

平成 23 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21791343

研究課題名(和文) PMCA 法を用いた医療器材消毒法の網羅的評価と現実的プリオン消毒法の確立

研究課題名(英文) Assessment of prion inactivation with quantitative Protein Misfolding Cyclic Amplification

研究代表者

竹内 敦子 (TAKEUCHI ATSUKO)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00535239

研究成果の概要 (和文)：プリオンに効果的な現実的滅菌法を確立するため、異常プリオンタンパク質 (PrP<sup>Sc</sup>) の *in vitro*増幅系として注目される Protein Misfolding Cyclic Amplification (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。まず PrP<sup>Sc</sup> の定量的解析を可能にする実験系を構築した。この系を用いてプリオン滅菌法の効果について検討したところ、市販のアルカリ洗剤と熱処理 (オートクレーブ処理) を組み合わせた複合的な滅菌法が非常に効果的であり、その感染価の低下はおよそ 7log 以上であった。

研究成果の概要 (英文)：To evaluate prion removal efficacy of many disinfectants, multi-round PMCA was applied. We then analysed several sets of serial 10-fold dilutions of mock-treated samples statistically, and found that PMCA round numbers linearly correlate with means of dilution factors of infected brain between the second and sixth round. We found that a combined use of alkaline cleaner and autoclaving (121°C, 15 min) was one of the most effective treatments for prion inactivation, and the log reduction factor of PrP<sup>res</sup> was estimated to be  $\geq 7$  log.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：プリオン病

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：プリオン病、脳神経疾患、蛋白質、臨床、衛生

## 1. 研究開始当初の背景

プリオン病は現時点で有効な治療法のない感染性の致死性神経疾患であるため、プリオンに汚染された可能性のある医療器材の消毒法の確立は緊要である。特に脳神経外科

手術時に用いる廃棄不可能な医療器材の消毒に関しては、生前に CJD の確定診断を行うことが不可能な現状を踏まえ、恒常的に二次感染防止策が講じられていなければならない。しかしながら、プリオンの不活化に効果



次に、市販の洗浄剤及び消毒剤を単独で用いる方法、熱処理（70 °C, 15 分間）または通常のオートクレーブ処理（121°C, 15 分間）とを組み合わせた比較的簡便な方法について、ハムスタースクレイププリオンに対する不活化効果を定量的 PMCA 法により解析した（図 2）。

高水準消毒剤として、過酢酸（商品名アセサイド® 0.3%）、グルタラル（商品名サイデックスプラス® 3.5%）、日本において 2001 年に承認された高水準消毒薬洗浄剤であるフタラル（商品名ディスオーパ® 0.55%）について、一般に用いられる条件にて感染脳を消毒したところ、図 3 に示すように プリオン不活化にはほとんど不活化効果は認められなかった。そこで、通常のオートクレーブ処理（121°C, 15 分間）と組み合

Condition	Initial titer (log10 CFU/g)	Final titer (log10 CFU/g)	Reduction (log10 CFU/g)
Autoclave (121°C, 15 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 30 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 45 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 60 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 75 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 90 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 105 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 120 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 135 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 150 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 165 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 180 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 195 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 210 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 225 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 240 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 255 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 270 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 285 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 300 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 315 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 330 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 345 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 360 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 375 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 390 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 405 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 420 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 435 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 450 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 465 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 480 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 495 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 510 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 525 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 540 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 555 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 570 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 585 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 600 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 615 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 630 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 645 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 660 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 675 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 690 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 705 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 720 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 735 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 750 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 765 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 780 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 795 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 810 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 825 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 840 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 855 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 870 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 885 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 900 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 915 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 930 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 945 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 960 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 975 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 990 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1005 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1020 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1035 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1050 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1065 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1080 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1095 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1110 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1125 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1140 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1155 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1170 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1185 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1200 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1215 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1230 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1245 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1260 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1275 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1290 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1305 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1320 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1335 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1350 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1365 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1380 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1395 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1410 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1425 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1440 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1455 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1470 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1485 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1500 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1515 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1530 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1545 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1560 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1575 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1590 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1605 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1620 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1635 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1650 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1665 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1680 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1695 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1710 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1725 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1740 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1755 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1770 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1785 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1800 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1815 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1830 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1845 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1860 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1875 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1890 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1905 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1920 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1935 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1950 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1965 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1980 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 1995 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2010 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2025 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2040 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2055 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2070 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2085 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2100 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2115 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2130 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2145 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2160 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2175 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2190 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2205 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2220 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2235 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2250 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2265 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2280 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2295 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2310 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2325 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2340 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2355 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2370 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2385 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2400 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2415 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2430 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2445 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2460 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2475 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2490 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2505 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2520 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2535 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2550 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2565 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2580 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2595 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2610 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2625 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2640 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2655 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2670 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2685 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2700 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2715 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2730 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2745 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2760 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2775 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2790 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2805 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2820 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2835 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2850 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2865 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2880 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2895 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2910 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2925 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2940 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2955 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2970 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 2985 min)	6.5	0	6.5
Autoclave (121°C, 3000 min)	6.5	0	6.5

図 4 プリオンに対する各種滅菌法の定量的評価

わせることでより不活化効果を向上させることができるかどうかを解析したところ、オートクレーブ処理と併用しても、過酢酸、グルタラルではプリオンの不活化効果はほぼ認められなかった。一方、フタラルについてはオートクレーブ処理を組み合わせることによって、6.5log 以上の感染性の低下が認められた。そこで、やや弱い熱処理（70°C, 30 分間）を組み合わせると、感染性の低下は 1.5log 程度にとどまった。

