

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月21日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658277

研究課題名（和文） 医療器具によるプリオン病二次感染を防除する新規酵素洗浄剤の開発

研究課題名（英文） Development of the safely sterilization agent for prevention of secondary prion infection through medical instruments

研究代表者

堤 祐司 (TSUTSUMI YUJI)

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：30236921

研究成果の概要（和文）：

異常プリオンタンパク質の分解と感染性の除去には高温・高圧処理や強力な化学処理が必須であるが、医療行為により異常プリオンタンパク質に汚染された内視鏡や精密医療器具の洗浄にこれらの処理法を用いることはできない。そこで本研究では、医療器具を介したプリオン病二次感染を防除することを目的とし、より温和な処理が可能なマンガネロペルオキシダーゼを用いた新規医療器具酵素洗浄剤の開発を試みた。

研究成果の概要（英文）：

It has been well-known that abnormal prion protein is highly resistant against standard sterilization or chemical cleaning, and that high temperature-pressure or strong chemical treatment are required to sterilize its infectivity, however, these severe treatments are not applicable to some precision medical instrument, such as endoscopes. In this study, we investigated a capability of the enzyme, manganese peroxidase, to degrade and sterilize prion infectivity and tried to develop a new safely sterilization agent for precision medical instruments.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・境界農学

キーワード：プリオン病、マンガネロペルオキシダーゼ、感染性除去、二次感染防除、医療器具洗浄剤

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトのクロイツフェルト・ヤコブ病に代表されるプリオン病は、外部から進入した異常プリオンタンパク質が、体内に恒常的に存在する正常プリオンタンパク質を異常プリオンタンパク質に変換、蓄積する事によって発病する。異常プリオンタンパク質の感染経路の一つとして異常プリオンタンパク質に汚染された内視鏡や精密医療器具を介した医

療行為による二次感染が考えられる。

異常プリオンタンパク質は $\beta$ -シート構造に富み、容易に高度な凝集を形成するため、タンパク質分解酵素をはじめ、オートクレーブ処理や紫外線、エタノールなどの汎用される消毒法が無効であるとされている。異常プリオンタンパク質の除染・消毒に有効とされる強力な高温・高圧処理や化学処理はあるものの、内視鏡をはじめとする精密医療器具には

デリケートな材料が用いられているため、上述の様な強烈的な消毒方法を用いることはできない。

## 2. 研究の目的

上述の様な背景から、精密医療器具は界面活性剤によって常温洗浄されるのが現状であり、処理条件が温和でかつ汚染した異常プリオンタンパク質の病原性を除去しうる洗浄方法の開発が急務である。

申請者らは、これまでの研究において、白色腐朽菌による異常プリオンタンパク質の分解と感染性除去の可能性について検討を開始した。まず、白色腐朽菌14菌株を用いて異常プリオンタンパク質の生菌処理を行った結果、供試した菌株中、数種の菌株が異常プリオンタンパク質を高度に分解し、その感染性も除去しうることを見いだした。次いで、白色腐朽菌が産生するマンガンペルオキシダーゼが異常プリオンタンパク質を高度に分解しうることを見いだした。そこで本研究では、これまでの研究成果を基盤シーズとし、マンガンペルオキシダーゼによる異常プリオンタンパク質の感染性除去の検証と、医療器具洗浄剤への応用へ展開することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) MnP による異常プリオンタンパク質の感染性除去の検証

MnP による異常プリオンタンパク質分解の基礎研究を進める。プリオン病を発症したマウス (Fukuoka-1 株) の脳の乳化物 (脳乳剤) から異常プリオンタンパク質 (Scrapie Associated Fibril, SAF) を精製し、SAF を基質とした MnP による分解実験を行う。さらに MnP 処理した SAF をマウスの脳内に接種することによるバイオアッセイを行い、感染性の除去能を確認する。

