、10nm以下の画分には感染性は認められなかったと報告している<sup>8</sup>。15nmのウイルス除去膜はその孔径に近い粒子径を有するパルボウイルスなどを高負荷した時に一部のウイルスがろ液に認められることを経験している<sup>33</sup>が、15nm以下の大きさの感染性プリオン蛋白が膜を通過した可能性がある。一方、vCJD感染マウスの、赤血球、Buffy coat、血小板含有血漿、血漿等を正常マウスに

Table 2. 15nmろ過による異常型プリオン蛋白の除去（文献30, 31より引用）.

	Lyssolecthin及び超音波処理263K		超音波処理263K	
	WB（定量）	BA（定量）	WB（定量）	BA（定性）
ろ過前	6.1/6.1	7.97/8.30	3.6	発症
ろ過後	<2.6/<2.6	<3.25/4.30	<0.8	発症
除去係数	≥3.5/3.5	≥4.72/4.00	≥2.8	NA
超遠心沈殿	NA	NA	<1.0	発症
超遠心上清	NA	NA	<1.0	発症

WB：ウエスタンブロッティングによる評価.

数値はNon-detectable endpoint法によって求めた総Log<sub>10</sub>値で示した.

BA：動物接種試験による定量又は定性評価.

定量評価は階段希釈サンプルを用い一群6匹の結果からKarbar法により、総ID50（Log<sub>10</sub>）値で示した.

脳内又は静注にて接種したところ、赤血球画分には感染性が認められなかったものの、それ以外のサンプルすべてに感染性が認められた<sup>34</sup>。これらの結果はあくまで実験的に得られた現象であり、ヒト血漿中の存在様式を証明したものではないが、感染性プリオン蛋白はこれまでに知られている膜結合型としての存在様式に加えて、血漿中に可溶化又は非常に微細な画分（私たちは、Soluble like formとした）としても存在し得ることを示唆することとなった。

赤血球を原料とするHbを考える場合、混入してくるプリオン蛋白の形態として、膜由来（結合）とSoluble like formのプリオン蛋白の2つの存在様式が考えられる。血漿も同様に細胞断片及びSoluble like formの存在様式が理論的に考えられる。現在評価試験に用いているプリオン材料はその両方を含んでいることが実験結果から示されているので、評価結果は両方の存在様式を反映したものと思われる。しかしながら、Soluble like formの感染性プリオン蛋白の実態や血漿中の感染性プリオン蛋白の存在様式に関する知見はほとんどないので、Soluble like formの意味についての更なる研究が求められる。

## 9. 工程評価を行う上でのプリオン株の問題

現在工程評価にはvCJDのモデルとして、263K株などが主に使用されている。これは263K株が長期にわたりプリオン研究に用いられてきており、評価手法が確立していたことや、BSEやvCJDの動物馴化株がなかったことによる。しかしながら、263K株を評価に用いる場合は、BSE株、vCJD株の持つ蛋白分解酵素（PK）への抵抗性等の性状が異なる可能性があることを考慮する必要がある。また、再利用するデバイスや設備などのプリオン清浄化（不活化）に関しても、プリオン蛋白の持つ性状から慎重にその条件を設定する必要がある<sup>35)</sup>。これらのことから、vCJDやBSEのモデルとして263K株を用いることによる影響を工程条件設定時や評価時には必ず意識しておくべきである。

米国赤十字のAkimovらは、vCJDのマウス馴化株及び細胞培養法を樹立した<sup>36)</sup>。私たちはこの株と関連技術を導入し、vCJDを直接用いた評価試験技術確立とvCJDのモデルとしての263K株の妥当性に関する検討を進めている。vCJD感染マウス脳由来の超音波処理プリオン材料を用いて15nmろ過膜による異常型プリオン蛋白の除去特性をWB法で評価したところ、2.8Logの除去指数を示したものの、ろ液中に異常型プリオン蛋白を認められた（Table 3）<sup>37)</sup>。この結果から、同じ方法で調製したプリオン材料を用いたろ過実験では、263K株も、vCJD株も同様のろ過（除去）特性を示すことが明らかになった。しかしながら263K株はこれまでWBレベルで15nmろ過後液には検出された事がなかったのに対して、vCJD株は検出された。この結果は検出感度によるものなのか、263K株とvCJD株由来の異常型プリオン蛋白の物性の違いによるものなのか、現時点で判断することはできない。感染性を含めた詳細を更に検討する必要がある。

Table 3. 15nmろ過膜によるvCJD及び263K由来・超音波処理マイクロソーム画分中の異常型プリオン蛋白の除去。

	vCJD	263K
ろ過前	3.1	4.2
ろ過後	0.3	<1.0
除去指数	2.8	≥3.2

ウエスタンブロットティング（WB法）による検出。  
数値はNon-detectable endpoint法によって求めた総Log<sub>10</sub>値で示した。

## 10. リスク評価を行う上での留意点

工程評価を行う上でのプリオン材料の留意点は上述の通りであるが、製剤のリスク評価を行うにあたっては他にも留意すべき点がある。まず、製剤のリスク評価はいくつかの施策の組合せによって完成するという点が挙げられる。人工酸素運搬体のリスク評価を行う場合、原料に対する評価と工程に対する評価が基本となる。そしてその製剤を投与される患者に対するリスク・ベネフィットに基づき有用性の判断を行うことになる。

原料に対する評価は、1ロットの製剤を製造するための原料

（赤血球）に異常型プリオン蛋白が混入する量を疫学的に推定することによって行う。現在、日本では輸血によるvCJDの発生確率は1人と考えられている<sup>23)</sup>。現在、ヒト血液中のvCJDの感染価を定量的に推測することができないが、英国ではvCJDに汚染していると思われる輸血例66例中4例が感染している<sup>38)</sup>。vCJD感染マウスのBuffy coat、赤血球及び血漿を静注ルートによりマウスに感染させたところ、Buffy coatと血漿は感染性を示し、赤血球画分は感染性を示さなかった<sup>39)</sup>。これらの知見に基づけば、日本の献血由来のvCJD陽性原料を製造に用いる可能性はほとんどないと解釈されるが、原料画分には感染性が認められることから、任意のロットに混入する推定最大量は1単位（ドナー）となる。よって、工程の評価はこれを基準として考えることになる。

具体的な対策として、次の対策が考えられる。まず、採血時に白血球除去膜処理を導入し、原料段階でのリスク低減策を講じる。白血球除去膜は白血球除去によるリスク低減に加え、プリオン蛋白そのものの除去が期待できる。しかしながら白血球除去膜によるプリオン蛋白除去については一部の製品を除き評価は定まっていない<sup>11,12,25)</sup>。次に製造工程におけるリスク低減を行う。工程にはプリオン除去の堅牢性を確保するために、除去能力を示す複数の工程を導入する。この能力についてはガイドラインに従って評価する必要がある。ウイルスを対象とした評価においては数値目標が設定されているが、プリオンを対象とした評価では現時点で数値目標は設定されていない<sup>39,40,41)</sup>。このことから、プリオンを対象とした評価において、目標とする数値の妥当性や必要とする安全係数についての更なる議論が必要であり、得られた数値（RLF）だけで安全性を判断するのは時期尚早である。むしろ、製造工程中にプリオン除去の機作が異なる工程を複数導入することによってセーフティーネットを構成する方が効果的であり、工程の堅牢性も高くなると考えられる。

血漿分画製剤やHb精製工程に導入可能と思われるデバイスは、採血時の白血球除去フィルターの他に、ウイルス除去フィルター、デプスフィルター、荷電された除菌・清澄ろ過フィルター等があり、蛋白質の精製工程としては、エタノール分画、硫酸分画、ポリエチレングリコール分画、クロマトグラフィー等が考えられ、複数の工程対応は可能と考えられる。なお、目標とする除去係数やその妥当性を評価するために血液中の感染性プリオン蛋白の性状や感染価についての更なる研究が望まれる。

工程での除去能力はプリオンに対する安全性確保の根幹となるので慎重な試験デザインと解釈が求められる。基本的な手法はガイドライン<sup>11,39,40,42)</sup>に記述されているが、ガイドラインは策定時のMinimum requirementであって、指針のひとつにすぎない。よって、実際にはその製剤と製造工程の特性を良く理解した上でデザインしなければならない。工程のプリオン除去評価を行うにあたって、WBレベルで検出限界以下になったプリオン除去に関する重要工程については、動物への接種実験で感染性の有無を確認することが望ましい<sup>43)</sup>。また、プリオン蛋白の実態が良く分かっていない以上、不十分な知識や誤解に基