次亜塩素酸は、1%程度の濃度では、室温での短時間の処理または、70°C, 30 分での処理でもほぼ不活化効果は認められなかった。通常のオートクレーブ処理を合わせた場合には、4.6-6.6log と不均一ではあるが、不活化効率が向上した。

WHO でプリオン不活化処理法として推奨される NaOH 処理に関しては、器具の性質によっては適応できない場合もあるため、低濃度と熱処理での不活化処理を行った。0.1-0.8 M の NaOH 処理と 70°C, 30 分間の熱処理を組み合わせさせた結果、NaOH の濃度が低い場合には、不活化効果はほぼ期待できず、高濃度での処理においてのみ効果があった。そのため熱処理を通常のオートクレーブ処理に変えたところ、0.1 M NaOH でも 6.6log 以上の感染性低下が認められることが分かった。

市販の洗浄剤については、アルカリ洗剤、中性洗剤、酵素入り洗剤について不活化処理効果を解析した。また、市販の洗浄剤（市販の実験器具用アルカリ洗剤、中性洗剤、酵素入り洗剤）を単独かつ室温状態で浸漬させた場合、アルカリ洗剤のみ、4.6log 程度、感染性を低下させることが可能であった。しかしながら、中性洗剤、酵素入り洗剤による不活化効果は認められなかった。そこでこれらの洗浄剤とオートクレーブ処理を併用したところ、酵素入り洗剤処理では全く不活化効果は向上しなかったのに対し、アルカリ洗剤では、6 log 以上の感染性の低下が認められ、中性洗剤でも通常のオートクレーブ処理と組み合わせれば高い不活化効果（5.4 log の感染性低下）が認められることが明らかとなった。アルカリ洗剤（商品名 mip PC-M）に浸漬し 70 °C で 30 分熱処理する方法もプリオン不活化に高い効果が期待できることが分かったが（図 1, 図 3）、汚染された器具類の高温煮沸処理などは寧ろ手技的に煩雑であり、周囲を汚染する可能性についても否定できないと考えられた。

本研究によって確立された、定量的 PMCA 法を用いることによって、マウスを用いた感染実験を行うよりもはるかに迅速に、多くの消毒法について、プリオン不活化に対する効果を定量的に解析することが可能となった。その結果、それぞれの消毒剤や洗浄剤につい

て、単独の処理ではプリオンを不活化することはこれまでに報告されてきたように非常に困難であったが、熱処理を組み合わせることで、非常に効果的に、かつ器具にダメージを与えない方法でプリオンを不活化できることが確認された。プリオンの不活化に推奨される 135℃でのオートクレーブ処理には耐えられない器具類は多いものの、脳外科手術に用いられる内視鏡については通常のオートクレーブ処理やアルカリ洗剤程度のアルカリには耐性があるものが多い。従って、アルカリ洗剤（中性洗剤の使用も有効）に浸漬した状態で、通常のオートクレーブ処理を行う滅菌法が現時点で最も効果的であることが明らかとなった。

2) 実際にステンレス製の手術器具などに感染脳が付着する可能性を想定し、ワイヤーにハムスター感染脳を浸漬させる方法によって SSW に付着させた PrP<sup>Sc</sup> についても、PMCA 法による増幅と定量的解析が可能であった。一方、脳ホモジネートを SSW に付着させたサンプルから PrP<sup>res</sup> を増幅させる場合には、ハムスター正常脳に浸漬させた SSW でも、PrP<sup>res</sup> の *de novo* 合成がまれに認められる場合があり、この問題点に対する解決策として、反応系へのジギトニンの添加が、*de novo* 合成の抑制に効果的であることを見出した。

SSW を用いた場合、およそ 10<sup>-9</sup> 希釈まで定量可能であったが（図 5）、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かつ迅速に滅菌効果を評価できると考えられた。

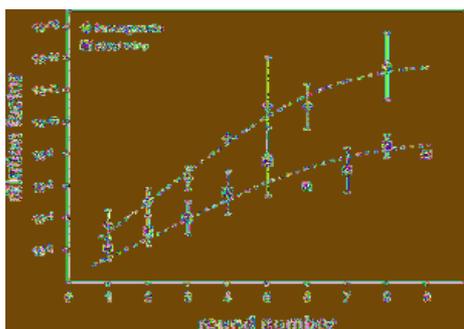


図 5 ステンレスワイヤーに接着させた PrP<sup>Sc</sup> の測定限界

## 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 2 件）

- ① Yokoyama T, Takeuchi A, Yamamoto M,

Kitamoto T, Ironside JW, Morita M. Heparin enhances the cell-protein misfolding cyclic amplification efficiency of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuroscience Letters*. 2011, in press 査読有

- ② Takeuchi A, Komiya M, Kitamoto T, Morita M. Deduction of the evaluation limit and termination timing of multi-round protein misfolding cyclic amplification from a titration curve. *Microbiology and Immunology*, 2011, in press 査読有

〔図書〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 1 件）

- ① 竹内敦子, 山本幸、北本哲之、森田将典. リコンビナント PrP<sup>Sc</sup> を用いた PMCA 法によるヒトプリオンの増幅. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会. 東京, 2009. 10. 27

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ

<http://www.prion.med.tohoku.ac.jp/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 敦子 (TAKEUCHI ATSUKO)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00535239

(2)研究分担者  
なし  
研究者番号：

(3)連携研究者  
なし  
研究者番号：