### (2) 汚染器具モデルとしての異常プリオンタンパク質付着ワイヤーの MnP 処理と感染性バイオアッセイ

プリオン病感染マウスの脳乳剤にステンレスワイヤー ( $\phi=0.3\text{mm}$ ,  $L=3\text{mm}$ ) を懸濁した後、乾燥させる。乾燥により、異常プリオンタンパク質はワイヤー表面に強固に付着させ汚染器具モデルとして使用する。

汚染ワイヤーを用い、MnP 処理条件を検索する。分解程度の評価にはウエスタンブロッティングを用いる。

次いで、MnP 処理した汚染ワイヤーをマウスの脳に直接埋め込むことにより感染性バイオアッセイを行う。

## 4. 研究成果

### (1) MnP による異常プリオンタンパク質の

## 感染性除去の検証

ヒトプリオン病に感染したマウスの脳を採取し、脳内に存在する異常プリオンタンパク質 (SAF) の単離と精製を行った。

次いで、MnP (0, 3, 15, 30 Unit/反応) による SAF (50 ng/反応) の分解処理を1から3回の繰り返しで行った結果、MnP 3 U の条件を除き、全ての条件でウエスタンブロッティング検出限界以下まで減少した (図1)。同様の処理を繰り返し数3で行ったが、高い再現性が確認できた。別途に行った SAF の希釈系列によるウエスタンブロッティングから、SAF は少なくとも 1/4000 以下まで分解されていることが確認された。

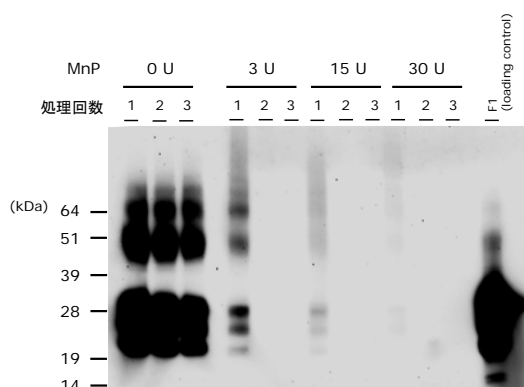


図1 MnP による SAF 分解処理

次いで、MnP 処理後の SAF をマウスの脳内に接種してバイオアッセイを行った。その際、未処理の SAF も同様にマウス脳内に接種し、感染価の検量線を作成した (表1)。

表1 未処理 SAF の希釈系列と感染性

SAF	n/n <sub>0</sub> <sup>†</sup>	incubation period (mean days ± SD)
10 ng	6/6	156 ± 7
1 ng	6/6	164 ± 2
0.1 ng	6/6	184 ± 6
0.01 ng	6/6	199 ± 20
0.001 ng	6/6	221 ± 7
0.0001 ng	5/6	330 ± 146
0.00001 ng	0/6	—
0.000001 ng	0/6	—

<sup>†</sup> proportion of the diseased mice in the inoculated mice.

表2 MnP 処理した SAF の感染性

MnP treatment	n/n <sub>0</sub> <sup>†</sup>	incubation period (mean days ± SD)	SAF <sup>‡</sup>
not treatment	6/6	156 ± 7	10.00 ng
triple			
0 U × 3	6/6	167 ± 6	1.13 ng
3 U × 3	6/6	197 ± 7	0.02 ng
15 U × 3	6/6	197 ± 14	0.02 ng
30 U × 3	6/6	206 ± 18	0.01 ng

† proportion of the diseased mice in the inoculated mice.

¶ Amount of SAF were calculated from the incubation period by the relationship between amount of SAF and incubation period.