づくデザインによる評価試験の結果解釈は誤った判断を導く可能性を秘めていることを明確に理解しておかなければならない。製剤の有効性と安全性は承認審査の時に評価されるが、有用性は科学技術の進歩により得られたプリオンに関する新しい知見に基づき、その時々には評価・確保されなければならないことも理解しておくべきである。

## 謝辞

本研究の一部は大阪大学微生物病研究所、酪農学園大学獣医学部、米国赤十字、ベネシスの共同研究として実施された。また、本研究の一部は厚生労働科学研究（H22－医薬－一般－006）として実施された。本稿を執筆するにあたって、(株)ベネシス岡島文子氏、池田美朗氏の貢献に深謝します。これらの共同研究の成果が血液製剤領域のみならずバイオ医薬品領域の安全性向上に役立つことを願います。

## 引用文献

1. World Organization for Animal Health. Number of reported cases of bovine spongiform encephalopathy (BSE) in farmed cattle worldwide. [http://www.oie.int/eng/info/en\\_esbmonde.htm](http://www.oie.int/eng/info/en_esbmonde.htm) (2010.12.22 downloaded)
2. 食品安全委員会. 「牛海綿状脳症 (BSE) と変異型クロイツフェルト・ヤコブ病 (vCJD)」について. [http://www.fsc.go.jp/sonota/faq\\_bse-tori.html](http://www.fsc.go.jp/sonota/faq_bse-tori.html) (2010.12.22 downloaded)
3. 農林水産省. BSE 患畜発生状況. [http://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/bse/b\\_kantiku/index.html](http://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/bse/b_kantiku/index.html) (2010.12.22 downloaded)
4. The European Creutzfeldt Jakob Disease Surveillance Network. vCJD cases Worldwide. <http://www.eurocjd.ed.ac.uk/> (2010.12.22 downloaded)
5. Eurosurveillance editorial team. First case of vCJD reported in a Japanese patient. *Eurosurveillance*. 10 February 2005; 10(6). <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=2640> (2011.1.9 downloaded)
6. Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*. 1982; 216: 136-44.
7. Robakis NK, Devine-Gage EA, Jenkins EC, Kascsak RJ, Brown WT, Krawczun MS, Silverman WP. Localization of a human gene homologous to the PrP gene on the p ARM of chromosome 20 and detection of PrP-related antigens in normal human brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 140: 758-765.
8. Silveira JR, Raymond GR, Hughson AG, Race RE, SimVL, Hayes SF, Caughey B. The most infectious prion protein particles. *Nature* 2005; 437: 257-261.
9. 厚生省薬務局審査課・薬務局医療機器開発課. ウシ由来物を用いた医薬品等に関する調査依頼について. 薬審第165号平成8年3月27日.
10. 厚生省医薬安全課長. ウシ等由来物を原料として製造される

医薬品等の品質及び安全性確保について. 医薬発第1226号平成12年12月12日.

11. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), European Medical Agency. CHMP position statement on Creutzfeldt-Jakob disease and plasma-derived and urine-derived medicinal products. Draft EMEA/CPMP/BWP/2879/02/rev 2. 24 June 2010.
12. European Medical Agency. Concept Paper on the Need To Update the CHMP Position Statement on CJD and Plasma-Derived and Urine-Derived Medicinal Products. EMEA/CHMP/BWP/253246/2009. 23 July 2009. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/09/WC500003742.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003742.pdf) (2011.1.8 downloaded)
13. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) and Committee for Advanced Therapies (CAT), European Medicines Agency. CHMP/CAT position statement on Creutzfeldt-Jakob disease and advanced therapy medicinal products. Draft, EMEA/CHMP/CAT/BWP/353632/2010. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2010/07/WC500095069.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/07/WC500095069.pdf) (2010.12.24 downloaded)
14. 厚生労働省医薬局長. ウシ等由来物及び人由来物を原料として製造される医薬品, 医療器具等の品質及び安全性確保の強化について. 医薬発第0414005号平成15年4月14日
15. National Blood Service Scottish National Blood Transfusion Service Welsh Blood Service and Northern Ireland Blood Transfusion Service National CJD Surveillance Unit. TRANSFUSION MEDICINE EPIDEMIOLOGY REVIEW (TMER). <http://www.cjd.ed.ac.uk/TMER/TMER.htm> (2010.12.25 downloaded)
16. World Health Organization. Tables on Tissue Infectivity Distribution in Transmissible Spongiform Encephalopathies Updated 2010, WHO/EMP/QSM/2010.1. <http://www.who.int/bloodproducts/tablestissueinfectivity.pdf> (2010.12.25 downloaded)
17. Peden A, McCardle L, Head MW, Love S, Ward HJ, Cousens SN, Keeling DM, Millar CM, Hill FG, Ironside JW. Variant CJD infection in the spleen of a neurologically asymptomatic UK adult patient with haemophilia. *Haemophilia* 2010; 16: 296-304.
18. vCJD abnormal prion protein found in a patient with haemophilia at post mortem. Health Protection Agency. Press release, 17 February 2009. <http://www.hpa.org.uk/NewsCentre/NationalPressReleases/2009PressReleases/090217vCJDABNORMALPRIONPROTEINFOUNDINAPATIENTWITH/> (2010.12.24 downloaded)
19. 21st Meeting of the Transmissible spongiform Encephalopathies Advisory Committee. June 12, 2009.

<http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/Calendar/UCM164322.pdf>

20. A 2010 Update of the Draft Quantitative Risk Assessment of vCJD Risk Potentially Associated with the Use of Human Plasma-Derived Factor VIII Manufactured Under United States (US) License From Plasma Collected in the US. October 6, 2010. Center for Biologics Evaluation and Research US Food and Drug Administration. <http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/BloodVaccinesandOtherBiologics/TransmissibleSpongiformEncephalopathiesAdvisoryCommittee/UCM231018.pdf> (2010.12.24 downloaded)
21. ヒト・プリオン病－感染症としての変遷と新たな課題. 萩原健一, 山河 芳夫, 花田 賢太郎. ウイルス. 2009; 59: 155-166
22. 薬事・食品衛生審議会 平成21年度 第3回 血液事業部会運営委員会資料「変異型Creutzfeldt-Jakob病 (vCJD) の国内外の発生状況」. 山田正仁. <http://www.mhlw.go.jp/shingi/2009/12/dl/s1210-8n.pdf> (2010.12.25 downloaded)
23. 薬事・食品衛生審議会 平成21年度 第3回 血液事業部会運営委員会資料「英国渡航に由来するvCJD感染リスクの評価と献血制限のあり方について」. 梯 正之. <http://www.mhlw.go.jp/shingi/2009/12/dl/s1210-8o.pdf> (downloaded 2010.12.25)
24. Tattum MH, Jones S, Pal S, Khalili-Shirazi A, Collinge J, Jackson GS. A highly sensitive immunoassay for the detection of prion-infected material in whole human blood without the use of proteinase K. *Transfusion*. 2010; 50: 2619-2627.
25. FDA. Informational Issue Summary, FDA's Currently-Recommended Policies to Reduce the Possible Risk of Transmission of Creutzfeldt-Jakob Disease (CJD) and Variant Creutzfeldt-Jakob Disease (vCJD) by Blood and Blood Products Transmissible Spongiform Encephalopathies Advisory Committee 22nd Meeting October 28-29, 2010. <http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/BloodVaccinesandOtherBiologics/TransmissibleSpongiformEncephalopathiesAdvisoryCommittee/UCM231179.pdf> (2010.12.25 downloaded)
26. 日本赤十字社ホームページ. <http://www.jrc.or.jp/donation/refrain/detail/detail09.html> (2010.12.25 downloaded)
27. Yunoki M, Urayama T, Ikuta K. Possible removal of prion agents from blood products during the manufacturing process. *Future Virol* 2006; 1: 659-674.
28. 人工赤血球. *New Current*. 2006.9.1; 17: 2-10.
29. 武岡真司. 分子集合科学を利用した人工血液の創世. *人工血液* 2005; 13: 136-147.
30. Yunoki M, Tanaka H, Urayama T, Hattori S, Ohtani M, Narita Y, Kawabata Y, Miyatake Y, Nanjo A, Iwao E, Morita M, Wilson E, MacLean C and Ikuta K. Prion removal by nanofiltration under different experimental conditions. *Biologicals* 2008; 36: 27-36.
31. Yunoki M, Tanaka H, Urayama T, Kanai Y, Nishida A, Yoshikawa M, Ohkubo Y, Kawabata Y, Hagiwara K, Ikuta K. Infectious prion protein in the filtrate even after 15nm filtration. *Biologicals*. 2010; 38: 311-313.
32. Berardi VA, Cardone F, Valanzano A, Lu M, Pocchiari M. Preparation of soluble infectious samples from scrapie-infected brain: a new tool to study the clearance of transmissible spongiform encephalopathy agents during plasma fractionation. *Transfusion*. 2006; 46: 652-8.
33. 柚木幹弘, 浦山健, 西田真直, 辻川宗男, 堀井肇, 西槇秀雄, 上村八尋, 鍵谷昌男, 佐藤進一郎, 加藤俊明, 関口定美. Antithrombin-III製剤の製造工程のウイルスバリデーション試験. *医薬品研究*. 1999; 30: 331-341.
34. Cervenakova L, Yakovleva O, McKenzie C, et al: Similar levels of infectivity in the blood of mice infected with humanderived vCJD and GSS strains of transmissible spongiform encephalopathy. *Transfusion* 2003; 43: 1687-1694.
35. Lee D\*, Lebing W, Stenland C, Petteway S. Methods of inactivation of transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) as applied to production chromatography processes. *DownStream* 27: 18-22. [http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/B1A81AC9A032FB48C1257628001CD8A9/\\$file/18113084.pdf](http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/B1A81AC9A032FB48C1257628001CD8A9/$file/18113084.pdf) (2011.1.9 downloaded)
36. Akimov S, Yakovleva O, Vasilyeva I, McKenzie C, Cervenakova L. Persistent propagation of variant Creutzfeldt-Jakob disease agent in murine spleen stromal cell culture with features of mesenchymal stem cells. *J Virol*. 2008; 82: 10959-19562. Epub 2008 Aug 20.
37. 久保 純, 大久保祐士, 中川 典子, 佐々木祐子, 柚木 幹弘, Larisa Cervenakova, 萩原 克郎, 生田 和良. vCJDを用いた血漿分画製剤の工程評価. 第58回日本ウイルス学会学術集会 (2010徳島)
38. Shimian Z, Chyang TF, Lawrence B, Schonberger. *Transfusion transmission of human prion diseases. Transfusion Med Rev* 2008; 20: 58-69
39. The European agency for the evaluation of medicinal products/committee for proprietary medical products (CPMP) biotechnology working party: Note for guidance on virus validation studies: the design, contribution and interpretation of studies validating the inactivation and removal of viruses. CPMP/BWP /268/95. 14 Feb. 1996.
40. 厚生省医薬安全局長. 血漿分画製剤のウイルスに対する安全性確保に関するガイドラインについて. 医薬発第1047号 1999.8.30

