28. P. Buchy, S. Mardy, S. Vong, T. Toyoda, J.T. Aubin, M. Miller, S. Touch, L. Sovann, J.B. Dufourcq, B. Richner, P.V. Tu, N.T. Tien, W. Lim, J.S. Peiris, W.S. Vander, J. Clin. Virol. 39, 164–168 (2007). doi:10.1016/j.jcv.2007.04.010
29. J. Gu, Z. Xie, Z. Gao, J. Liu, C. Korteweg, J. Ye, L.T. Lau, J. Lu, Z. Gao, B. Zhang, M.A. McNutt, M. Lu, V.M. Anderson, E. Gong, A.C. Yu, W.I. Lipkin, Lancet 370, 1137–1145 (2008). doi:10.1016/S0140-6736(07)61515-3
30. T. Horimoto, Y. Kawaoka, Clin. Microbiol. Rev. 14, 129–149 (2001). doi:10.1128/CMR.14.1.129-149.2001
31. A. Gambotto, S.M. Barratt-Boyes, M.D. de Jong, G. Neumann, Y. Kawaoka, Lancet 371, 1464–1475 (2007). doi:10.1016/S0140-6736(08)60627-3
32. M.D. de Jong, V.C. Bach, T.Q. Phan, M.H. Vo, T.T. Tran, B.H. Nguyen, M. Beld, T.P. Le, H.K. Truong, V.V. Nguyen, T.H. Tran, Q.H. Do, J. Farrar, N. Engl. J. Med. 352, 686–691 (2005). doi:10.1056/NEJMoa044307
33. J.J. Zhou, J. Fu, D.Y. Fang, H.J. Yan, J. Tian, J.M. Zhou, J.P. Tao, Y. Liang, L.F. Jiang, Arch. Virol. 152, 1515–1521 (2007). doi:10.1007/s00705-007-0985-2

別紙様式第２－１

医薬品　研究報告　調査報告書

識別番号・報告回数		報告日	第一報入手日 2009年11月4日	新医薬品等の区分 該当なし		総合機構処理欄
一般的名称	別紙のとおり	研究報告の公表状況	Schweiz Arch Tierheilkd 151:433-436		公表国 スイス	
販売名（企業名）	別紙のとおり					
研究報告の概要	問題点：新規なプロテアーゼ抵抗性プリオン蛋白質検出系による検査の結果、BSE 罹患牛から生まれた仔牛の BSE 罹患率は、非 BSE 罹患牛から生まれた仔牛の BSE 罹患率より高率であった。 出産後に BSE を発症した母ウシから生まれ、過去の組織検査及び免疫組織検査では BSE 陰性とされた仔牛の血液検体を現在バリデーション中である新規なプロテアーゼ抵抗性蛋白質（PrPres）検出系で検査したところ、BSE に罹患した母ウシから生まれた仔牛の BSE 罹患率が 16.1%であったのに対し、BSE に罹患していない母ウシから生まれた仔牛の BSE 罹患率は 4.2%であり、BSE 罹患牛を母ウシに持つ仔牛の方が BSE 罹患率が高率であった。また、出産後 1 年以内に BSE と診断された母ウシから生まれた仔牛の BSE 罹患率は、出産後 1 年以上経過してから BSE と診断された母ウシから生まれた仔牛の BSE 罹患率よりも有意に高率であった。但し、検出された PrPres が感染性のプリオン蛋白質であるかは動物実験による検証が必要である。これらの結果は、神経組織学的異常が認められる前に、血液検体による感染確認の可能性を示唆すると共に、ウシにおける BSE 垂直感染の可能性が未だ払拭できないことを示している。					使用上の注意記載状況・その他参考事項等 別紙のとおり

