

異常プリオン蛋白質の検出を指標とした肥料用肉粕液のプリオン不活化の評価

横山隆、嶋田希美、品川森一

動物衛生研究所 プリオン病研究センター

要約

牛海綿状脳症(BSE)の感染牛では中枢神経系に異常プリオン蛋白質(PrP^{Sc})の蓄積が認められる。ウエスタンブロット法(WB)による PrP^{Sc} の検出を指標として、肥料用の肉粕液中のプリオン不活化の程度を検定した。肉粕液にスクレイピーマウス感染脳乳剤をスパイクした試料からは、マウス感染脳 0.25ug (脳当量)に含まれる PrP^{Sc} の検出が可能であった。肉粕液の製造と同じアルカリ処理を行った感染マウス脳 0.25g (脳当量)の試料から PrP^{Sc} は検出されなかった。肉粕液中の PrP^{Sc} はアルカリ処理により少なくとも6Log 減少することを WB で確認した。

牛海綿状脳症(BSE)は感染性蛋白質プリオンが原因となる致死性の中枢神経系疾患である。羊、山羊のスクレイピー、ヒトのクロイツフェルト・ヤコブ病などとともにプリオン病または伝達性海綿状脳症と呼ばれる一連の疾患に属し、病原体として感染性蛋白質「プリオン」が提唱されている(1)。プリオンの本態は明確にされていないが、異常プリオン蛋白質(PrP^{Sc})を主要構成成分とする。 PrP^{Sc} は宿主の正常プリオン蛋白質(PrP^{C})の構造異性体で、現在までのところ唯一の疾病特異的マーカーである(1)。本病は長い潜伏期を特徴とし、 PrP^{Sc} の蓄積は感染後期から末期にかけて検出されるのみである。BSE 感染牛の体内における PrP^{Sc} の蓄積または感染性は脳、脊髄、背側神経根などの中枢神経系や回腸遠位端(パイエル板)に局限している(2)。BSE の主要かつ唯一の感染源として、感染牛の脳、脊髄などを原材料とした肉骨粉が疑われている。肉骨粉を動物性蛋白

質として牛に給餌したことが英国でのBSEの大発生の原因となった(3)。わが国でBSEが確認されて以来、感染性を含む危険性のある牛の組織(脳、脊髄、眼、回腸遠位部)は特定危険部位として廃棄、焼却処分されヒトの食用から除かれている。BSE発生以前には、いわゆる「屑肉」は、BSEの汚染源となった肉骨粉だけでなく様々な製品の原材料として用いられていた。その一つにアルカリ処理した肉粕液の園芸用肥料の使用があった。BSE発生以来、肉骨粉のみにとどまらず、肥料用のくず肉、肉粕等も禁止の対象とされ、BSE発生以前に製造された製品の大部分も廃棄処分された。肉骨粉やゼラチンの製造工程におけるプリオン不活化に関しては英国でのバリデーション試験の成績が知られている(4)。その他の製品、原材料の製造工程におけるプリオン不活化に関する具体的な成績はない。従って、これら製品の安全性評価は、ゼラチン処理と最も類似した条件の成績を参考にすることとまっている。BSE発生以前の製品には、プリオンの不活化の程度が不明または評価できないことから、その取り扱い、処分方法が未だに決まらず保管されているものもある。そこで、ウエスタンブロット法(WB)によるPrP^{Sc}の検出を指標としたプリオン不活化評価法の確立を行った。また、本手法を用いて肥料用肉粕液の製造工程におけるプリオンの不活化の程度を評価した。

材料と方法

1. プリオン

スクレイピー帯広株を脳内接種し、発症したSLC/ICRマウス(潜伏期:146±1.0日)の脳を使用した(5)。マウス脳乳剤中のPrP^C、PrP^{Sc}の検出はホモジネートにプロテイナーゼK(PK)処理または未処理の後、WBで検出した。感染マウスにおけるPrP^{Sc}の蓄積の詳細は既報のとおりである(6)。