41. 厚生労働省医薬食品局長. 「血液製剤等に係る遡及調査ガイドライン」の一部改正について. 薬食発第1226008号, 薬食発第1226009号, 薬食発第1226010号, 薬食発第1226011号. 平成20年12月26日

42. 厚生省医薬安全局審査管理課長. 「ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウイルス安全性評価」について. 医薬審第329号 平成12年2月22日

# Fundamentals of prions and their inactivation (Review)

AKIKAZU SAKUDO<sup>1</sup>, YASUHISA ANO<sup>2</sup>, TAKASHI ONODERA<sup>3</sup>, KAYAKO NITTA<sup>4</sup>,  
HIDEHARU SHINTANI<sup>5</sup>, KAZUYOSHI IKUTA<sup>6</sup> and YASUHARU TANAKA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Biometabolic Chemistry, School of Health Sciences, Faculty of Medicine, University of the Ryukyus, 207 Uehara, Nishihara, Okinawa 903-0215; <sup>2</sup>Central Laboratories for Frontier Technology, Kirin Holdings Co., Ltd., 1-13-5 Fukuura Kanazawa-ku, Yokohama-shi, Kanagawa 236-0004; <sup>3</sup>Department of Molecular Immunology, School of Agricultural and Life Sciences, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657; <sup>4</sup>Urasoe General Hospital, 4-16-1 Iso, Urasoe, Okinawa 901-2132; <sup>5</sup>Faculty of Science and Engineering, Chuo University, 1-13-27 Kasuga, Bunkyo-ku, Tokyo 112-8551; <sup>6</sup>Department of Virology, Center for Infectious Disease Control, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

Received September 14, 2010; Accepted December 17, 2010

DOI: 10.3892/ijmm.2011.605

**Abstract.** Prion is an infectious particle composed of an abnormal isoform of the prion protein (PrP<sup>Sc</sup>) and causes prion diseases such as bovine spongiform encephalopathy (BSE), Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) and scrapie. Host cells express cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>), which plays roles in normal functions such as anti-oxidative stress. PrP<sup>Sc</sup> is derived from PrP<sup>C</sup> and produced by conformational conversion. Prion is notorious as a resistant pathogen, being difficult to inactivate with conventional sterilization procedures. Therefore, to prevent prion-caused iatrogenic diseases, the use of appropriate procedures to inactivate prions is important. For examples, alcohol treatment, autoclave (121°C, 20 min) and  $\gamma$ -ray irradiation, which are used for disinfection, antisepsis or sterilization of viruses and bacteria, are not effective against prion. This is a fundamental review of prions and methods of their inactivation.

## Contents

1. Pathogens and prions
2. Methods for detecting prions
3. Iatrogenic prion disease and prion inactivation
4. Conclusions and perspectives

## 1. Pathogens and prions

Pathogens can be transmitted through food, air, drinking water, body fluids and attachment (1). There are many types,

including protozoa, helminths, prions, viruses, fungi, algae, mycobacteria, bacteria, viroids and bacteriophages (Fig. 1), but relatively few are directly connected to diseases. In most cases of pathogen-related diseases, the causes are not fully taken into account or sporadic, and not reported to any official agency because they are not severe or cultures are never obtained (2,3). Some pathogens change their forms under some circumstances. Certain bacteria and fungi form spores under low-nutrient or dry conditions. Protozoa form oocysts and cysts dependent on their life cycle, while helminths form eggs. After an infection, viruses inject their genome into host cells. After producing viral proteins using the host cell's machinery, the virus matures. Among viruses, there are many types such as i) bacteriophages, which infect bacteria, ii) viroids, which are only RNA, devoid of proteins and infect higher plants causing crop diseases and iii) animal viruses. Animal viruses are divided into two groups; non-enveloped and enveloped (1). Besides viruses, prions (proteinaceous infectious particles) (4) have been studied in the field of virology, because they cause prion diseases, which have been classified as slow viral diseases. Prion is important, because it is the most difficult pathogen to inactivate and transmissible by eating, transfusion, and neurosurgery.

Prion diseases are neurodegenerative disorders caused by protein-based infectious particles (prions). Main component of prion is an abnormal isoform of the prion protein (PrP<sup>Sc</sup>) (5). Recently, the emergence of bovine spongiform encephalopathy (BSE) and its variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD) has been highlighted. The issue has enhanced concern over food safety, safe transfusions, and safe neurosurgery. However, with the recent emergence of avian and swine influenza viruses (6), interest in BSE and vCJD has waned and information on prion diseases is still limited, especially notable in the areas of therapy and pre-mortem diagnosis.