表2に示すように、30 UのMnPで3回繰り返して処理した場合、発症までの潜伏期間がコントロールの156±7日から206±18日に延長した。この結果を表1で作成した検量線に当てはめると、MnP処理によってプリオンの感染価は1/1000まで減じることができたと考えられる。

## (2) 汚染器具モデルとしての異常プリオンタンパク質付着ワイヤーのMnP処理と感染性バイオアッセイ

汚染器具モデルとして、ステンレスワイヤーをプリオン病感染マウスの脳乳剤で汚染させた後、乾燥させた。汚染ワイヤーの異常プリオン付着量を確認するとともに、汚染ワイヤーのMnP処理条件を確立した。

MnP処理後のワイヤーに残存した異常プリオンタンパク質をウエスタンブロッティングで検出した結果を図2に示す。1回のMnP処理ではいずれのMnP量(6, 15, 30, 60 U)でも異常プリオンタンパク質が残存しているのが確認されたが、3回処理を施すことで、ワイヤーに残存する異常プリオンタンパク質は認められなくなった。

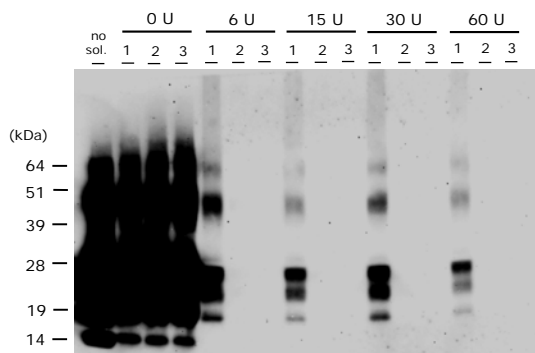


図2 MnP処理後の汚染ワイヤーに残存する異常プリオンタンパク質の検出

さらに、処理液の中に遊離した異常プリオンタンパク質を確認したところ(図3)、処理液中に異常プリオンタンパク質は検出されなかった。

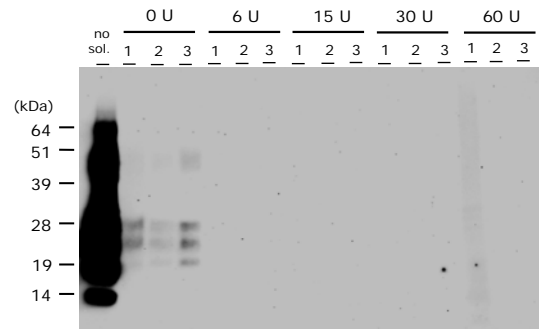


図3 汚染ワイヤーのMnP処理液中の異常プリオンタンパク質の検出

これらの結果は、MnP処理によって汚染ワイヤーに付着した異常プリオンタンパク質が分解されたことを示唆したため、処理後の汚染ワイヤーをマウスの脳内に埋め込み、バイオアッセイを行った(表3)。その結果、コントロールとして行った汚染ワイヤーをMnP処理液の代わりにbufferに浸して接種した場合のLD<sub>50</sub>値2.11に対して、60 UのMnPで3回処理したワイヤーのLD<sub>50</sub>値は1.31に減少したものの、感染価を1/10まで減少させたにとどまったことから、感染性除去処理としては不十分であった。この原因として、汚染ワイヤーでは金属表面に付着したプリオン感染脳組織を乾固させたことによりプリオンの耐性が著しく高くなることが考えられた。

表3 MnP処理による異常プリオンタンパク質汚染ワイヤーの感染価減少

MnP	frequency of processing	n/n <sub>0</sub>	incubation period (mean days ± SD)	LD <sub>50</sub>
60U	3	5/5	229 ± 26	1.31
30U	3	5/5	228 ± 25	1.33
15U	3	5/5	239 ± 19	1.05
0U	3	6/6	195 ± 9	2.21
Buffer	3	6/6	198 ± 7	2.11

以上の結果より、器具表面に付着したプリオンを乾固させることなく、MnP処理を施せばかなりの除染効果が得られること、一旦乾固させた場合には強力な化学的処理が必要であることが示された。

## 5. 主な発表論文等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

堤 祐司 (TSUTSUMI YUJI)  
九州大学・大学院農学研究院・教授  
研究者番号：30236921

(2) 研究分担者

毛利 資郎 (MOHRI SHIRO)  
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・プリオン病研究セン  
ター・センター長  
研究者番号：40117271

(3) 連携研究者

( )  
研究者番号：