2. 肉粕液

液体用肥料の原料用の肉粕液()を使用した。くず肉を最終5.6molのKOHで85℃1時間処理した後、塩酸で中和(pH試験紙にてpH6~7を確認)した溶液を肉粕液として使用した。

3. 肉粕液中の異常プリオン蛋白質(PrP^{Sc})の精製

上述の肉粕液にスパイクしたPrP^{Sc}の検出法について検討した。スパイクする試料にはPK未処理の感染脳乳剤を使用した。PrP^{Sc}をスパイクした肉粕液100uLはトリス緩衝液(pH7.5)で8倍に希釈した後、100uLの20%サルコシル溶液を加えて(最終濃度2.0%)室温で2時間転倒混和した後、15,000rpm、5分遠心した。上清900uLに4%リンタングステン酸溶液65uLを加え(最終0.3%)室温で30分転倒混和後、15,000rpm、30分の遠心を行った。ペレットは20uLのラウリル硫酸ナトリウム(SDS)-サンプルバッファーに再浮遊し、10uLをウエスタンブロット解析に使用した。

4. スクレイピー感染マウス脳の不活化試験

スクレイピー感染マウス脳 (0.5g) とくず肉 (0.15g) の混合物を肉粕液の製造工程と同様の条件で処理した (5.6mol の KOH 中で 85 ℃ 1 時間)。上記の肉粕液同様の方法で PrP^{Sc} の検出を試みた。

5. ウェスタンブロット(WB)

調整した試料は 100 ℃ 5 分の煮沸後、各 10uL を 12.5% の SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、ゲル中に展開された蛋白質をタンク式の転写装置を用いて電氣的に polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Immobilon, Millipore) に転写した。PVDF 膜をブロッキング溶液 (ブロックエース、大日本製薬) に 30 分浸漬した後、ペルオキシダーゼ標識した抗プリオン蛋白質モノクローナル抗体 (HRP-mAb.T-2) と室温で 1 時間反応させた。0.5% Tween20 加 PBS で洗浄後、化学発光検出試薬 (Super Signal, Pierce) と反応させ、画像解析装置 (フルオロケム、アルファイノテック社) でシグナルを検出した。

結果

1) WB による PrP^{Sc} の検出 (図 1)

スクレイピー感染および非感染マウス脳から PrP^C, PrP^{Sc} の検出を行った。図 1 のとおり PrP^C は PK 処理により完全に分解されるが、PrP^{Sc} は N 末領域の部分消化に伴う分子量のシフトが認められる。PrP^{Sc} は糖鎖修飾の差異により 3 本のバンド (図中矢印) として認められる。酵素標識した抗 PrP 抗体は特異的に PrP を検出することが示された。

2) 肉粕液にスパイクした PrP^{Sc} の検出 (図 2)

中和処理した肉粕液にスクレイピー感染マウス脳乳剤をスパイクした各試料からの PrP^{Sc} の回収を試みた。肉粕液でスクレイピー感染マウス脳ホモジネートを段階希釈した、各サンプルから PrP^{Sc} をサルコシル抽出の後、リンタングステン酸で沈殿させた。感染マウス脳 0.25ug 当量の PrP^{Sc} を WB で検出することが可能だった。PK 未処理の感染脳乳剤をスパイクしているため PrP^{Sc} の分子量は PK 処理した対象 (レーン 1) に比べて大きくなっている。

3) アルカリ処理したスクレイピー感染マウス脳からの PrP^{Sc} の検出

実際の液体肥料の製造工程に準じて、感染マウス脳 0.5g, 肉粕 0.14g, 水酸化カリウム溶液 (48% (W/V)) 157uL, 蒸留水 100uL を加えて 85 ℃ 1 時間処理した。この処理によって感染脳は完全に可溶化して液状となった。処理後のサンプルは塩酸で中和後、上述のスパイクテストと同様に PrP^{Sc} の精製を試みた。0.25g 当量のサンプルから PrP^{Sc} の検出を試みたが、図 3 に示すように特異的なシグナルは検出されなかった。また、肥料用