The history of prion research is relatively long, with Cullie and Chelle reporting scrapie to be an infectious disease in 1936 (7). Although scrapie had been thought to be caused by a virus and classified as a slow viral disease, Prusiner proposed a new type of pathogen composed only of

---

*Correspondence to:* Dr Akikazu Sakudo, Laboratory of Biometabolic Chemistry, School of Health Sciences, Faculty of Medicine, University of the Ryukyus, 207 Uehara, Nishihara, Okinawa 903-0215, Japan  
E-mail: sakudo@med.u-ryukyu.ac.jp

*Key words:* prion protein, sterilization, gas plasma

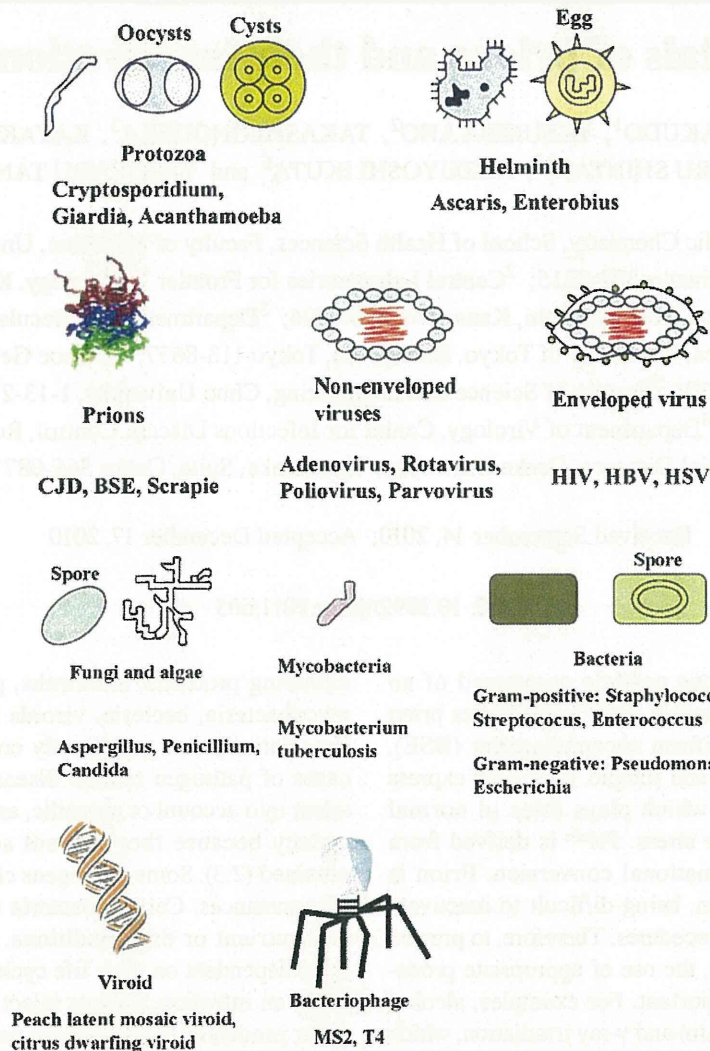


Figure 1. Features of pathogens. There are various types of pathogens including protozoa, helminths, prions, viruses, fungi, algae, mycobacteria, bacteria, bacteriophages and viroids. Some pathogens change form dependent on circumstances. Some bacteria form spores under low-nutrient conditions. Fungi makes spores under dry conditions. Styles of protozoa change to oocysts and cysts with growth depending on the life cycle, while those of helminths also form eggs. Methods of detecting pathogens are closely related to the composition of pathogens. Nucleic acid-based methods are commonly used, because the genomes of all pathogens except prions are composed of nucleic acid (DNA or RNA). As prion is thought to only be composed of proteins, nucleic acid-based methods are not applicable. HIV, human immunodeficiency virus; HBV hepatitis B virus; HSV, herpes simplex virus; CJD, Creutzfeldt-Jakob disease; BSE, bovine spongiform encephalopathy. Modified from Fig. 2 in Sakudo *et al* (49) with permission from NOVA Science Publishers.

protein (4). Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) and Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease (GSS) has been known for some time, with case reports by Creutzfeldt in 1920 (8), Jakob in 1921 (9), and Gerstmann *et al* in 1936 (10). The basic feature of prion disease as a transmissible spongiform encephalopathy became clear from findings for Kuru disease, which occurs in the Fore linguistic group in the Eastern Highlands of Papua New Guinea, who have a custom of eating human brain as part of mortuary rites (11). Transmission was validated by the finding that brain homogenate containing the Kuru agent caused similar symptoms to Kuru in monkeys following an intracerebral injection (11). Meanwhile, the causes of human prion diseases vary, i.e.: infection for Kuru and iatrogenic CJD (iCJD), mutation of the prion protein (PrP) gene for GSS, fatal familial insomnia (FFI) and familial CJD (fCJD), and unknown cause for sporadic CJD (sCJD) (5) (Table I). Generally, the prion diseases caused by mutation of the PrP

Table I. Human prion diseases.

Disease	Cause
Kuru	Infection
iCJD	Infection
sCJD	Unknown
fCJD	Mutation of PrP gene
vCJD	Infection
GSS	Mutation of PrP gene
FFI	Mutation of PrP gene

CJD, Creutzfeldt-Jakob disease; iCJD, iatrogenic CJD; sCJD, sporadic CJD; fCJD, familial CJD; vCJD, variant CJD; GSS, Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrome; FFI, fatal familial insomnia; PrP, prion protein.

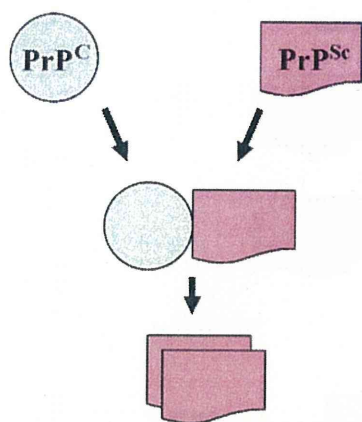


Figure 2. Conformational change of the cellular isoform of prion protein (PrP<sup>C</sup>) to an abnormal isoform of prion protein (PrP<sup>Sc</sup>). After infection, PrP<sup>C</sup> is converted into PrP<sup>Sc</sup>. PrP<sup>Sc</sup> aggregates, inducing the deposition of prion protein (PrP) in the brain. The accumulation causes the death of neurons. In addition, loss of PrP<sup>C</sup> may contribute to the pathogenesis, because PrP<sup>C</sup> plays a role in anti-oxidative stress, calcium homeostasis, circadian rhythms, spatial learning, and memory.

Table II. Characteristics of PrP<sup>C</sup> and PrP<sup>Sc</sup>.

	PrP <sup>C</sup>	PrP <sup>Sc</sup>
Resistance to protease	Low	High
Distribution in cell	Cell surface	Intracell
GPI anchor	Present	Present
Release from cell surface by PIPLC	Positive	Negative
Half life	3-6 h	>24 h
Solubility	High	Low
Conformation	42% $\alpha$ -helix, 3% $\beta$ -sheet	30% $\alpha$ -helix, 43% $\beta$ -sheet
Infectivity	Negative	Positive

PrP<sup>C</sup>, cellular isoform of prion protein; PrP<sup>Sc</sup>, abnormal isoform of prion protein; GPI, glycosylphosphatidyl inositol; PIPLC, phosphatidyl-inositol specific phospholipase C.

gene are relatively less infectious. These diseases have different symptoms, because the areas of the brain affected differ: for example, the cerebral cortex in CJD, the cerebellum in GSS and thalamus in FFI. Such damage is caused by neuronal cell loss, astrocytosis, and vacuolation, leading to degeneration (5). Another prion disease, vCJD, is important in connection to BSE, which affected as many as 180,000 cattle from 1985 to 1995 in the United Kingdom (UK) (12). The total number of cattle with BSE in the UK is about 184,500, whereas the total number in other countries is about 5,800 (13). Therefore, >95% of BSE cases have occurred in the UK. The problem is that BSE prion is a causative agent of vCJD (14,15). Meanwhile, the cause of most prion diseases (85-90%) remains unclear. Such prion diseases are known as sporadic CJD (sCJD).

## 2. Methods for detecting prions

After an infection, cellular PrP (PrP<sup>C</sup>), which is expressed in host cells, especially neurons, and has possible functions including the regulation of anti-oxidative stress, calcium and copper homeostasis, circadian rhythms, spatial learning, memory, signalling, and synapse formation (16,17), changes into PrP<sup>Sc</sup> (Fig. 2). PrP<sup>Sc</sup> accumulates in the brain and forms PrP deposits, which are protease-resistant (Table II). The accumulation causes neuronal cell loss, astrocytosis, and vacuolation, leading to spongiform and eventually death (18). Prion diseases, unlike other amyloid diseases, are transmissible. Generally, transmission is more difficult between different species than between identical species, a phenomenon known as the 'species barrier' (19). However, BSE can be transmitted to humans, resulting in vCJD (14), whereas epidemiological data suggest that scrapie cannot directly infect humans. Therefore, the study of BSE is important in terms of food hygiene (20). In Japan, all cows over 21 months old are checked for BSE (21). The method is as follows (Fig. 3): a homogenate is prepared from the brain obex and treated with proteinase K (PK). The treated sample is applied to a microtiter plate for

absorption then detected with anti-PrP antibody. If the result is positive, the above-mentioned enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is performed repeatedly. If a positive result is obtained again, Western blotting and immunohistochemistry (IHC) are performed (Fig. 4). The Western blotting uses a membrane to absorb PK-treated proteins separated by sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). After the absorption, PK-resistant PrP (PrP<sup>res</sup>) in the membrane-bound proteins is detected with anti-PrP antibody. Importantly, Western blotting provides information on not only prion infections but also the mobility of peptides, which is influenced by the host genotype and prion strains (22,23). As shown in Fig. 4B, the IHC is based on representative pathological features of prion diseases including neuronal cell loss, vacuolation, astrocytosis and amyloid plaques. In the IHC analysis of brain sections, the accumulation of PrP amyloid plaques, neuronal cell loss (or vacuolation) and astrocytosis are examined by light microscopy. Although vacuolation is also used as an index of prion infection, various combinations of prion strains with host species result in the accumulation of PrP without vacuolation in brain sections (24,25). Recently, the protein misfolding cyclic amplification (PMCA) method has been developed (26), which enables *in vitro* amplification of PrP<sup>res</sup> from a small quantity of PrP<sup>Sc</sup> as seed by sequential cycles of incubation and sonication. Interestingly, levels of PrP<sup>res</sup> amplified by this method correlated with the prion infectivity titer (27). Furthermore, PMCA could detect prions in blood (28). In addition, it could be used to diagnose not only terminally diseased hamsters but also prion-infected pre-symptomatic hamsters (29). This method has the highest sensitivity of any method for detecting PrP<sup>res</sup> reported so far. To date, its application to sheep (28), goat (30), cattle (30), sCJD (30), vCJD (31), CWD (32) and hamster scrapie (26) and mouse scrapie (33) has been reported. Recently, PMCA has been modified, leading to recombinant PrP-PMCA (rPrP-PMCA) (34) and its combination with the quaking-induced conversion (QUIC) reaction (34,35). In addition, information obtained from PMCA will contribute to understanding the

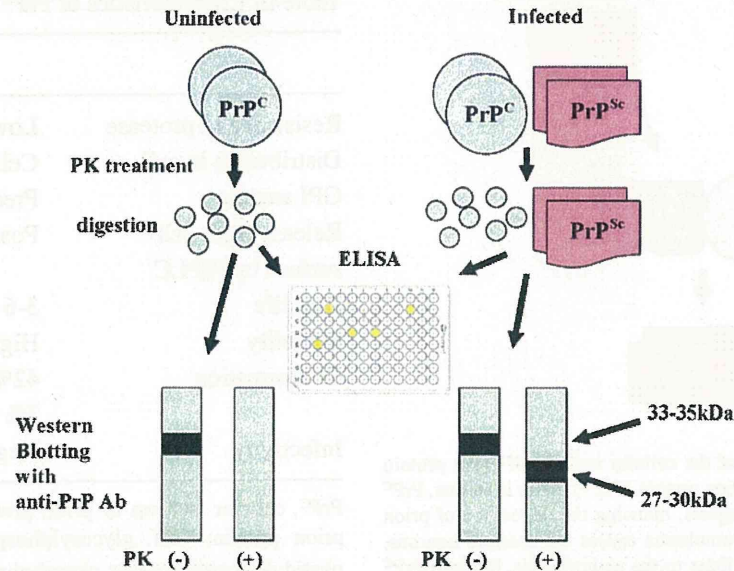


Figure 3. Diagnostic methods for prion infections. For the diagnosis of prion diseases, brain tissue is used. Therefore, the diagnosis is post-mortem. Most methods of diagnosing prion diseases are based on the characteristics of PrP<sup>Sc</sup>, which is resistant to proteinase K (PK). PK completely degrades PrP<sup>C</sup> but only partially digests PrP<sup>Sc</sup>, because PrP<sup>Sc</sup> makes aggregates and those cores remain. After the treatment, Western blotting and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with anti-PrP antibody detect PK-resistant PrP, when PrP<sup>Sc</sup> is included in the sample. As the N-terminal region of PrP<sup>Sc</sup> is digested with PK(+), PK-resistant PrP (27-30 kDa) shows a shift to a lower molecular weight compared to untreated PrP(-) (33-35 kDa) in Western blotting.

mechanism of conformational change of PrP. So far, several factors such as RNA and metals have been found to be involved in the conformational change using PMCA (36,37). Furthermore, *in vivo* analyses of the use of such factors may provide clues to the treatment of prion diseases.

### 3. Iatrogenic prion disease and prion inactivation

Although 4 cases of iCJD caused by neurosurgery have been reported, all are from the 1980s or earlier. Therefore, a causal relationship remains to be determined (38). However, difficulty in the inactivation of prions requires appropriate treatment of the surgical instruments used for craniotomy, spinal surgery, ophthalmologic surgery, etc. The most important difference between prion and other pathogens is that prion has no nucleic acid (5). Therefore, it cannot be inactivated by conventional sterilization procedures such as autoclaving (121°C, 20 min), exposure to UV and  $\gamma$ -ray irradiation (5). Although alcohol treatments such as 70% ethanol are effective for bacteria and enveloped viruses, they have no effect on prions. To inactivate prions, use of an autoclave under severe condition (134°C, 18 min), NaOH (1 N, 20°C, 1 h), SDS (30%, 100°C, 10 min), and NaOCl (20000 ppm, 20°C, 1 min) is recommended (Table III). As a practical method for prion inactivation, the following procedures are recommended (38). i) Washing with appropriate detergents + SDS treatment (3%, 3-5 min), ii) treatment with alkaline detergents (80-93°C, 3-10 min) + autoclaving (134°C, 8-10 min), iii) washing with appropriate detergents + autoclaving (134°C, 18 min) and iv) washing with alkaline detergents (at a concentration and temperature according to instructions) + vaporized hydrogen peroxide gas plasma sterilization. The most important point is that a dried prion-infected apparatus is difficult to be sterilized. Therefore, after use of the apparatus, prompt washing is essential (38).

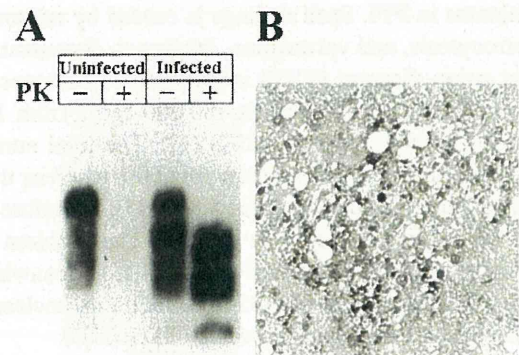


Figure 4. Western blotting and immunohistochemistry (IHC). (A) PrP from brain membranous fractions of uninfected mice (uninfected) and terminally diseased mice intracerebrally inoculated with Obihiro-1 prions (infected) was detected by Western blotting with anti-PrP antibody, 6H4 and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse IgG. Each fraction was treated (+) or not (-) with PK. Modified from Fig. 1 in Inoue *et al.* (50) with permission from the National Institute of Infectious Diseases. (B) Immunohistochemistry of the brains of terminally prion-diseased mice infected with Obihiro-1 prions. PrP was detected by an anti-PrP antibody, 6H4. Vacuolation and PrP deposits were seen. Courtesy of Dr Yuji Inoue (Department of Virology, Center for Infectious Disease Control, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Japan).

Then, autoclaving at 134°C and vaporized hydrogen peroxide gas plasma sterilization, etc. should be performed for prion inactivation.

Finally, we focus on gas plasma sterilization. Although not as well known as major sterilization procedures like autoclaving, there are various reports on prion inactivation using this method (39). Gas plasma is the fourth state of matter after solid, liquid and gas (40). Gas plasma is generated by removing electrons and producing a highly excited mixture of charged

Table III. Effective treatment on inactivation of prion.

Treatment	Refs.
NaOCl (20000 ppm, 20°C, 1 h)	(39)
NaOH (1 N, 20°C, 1 h)	(39)
Autoclave under soaked condition in water (134°C, 18 min)	(39)
Alkaline detergent (1.6%, 43°C, 15 min)	(39)
Phenolic disinfectant (5%, 20°C, 30 min)	(39)
3% SDS, 100°C, 10 min	(51)
7 M guanidine hydrochloride (room temperature, 2 h)	(51)
3 M guanidine thiocyanate (room temperature, 2 h)	(51)
3 M trichloroacetic acid (room temperature, 2 h)	(51)
60% formic acid (room temperature, 2 h)	(51)
50% phenol (room temperature, 2 h)	(51)
Enzymatic detergent (0.8%, 43°C, 5 min) + hydrogen peroxide gas plasma sterilization (1.5 mg/l, 25°C, 3 h)	(39)
Vaporized hydrogen peroxide (2 mg/l, 30°C, 3 cycles)	(39)

\*Autoclaving with no soaking in water is insufficient for prion inactivation (dry conditions cause difficulty in inactivation) (39,52). \*Enzymatic detergent (0.8%, 43°C, 5 min) + autoclave (121°C, 20 min), only enzymatic detergent (0.8%, 43°C, 5 min), only peroxyacetic acid (0.25%, 55°C, 12 min), only vaporized hydrogen peroxide gas (1.5 mg/l, 25°C, 3 h), or enzymatic detergent (0.8%, 43°C, 5 min) + vaporized hydrogen peroxide gas (1.5 mg/l, 25°C, 3 h) are insufficient for prion inactivation. SDS, sodium dodecyl sulfate.