原材料に使われていた肉粕液 3 検体について検査を行ったが、PrP^{Sc} のシグナルは検出されなかった (結果は示さず)。

考察

プリオンは一般の熱、消毒薬に対して強い抵抗性を示し、その不活化には焼却処分、高濃度の水酸化ナトリウムまたは次亜塩素酸ナトリウム処理が必要とされている (7)。また、通常のオートクレーブ処理条件の 121 20 分では、完全な感染性の消失は認められない (8)。プリオン感染性の検出には動物接種試験が必要となるが、これはプリオン検出法の中で最も高感度である反面、結果が得られるまでには長い時間を要する (9)。感染試験にはマウスが多用されているが、プリオンの異種動物への伝達には種の壁と呼ばれる現象が認められる (10)。BSE 由来の材料についてマウスを用いて感染試験を行う場合は、牛を使った感染価の測定に比べて約 1/500 検出感度が低下する (11)。このこともプリオンの不活化条件を定めるための問題となっている。このような理由から、プリオンの不活化試験の成績は限られており、肉骨粉や肉粕を原材料とする個々の製品の安全性を評価するのは難しいのが実状である。

近年、免疫測定法の検出感度の向上が報告されており、一部の検査法は動物接種試験に匹敵することが報告されている (12, 13)。本試験では免疫測定法の一手法であり、プリオン病の診断で活用されている WB を用いて PrP^{Sc} の検出を指標に、短時間にプリオン不活化の程度を評価する方法について検討した。

WB を用いた PrP^{Sc} 不活化の検定では、材料の処理前後における PrP^{Sc} 検出限界の差を調べることによって、PrP^{Sc} の消失の程度を評価する。従って、処理する試料中に多量の PrP^{Sc} が含まれていることが重要であり PrP^{Sc} 量が多ければ多いほど結果の信頼度は高くなる。BSE 感染牛の脳当量中に含まれる PrP^{Sc} 蓄積量はマウス脳当量に比較して約 1/10 と少ないことが知られている。BSE プリオンを用いて、マウス PrP^{Sc} と同等の不活化評価結果を得るには、少なくとも BSE 感染脳から PrP^{Sc} を 10 倍以上濃縮する必要がある。わが国での BSE 発生頭数が少ないこと、感染牛での PrP^{Sc} の蓄積量が限局していることから、現時点では実験に使用できる BSE 感染脳の量が限られている。そのため本研究では BSE の代替としてマウス馴化スクレイピーを使用した。プリオンには多数の株の存在が知られており、生物学的、物理化学的な性状の違いも報告されている。BSE プリオンを用いた不活化試験は今後の課題と考える。

肉粕液中の PrP^{Sc} 分離精製法と WB での検出限界を明らかにするためのスパイク試験のために PrP^{Sc} を特異的に沈殿することが報告されているリンタングステン酸を利用した (14)。サルコシル抽出とリンタングステン酸沈殿の併用により、肉粕液にスパイクしたマウス感染脳 0.25ug 当量に含まれる PrP^{Sc} を検出することが可能であっ

た(図2)。スパイクした脳乳剤はPK処理を行っていないためPrP^Cのシグナルも含むと考えられる。感染末期にはPrP^{Sc}の蓄積とともにPrP^Cの著しい減少が認められており(6)、得られたシグナルはPrP^{Sc}の検出結果を反映すると考えられる。