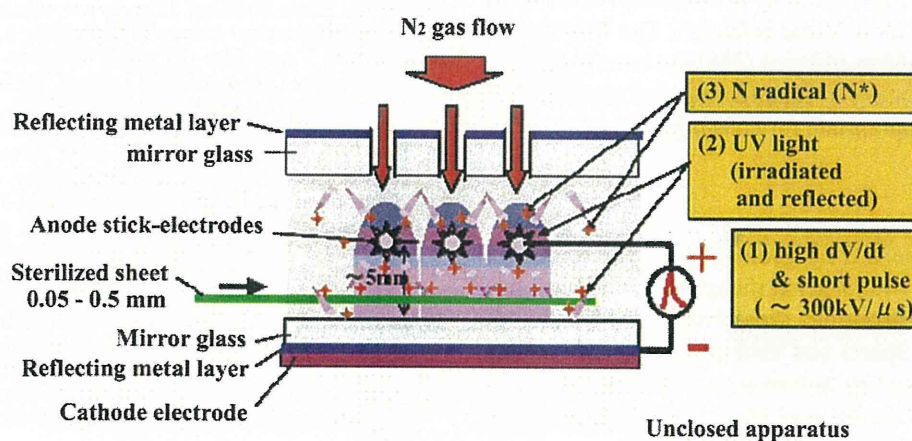


Figure 5. Constitution of  $N_2$  gas plasma sterilization apparatus. Atmosphere in the apparatus with an  $N_2$  gas flow. Under the conditions, high  $dV/dt$  and short pulses were applied, resulting in the generation of gas plasma. The possible sterilization mechanisms are as follows. (1) high  $dV/dt$  and short pulses, (2) UV exposure, (3) N radical. Cited from Fig. 1(a) in Shintani *et al.*, (40) with permission from Society for Antibacterial and Antifungal Agents, Japan. UV, ultraviolet.

nuclei and free electrons in a chamber containing active gasses like vaporized hydrogen peroxide or inactive gasses like nitrogen (40). The process is achieved by the supply of sufficient energy, in the form of heat or an electromagnetic field, to gas. Currently, there is only one commercial gas plasma sterilizer, Sterrad<sup>®</sup> (Johnson&Johnson, K.K.). Thus, most research on gas plasma sterilization is performed using this machine. Studies using gas plasma instruments including developing instruments beside those of prion (39) reported inactivation of human immunodeficiency virus (HIV) (41) hepatitis A virus (41), respiratory syncytial virus (RSV) (41), vaccinia virus (41), herpes simplex virus (HSV) (41), poliovirus (41), duck hepatitis B virus (42), bacterial spores (43-45) and endotoxin

(40). However, the sterilization mechanisms are not simple. In the case of Sterrad<sup>®</sup>, the mechanism of action seems to be the effect of vaporized hydrogen peroxide, not that of gas plasma. In this case, gas plasma appears to contribute to the elimination of remaining toxic vaporized hydrogen peroxide after the reaction. In contrast, nitrogen and noble gasses (Argon and Helium) do not themselves have a biocidal effect, but their gas plasmas are effective for inactivation of pathogens. Therefore, gas plasmas of nitrogen and noble gasses have complicated mechanisms of radical production, UV exposure and high  $dV/dt$  and short pulse (Fig. 5) (40). Such an approach using inactive gasses is promising for the sterilization of fragile medical devices, especially endoscopes (46).



#### 4. Conclusions and perspectives

Prion has the unique feature of being devoid of nucleic acid. Therefore, its inactivation requires different procedures from those applied to other pathogens. In addition, prion diseases are zoonotic infectious diseases (5). Notably, the BSE prion causes vCJD in humans, and can be transmitted via blood (47). Current diagnostic methods for prion diseases are post-mortem, though recent research has achieved drastic improvements and enabled a highly sensitive diagnosis. Notably, PMCA raises the possibility of a pre-mortem diagnosis using blood samples not only from terminally ill individuals but also from preclinical onset (29). Gas plasma sterilization is a promising method potentially effective against all microorganisms including prions. This approach would offer profound advantages over conventional methods. By introducing appropriate gases into the system, certain gases critical for sterilizing each microorganism may be elucidated.

Finally, the authors note that the information is based on scientific publications at the time of preparation. Therefore, the authors and publisher take no responsibility for any consequences of the application of any of the information in this review by any reader. Recently, guidelines for 'Disinfection and sterilization in healthcare facilities, 2008' by the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (48) and guidelines for control of prion diseases, 2008 by the Research Committee on Prion Disease and Slow Virus Infection, The Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (38) have been published. For clinical issues relating to disinfection and sterilization, these guidelines are appropriate for consultation.

#### Acknowledgements

This study was supported by grants-in-aid for scientific research and grants-in-aid for scientific research on Innovative Areas (research in a proposed area) from the Ministry of Education, Sciences, Sports and Technology (MEXT). This work was also supported by Grants-in-aid from the Research Committee of Prion Disease and Slow Virus Infection, the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

#### References

- Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA and Martin MA: *Fields Virology*. 5th edition. Lippincott Williams & Wilkins, Pennsylvania, 2006.
- Gorski L and Csordas A: Molecular detection: principles and methods. In: *Molecular Detection of Foodborne Pathogens*. Liu D (ed). CRC Press, New York, pp1-20, 2009.
- WHO: Food safety and food borne illness. <https://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/index.html> (accessed September 6, 2010).
- Prusiner SB: Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216: 136-144, 1982.
- Prusiner SB: Prions. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 13363-13383, 1998.
- Sym D, Patel PN and El-Chaar GM: Seasonal, avian, and novel H1N1 influenza: prevention and treatment modalities. *Ann Pharmacother* 43: 2001-2011, 2009.
- Cuille J and Chelle PL: Pathologie animal - la maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable? *C R Acad Sci* 203: 1552-1554, 1936.
- Creutzfeldt HG: Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. Vorläufige Mitteilung. *Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie* 57: 1-18, 1920.
- Jakob A: Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswerten anatomischen Befunde (spastische Pseudosklerose-Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden). *Vorläufige Mitteilung. Deutsche Zeitschrift für Nervenheilkunde* 70: 132-146, 1921.
- Gerstmann J, Sträussler E and Scheinker I: Über eine eigenartige hereditär-familiäre Erkrankung des Zentralnervensystems. Zugleich ein Beitrag zur Frage des vorzeitigen lokalen Alterns. *Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie* 154: 736-762, 1936.
- Gajdsek DC and Gibbs CJ: Transmission of two subacute spongiform encephalopathies of man (kuru and Creutzfeldt-Jakob disease) to New World monkeys. *Nature* 230: 588-591, 1971.
- Anderson RM, Donnelly CA, Ferguson NM, *et al.*: Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle. *Nature* 382: 779-788, 1996.
- OIE: Number of reported cases of bovine spongiform encephalopathy (BSE) in farmed cattle worldwide. [http://www.oie.int/eng/info/en\\_esbmonde.htm](http://www.oie.int/eng/info/en_esbmonde.htm) (accessed September 6, 2010).
- Hill AF, Desbruslais M, Joiner S, *et al.*: The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* 389: 448-450, 1997.
- Bruce ME, Will RG, Ironside JW, *et al.*: Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature* 389: 498-501, 1997.
- Sakudo A and Ikuta K: Fundamentals of prion diseases and their involvement in the loss of function of cellular prion protein. *Protein Pept Lett* 16: 217-229, 2009.
- Sakudo A, Onodera T, Suganuma Y, Kobayashi T, Saeki K and Ikuta K: Recent advances in clarifying prion protein functions using knockout mice and derived cell lines. *Mini Rev Med Chem* 6: 589-601, 2006.
- Sakudo A and Ikuta K: Prion protein functions and dysfunction in prion diseases. *Curr Med Chem* 16: 380-389, 2009.
- WHO: Prion diseases. [http://www.who.int/zoonoses/diseases/prion\\_diseases/en/](http://www.who.int/zoonoses/diseases/prion_diseases/en/) (accessed September 6, 2010).
- Onodera T and Kim CK: BSE situation and establishment of Food Safety Commission in Japan. *J Vet Sci* 7: 1-11, 2006.
- Food Safety Commission: BSE&vCJD. <http://www.fsc.go.jp/english/topics/bseandvcjd.html> (accessed September 6, 2010).
- Pan T, Colucci M, Wong BS, *et al.*: Novel differences between two human prion strains revealed by two-dimensional gel electrophoresis. *J Biol Chem* 276: 37284-37288, 2001.
- Thuring CM, Erkens JH, Jacobs JG, *et al.*: Discrimination between scrapie and bovine spongiform encephalopathy in sheep by molecular size, immunoreactivity, and glycoprofile of prion protein. *J Clin Microbiol* 42: 972-980, 2004.
- Iwata N, Sato Y, Higuchi Y, *et al.*: Distribution of PrP(Sc) in cattle with bovine spongiform encephalopathy slaughtered at abattoirs in Japan. *Jpn J Inf Dis* 59: 100-107, 2006.
- Orge L, Galo A, Machado C, *et al.*: Identification of putative atypical scrapie in sheep in Portugal. *J Gen Virol* 85: 3487-3491, 2004.
- Saborio GP, Permanne B and Soto C: Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* 411: 810-813, 2001.
- Castilla J, Saa P, Hetz C and Soto C: In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell* 121: 195-206, 2005.
- Thorne L and Terry LA: In vitro amplification of PrPSc derived from the brain and blood of sheep infected with scrapie. *J Gen Virol* 89: 3177-3184, 2008.
- Saa P, Castilla J and Soto C: Presymptomatic detection of prions in blood. *Science* 313: 92-94, 2006.
- Soto C, Anderes L, Suardi S, *et al.*: Pre-symptomatic detection of prions by cyclic amplification of protein misfolding. *FEBS Lett* 579: 638-642, 2005.
- Jones M, Peden AH, Prowse CV, *et al.*: In vitro amplification and detection of variant Creutzfeldt-Jakob disease PrPSc. *J Pathol* 213: 21-26, 2007.
- Kurt TD, Perrott MR, Wilusz CJ, *et al.*: Efficient in vitro amplification of chronic wasting disease PrPRES. *J Virol* 81: 9605-9608, 2007.
- Murayama Y, Yoshioka M, Yokoyama T, *et al.*: Efficient in vitro amplification of a mouse-adapted scrapie prion protein. *Neurosci Lett* 413: 270-273, 2007.
- Atarashi R, Wilham JM, Christensen L, *et al.*: Simplified ultrasensitive prion detection by recombinant PrP conversion with shaking. *Nat Methods* 5: 211-212, 2008.
- Atarashi R: Recent advances in cell-free PrPSc amplification technique. *Protein Pept Lett* 16: 256-259, 2009.

36. Kim NH, Choi JK, Jeong BH, *et al*: Effect of transition metals (Mn, Cu, Fe) and deoxycholic acid (DA) on the conversion of PrPC to PrPres. *FASEB J* 19: 783-785, 2005.
37. Deleault NR, Lucassen RW and Supattapone S: RNA molecules stimulate prion protein conversion. *Nature* 425: 717-720, 2003.
38. Mizusawa H and Kuroiwa Y: Guideline for infection control of prion diseases 2008. The Research Committee on Prion Disease and Slow Virus Infection, Research on Measures for Intractable Diseases Health and Labour Sciences Research Grants, The Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan. <http://prion.umin.jp/guideline/index.html> (accessed September 6, 2010).
39. Fichet G, Comoy E, Duval C, *et al*: Novel methods for disinfection of prion-contaminated medical devices. *Lancet* 364: 521-526, 2004.
40. Shintani H, Shimizu N, Imanishi Y, *et al*: Inactivation of microorganisms and endotoxins by low temperature nitrogen gas plasma exposure. *Biocontrol Sci* 12: 131-143, 2007.
41. Roberts C and Antonoplos P: Inactivation of human immunodeficiency virus type 1, hepatitis A virus, respiratory syncytial virus, vaccinia virus, herpes simplex virus type 1, and poliovirus type 2 by hydrogen peroxide gas plasma sterilization. *Am J Infect Control* 26: 94-101, 1998.
42. Vickery K, Deva AK, Zou J, Kumaradeva P, Bissett L and Cossart YE: Inactivation of duck hepatitis B virus by a hydrogen peroxide gas plasma sterilization system: laboratory and 'in use' testing. *J Hosp Infect* 41: 317-322, 1999.
43. Roth S, Feichtinger J and Hertel C: Characterization of *Bacillus subtilis* spore inactivation in low-pressure, low-temperature gas plasma sterilization processes. *J Appl Microbiol* 108: 521-531, 2010.
44. Hong YF, Kang JG, Lee HY, Uhm HS, Moon E and Park YH: Sterilization effect of atmospheric plasma on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* endospores. *Lett Appl Microbiol* 48: 33-37, 2009.
45. Okpara-Hofmann J, Knoll M, Durr M, Schmitt B and Borneff-Lipp M: Comparison of low-temperature hydrogen peroxide gas plasma sterilization for endoscopes using various Sterrad models. *J Hosp Infect* 59: 280-285, 2005.
46. McDonnell GE: Antisepsis, disinfection and sterilization: types, action, and resistance. ASM Press, Washington DC, 2007.
47. Houston F, Foster JD, Chong A, Hunter N and Bostock CJ: Transmission of BSE by blood transfusion in sheep. *Lancet* 356: 999-1000, 2000.
48. Rutala WA and Weber DJ: HICPAC, guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities, 2008. [http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/guidelines/Disinfection\\_Nov\\_2008.pdf](http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/guidelines/Disinfection_Nov_2008.pdf) (accessed September 6, 2010).
49. Sakudo A, Onodera T and Tanaka Y: Inactivation of viruses. In: Sterilization Mechanisms, Biological and Medical Applications. Sakudo A and Shintani H (eds). NOVA Science Publishers Inc., New York (In press).
50. Inoue Y, Yamakawa Y, Sakudo A, *et al*: Infection route-independent accumulation of splenic abnormal prion protein. *Jpn J Infect Dis* 58: 78-82, 2005.
51. Tateishi J, Tashima T and Kitamoto T: Practical methods for chemical inactivation of Creutzfeldt-Jakob disease pathogen. *Microbiol Immunol* 35: 163-166, 1991.
52. Vadrot C and Darbord JC: Quantitative evaluation of prion inactivation comparing steam sterilization and chemical sterilants: proposed method for test standardization. *J Hosp Infect* 64: 143-148, 2006.

# Structure of the Prion Protein and Its Gene: An Analysis Using Bioinformatics and Computer Simulation

Akikazu Sakudo<sup>1,2,#,\*</sup>, Guangai Xue<sup>3,\*</sup>, Norihito Kawashita<sup>4,5,\*</sup>, Yasuhisa Ano<sup>3</sup>, Tatsuya Takagi<sup>4,5,6</sup>, Hideharu Shintani<sup>7</sup>, Yasuharu Tanaka<sup>1</sup>, Takashi Onodera<sup>3</sup> and Kazuyoshi Ikuta<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Biometabolic Chemistry, School of Health Sciences, Faculty of Medicine, University of the Ryukyus, 207 Uehara, Nishihara, Okinawa 903-0215, Japan; <sup>2</sup>Department of Virology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, 3-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan; <sup>3</sup>Department of Molecular Immunology, School of Agricultural and Life Sciences, University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan; <sup>4</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka, 565-0871, Japan; <sup>5</sup>Research Collaboration Center on Emerging and Re-emerging Infections, established by Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, and National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand; <sup>6</sup>Genome Information Research Center, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, 3-1 Yamadaoka, Suita, Osaka, 565-0871, Japan; <sup>7</sup>Faculty of Science and Engineering, Chuo University, 1-13-27 Kasuga, Bunkyo-ku, Tokyo 112-8551, Japan