次に、肉粕液の処理工程におけるプリオン不活化の程度を調べる目的で感染マウス脳を、肉粕液の製造と同様の水酸化カリウム処理(最終5.6mol)を行った。その0.25g脳当量分の試料からWBによりPrP^{Sc}の検出を試みたが、特異的なシグナルは認められなかった(図3)。このことはPrP^{Sc}が少なくとも1/10⁶に減少したことを示している。被検試料としてマウス感染脳そのものを用いることにより、WBで6Log以上のPrP^{Sc}減少を確認することが可能であった。プリオンに有効な不活化処理として水酸化ナトリウムを用いたアルカリ処理が推奨されている(7)。肉粕液は、1時間の水酸化カリウム処理(5.6mol)されているが、本結果から水酸化カリウムのプリオンの不活化効果も示された。本法は他の薬剤または異なる処理条件におけるプリオン不活化効果の判定にも応用可能と考えられる。PrP^{Sc}の消失と感染性の消失の関連については、マウスプリオン遺伝子を過発現させたスクレイピー高感受性マウス(15)を用いた動物接種試験で検討中である。(注：このマウスの最短の潜伏期はRML株の脳内接種で約70日、-6希釈したRML株脳乳剤は111日で発症。アルカリ処理した帯広株感染マウス脳(0.5g)より調整した試料を3匹の高感受性マウスに脳内接種した。水酸化カリウム処理した試料を接種したマウスは110日後まで発症が認められていない。対照の帯広株接種マウスは80日後に発症)

「肉粕、屑肉」には、脳・脊髄などBSEプリオンを含むおそれのある部位と、皮、四肢の骨などプリオンの蓄積のほとんど認められない部位に由来するものが混同されている。製造工程におけるプリオン不活化の評価に加えて、これら原材料のリスク分析も含めた各種製品の安全性評価が求められる。

謝辞

肥料用肉粕液の提供を頂いた、XXXXXXXXXX氏に感謝致します。

文献

- 1) Prusiner, S.B. (1991) Molecular biology of prion diseases. Science 252, 1515-1522.
- 2) Wells GAH, et al., (1998) Preliminary observations on the pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy (BSE): an update. Vet.Rec. 142: 103-106.
- 3) Wilesmith, J. et al., (1991) Bovine spongiform encephalopathy: Epidemiological studies on the origin. Vet.Rec. 128: 199-203.
- 4) Health & Consumer Protection Directorate – General, European Commission: The safety with regard to TSE risks of gelatine derived from ruminant bones or hide from cattle, sheep or goats (The scientific steering

- committee, 28-29 June 2001).
- 5) Shinagawa M. et al., (1985) Characterization of scrapie agent isolated from sheep in Japan. *Microbiol. Immunol.* 29: 543-551.
 - 6) Yokoyama T. et al., (2001) In vivo conversion of cellular prion protein to pathogenic isoforms, as monitored by conformation-specific antibodies. *J.Biol.Chem.* 276: 11265-11271.
 - 7) Taylor D.M. et al., (1994) Decontamination studies with the agents of bovine spongiform encephalopathy and scrapie. *Arch. Virol.* 139: 313-326.
 - 8) Rohwer R.G. (1984) Virus-like sensitivity of the scrapie agent to heat inactivation. *Science* 223: 600-602.
 - 9) Prusiner S.B. et al., (1982) Measurement of the scrapie agent using an incubation time interval assay. *Ann Neurol* 11: 353-358.
 - 10) Kimberlin, R.H. (1991) Agent-host interactions and pathogenesis, p137-147. In R.Bradley, M.Savey, and B. Marchant (ed.), *Subacute spongiform encephalopathies: Proceedings of the CEC Agricultural Research Programme Seminar, 1990.*
 - 11) European Commission in TSE infectivity Distribution in Ruminant Tissues (The Scientific Steering Committee meeting, 10-11 January 2002).
 - 12) Deslys J.P. et al., (2001) Screening slaughtered cattle for BSE. *Nature* 409: 476-4778.
 - 13) Safar, J.G. et al., (2002) Measuring prions causing bovine spongiform encephalopathy or chronic wasting disease by immunoassays and transgenic mice. *Nature biotechnol.* 11: 1147-1150.
 - 14) Safar J. et al., (1998) Eight prion strains have PrP^{Sc} molecules with different conformations. *Nature Med.* 4: 1157-1165.
 - 15) Fischer M. et al., (1996) Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *EMBO* 15: 1255-1264.