**Abstract:** Prion protein (PrP) gene encodes cellular PrP (PrP<sup>C</sup>), a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored cell membrane protein indispensable for infections of prion, which causes Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) in humans, bovine spongiform encephalopathy (BSE) in cattle, and scrapie in sheep. Although PrP<sup>C</sup> is known to be converted into an abnormal isoform (PrP<sup>Sc</sup>) upon prion infection and play an important role in prion diseases, the mechanisms involved remain unclear, partly due to the insolubility of PrP<sup>Sc</sup>, which prevents experimental biochemical and biophysical analyses. Recently, with improvements in computer power and methods, computer analyses have been contributing more to prion studies. A comparison of PrP gene sequences revealed mutations and polymorphisms in the open reading frame (ORF) of the human PrP gene related to prion diseases. In contrast, little mutations or polymorphisms related to susceptibility to BSE were found in the ORF of the bovine PrP gene, though relationships between insertion/deletion (Ins/Del) polymorphisms of the PrP gene promoter and susceptibility to BSE have been found. Our results have shown that the specific protein I (Sp1) plays important role in the activity of PrP gene promoter, which is influenced by polymorphisms in the Sp1 binding sites. The potential structural dynamics of PrP have been simulated by computational methods such as molecular dynamics (MD) and quantum mechanics (QM). The proposed mechanisms of conversion have revealed new insights in prion diseases. In this review, we will introduce the gene structure, polymorphisms, and potential structural dynamics of PrP revealed by basic and advanced computational analyses. The possible contribution of these methods to elucidation of the pathogenicity of prion diseases and functions of PrP<sup>C</sup> is discussed.

**Keywords:** Prion protein gene, polymorphism, bovine spongiform encephalopathy, prion, molecular dynamics (MD), quantum mechanics (QM).

## INTRODUCTION

Prion diseases, a group of fatal transmissible neurodegenerative disorders include Kuru, Creutzfeldt-Jakob disease (CJD), Gerstmann-Sträussler-Scheinker-syndrome (GSS), fatal familial insomnia (FFI) in humans, scrapie in sheep, and bovine spongiform encephalopathy (BSE) in cattle [1, 2]. Neuronal cell loss (vacuolation), astrogliosis, and prion protein (PrP) accumulation are three representative features of prion diseases [1]. These features are closely related to clinical symptoms, which vary among strains and host species but usually include dementia and/or ataxia with a progressive loss of brain function, resulting in death [3].

The mechanism underlying the development of these infections is basically thought to be the conversion of the prion protein (PrP) [4]. The cellular isoform of PrP (PrP<sup>C</sup>), which expressed in host neurons, is converted to an abnormal isoform (PrP<sup>Sc</sup>) which induces cell death in animals infected with prion [3]. Therefore, prion diseases belong to conformational diseases or folding diseases, which include Alzheimers disease and Parkinson disease.

There are two main approaches to the study of prion diseases, experimental analysis and computer simulation. Due to PrP<sup>Sc</sup> property to aggregate most experimental biochemical and biophysical approaches can not be used for prion analyses. The recent development of high speed central processing units (CPUs), calculation methods, and huge databases has facilitated understanding of the structure of PrP and its gene. For example, recent studies showed that mutations and polymorphisms in the open reading frame (ORF)

\*Address correspondence to this author at the Laboratory of Biometabolic Chemistry, School of Health Sciences, Faculty of Medicine, University of the Ryukyus, 207 Uehara, Nishihara, Okinawa 903-0215, Japan; Tel./Fax:++81-98-895-1252; E-mail: sakudo@med.u-ryukyu.ac.jp

#These authors equally contributed to the manuscript.

of the PrP gene affect the susceptibility of humans and sheep to prion diseases, whereas polymorphisms in the ORF of the bovine PrP gene are unrelated to the incidence of BSE. According to the latest reports, the genetic susceptibility of cattle to BSE is associated with polymorphisms in the promoter region of the PrP gene and the level of its expression [5]. In addition, recent developments in computational methods such as molecular dynamics (MD) and quantum mechanics (QM) has enabled analysis of the potential conformational changes, molecular movements, and chemical reactions, etc. of PrP. In this review, we introduce the deduced structure of PrP and its gene and polymorphisms and their potential involvement in prion diseases revealed by computational analysis.

### Structure of the PrP Gene and Its Features

The structure of the PrP gene and the sequence of PrP are highly conserved in mammals (Table 1). The gene is located on chromosome 2, 3, 13, 13 and 20, in the mouse, rat, sheep, cattle, and human genome, respectively. The murine PrP gene spans 38 kb, and contains 3 exons [6], similar to the rat (16 kb) [7, 8], sheep (31 kb) [9] and cattle (35 kb) [10] PrP genes. In contrast, the human PrP gene (35 kb) has just 2 exons [11]. The entire ORF of all known mammalian PrP genes resides within a single exon, the last exon. Representative features of the gene include: (i) The ORF is not interrupted by introns; (ii) The region immediately 5' of the transcriptional initiating site contains a short GC-rich stretch, which is common in housekeeping genes [12] and might impose stability on the overall secondary structure of PrP mRNA with consequences for its metabolism and translation as in viruses [13]; and (iii) The 3'-untranslated region of mRNA contains highly conserved areas including a functional sequence (ATTTAA) for nucleus-specific polyadenylation [14]; (iv) Intron1 contains putative binding sites for transcription factors such as heat shock factor 2 (HSF2), myocyte enhancer factor 2 (MEF2), E4 promoter-binding protein 4 (E4BP4), nuclear matrix protein 4/cas-interacting zinc finger protein (NMP4/CIZ), regulatory factor X1 (RFX1), thyrotrophic embryonic factor (TEF), and ecotropic viral integration site (EVI1) [14].

Promoter regions have been reported for the mouse, rat, sheep, bovine and human PrP genes (Table 1). A common feature is that the transcription of PrP mRNA is initiated at a

GC-rich sequence (devoid of a TATA box) [15]. In mice, the PrP gene has two strong promoters, one located 5' to exon 1 and the other 5' to exon 2 and, in addition, a suppressor of transcription within intron 1, which is capable of suppressing activity from both promoters [6]. In rats, the promoter is located between bp -90 and -41 [8]. These regions in the mouse and rat PrP genes [6, 8] include an inverted CCAAT element and consensus binding sites for the transcription factors such as activator protein-1 (AP1) and specific protein 1 (Sp1). The sequences containing CCAAT and the Sp1-binding site are involved in regulating the transcription of numerous viral and eukaryotic genes [16-20]. In cattle and humans, the promoter is located between bp -88 to -33 and -148 to +125, respectively [10, 11]. For the bovine and mouse PrP gene, intron 1 elements are necessary for promoter activity [21]. The Inoue *et al.*, have suggested the existence of additional functional elements in the ~2.5 kb upstream exon 1 [10]. In the promoter region of both the bovine and human PrP genes, there are three potential Sp1-binding sites. In humans, these sites are located within the proximal promoter region at -62 to -57, +1 to +6, and +30 to +35 and in cattle, at position -47 to -42, -27 to -22, and -11 to -6. These observations suggest that Sp1-binding sites are important for the PrP gene promoter activity.

As the expression level correlates with susceptibility to prion diseases, knowledge of regulatory sequences and mechanisms is useful for preventing and delaying the onset of prion diseases.

### PrP Gene Polymorphisms and their Regulation of PrP Expression

PrP contains disulphide links (S-S), Asn-linked glycosylation sites (CHO), a signal peptide sequence (SP) at the N-terminal, an octapeptide repeat region (OR) in the N-terminal half, hydrophobic regions (HRs) in the central part (HR1) and C-terminal (HR2), and a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor attached to its C terminus (Fig. 1A) [22]. The elucidation of PrP gene mutations and polymorphisms is crucial to understanding inherited and other prion diseases, because these changes determine susceptibility to prion diseases.

For instance, polymorphisms of the PrP gene ORF have been shown to be major determinants of the susceptibility to prion diseases in humans. Although numerous polymor-

**Table 1. Outline of PrP Gene Structure from Different Species**

	Assignment of the PrP Gene to Chromosome	Gene Size (kb)	Number of Exons	Position of ORF	Length of ORF	Promoter Region	References
Mouse	Chromosome 2	38	3	Third exon	765	5' to exon 1 and 5' to exon 2	[6]
Rat	Chromosome 3	16	3	Third exon	762	Position from -99 to -41	[7, 8]
Sheep	Chromosome 13	31	3	Third exon	771	Position from -75 and -131 proximal to the exon 1 start site, respectively (in different cell types)	[9]
Bovine	Chromosome 13	35	3	Third exon	795	Position from -88 to -33	[10]
Human	Chromosome 20	35	2	Second exon	774	Position from -148 to +125	[11]