報告企業の意見	今後の対応
別紙のとおり	今後とも関連情報の収集に努め、本剤の安全性の確保を図っていきたい。

MedDRA/J ver.12.1

23

一般的名称	①人血清アルブミン、②人血清アルブミン、③人血清アルブミン*、④人免役グロブリン、⑤人免役グロブリン、⑥人免役グロブリン、⑦乾燥ペプシン処理人免疫グロブリン、⑧乾燥ペプシン処理人免疫グロブリン、⑨乾燥スルホ化人免疫グロブリン、⑩乾燥スルホ化人免疫グロブリン、⑪乾燥スルホ化人免疫グロブリン、⑫乾燥スルホ化人免疫グロブリン、⑬乾燥スルホ化人免疫グロブリン、⑭乾燥スルホ化人免疫グロブリン*、⑮乾燥濃縮人活性化プロテインC、⑯乾燥濃縮人血液凝固第Ⅷ因子、⑰乾燥濃縮人血液凝固第Ⅷ因子、⑱乾燥濃縮人血液凝固第Ⅷ因子、⑲乾燥濃縮人血液凝固第Ⅷ因子、⑳乾燥濃縮人血液凝固第Ⅸ因子、㉑乾燥濃縮人血液凝固第Ⅸ因子、㉒乾燥濃縮人血液凝固第Ⅸ因子、㉓乾燥濃縮人血液凝固第Ⅸ因子、㉔乾燥抗破傷風人免疫グロブリン、㉕乾燥抗破傷風人免疫グロブリン、㉖抗 HBs 人免疫グロブリン、㉗抗 HBs 人免疫グロブリン、㉘トロンビン、㉙フィブリノゲン加第ＸⅢ因子、㉚フィブリノゲン加第ＸⅢ因子、㉛乾燥濃縮人アンチトロンビンⅢ、㉜乾燥濃縮人アンチトロンビンⅢ、㉝ヒスタミン加人免疫グロブリン製剤、㉞ヒスタミン加人免疫グロブリン製剤、㉟人血清アルブミン*、㊱人血清アルブミン*、㊲乾燥ペプシン処理人免役グロブリン*、㊳乾燥濃縮人アンチトロンビンⅢ
販売名(企業名)	①献血アルブミン 20 "化血研"、②献血アルブミン 25 "化血研"、③人血清アルブミン "化血研" *、④ "化血研" ガンマーグロブリン、⑤ガンマーグロブリン筋注 450mg/3mL「化血研」、⑥ガンマーグロブリン筋注 1500mg/10mL「化血研」、⑦献血静注グロブリン "化血研"、⑧献血グロブリン注射用 2500mg「化血研」、⑨献血ベニロン－Ｉ、⑩献血ベニロン－Ｉ静注用 500mg、⑪献血ベニロン－Ｉ静注用 1000mg、⑫献血ベニロン－Ｉ静注用 2500mg、⑬献血ベニロン－Ｉ静注用 5000mg、⑭ベニロン*、⑮注射用アナクトＣ2, 500 単位、⑯コンファクトＦ、⑰コンファクトＦ注射用 250、⑱コンファクトＦ注射用 500、⑲コンファクトＦ注射用 1000、⑳ノバクトＭ、㉑ノバクトＭ注射用 250、㉒ノバクトＭ注射用 500、㉓ノバクトＭ注射用 1000、㉔テタノセーラ、㉕テタノセーラ筋注用 250 単位、㉖ヘパトセーラ、㉗ヘパトセーラ筋注 200 単位/mL、㉘トロンビン "化血研"、㉙ボルヒール、㉚ボルヒール組織接着用、㉛アンスロビンＰ、㉜アンスロビンＰ500 注射用、㉝ヒスタグロビン、㉞ヒスタグロビン皮下注用、㉟アルブミン 20%化血研*、㊱アルブミン 5%化血研*、㊲静注グロブリン*、㊳アンスロビンＰ1500 注射用
使用上の注意記載状況・その他参考事項等	製剤①②④⑤⑥⑦⑧⑨⑩⑪⑫⑬⑮⑯⑰⑱⑲⑳㉑㉒㉓㉔㉕㉖㉗㉘㉙㉚㉛㉜㉝㉞㊳ ・重要な基本的注意 「現在までに本剤の投与により変異型クロイツフェルト・ヤコブ病（vCJD）等が伝播したとの報告はない。しかしながら、製造工程において異常プリオンを低減し得るとの報告があるものの、理論的な vCJD 等の伝播のリスクを完全には排除できないので、投与の際には患者への説明を十分に行い、治療上の必要性を十分検討の上投与すること。」
報告企業の意見	異常プリオンについては、血中における存在様態等未だ不明な点が多い。今回の報告は血中の異常プリオン検出及び BSE の垂直感染の可能性を示唆するものである。 上記製剤の製造にはウシの肺臓に由来するアプロチニンを使用しているが、当所では医薬発第 1226 号（平成 12 年 12 月 12 日）等の通知に基づいて牛由来原材料に係る原材料の原産国、使用部位等の調査、確認を行い、同通知等で BSE 発生リスクが低いとされる国をウシの肺臓の原産国としている。また、「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（医薬発第 1047 号、平成 11 年 8 月 30 日）」を参考に実施したクリアランス試験により、異常プリオンのクリアランス効果を有することを確認したウイルス除去膜ろ過工程を含む工程により製造を行い、安全性確保に努めてきている。更に、これまでに上記製剤による異常プリオン感染の報告例は無い。 以上の点から、上記製剤は BSE に対する安全性を確保していると考える。

*現在製造を行っていない

The material on this page was copied from the collection of the National Library of Medicine by a third party and may be protected by U.S. Copyright law.

INF2009-007

Schweiz.Arch.Tierheilk.
© 2009 by Verlag Hans Huber, Hogrefe AG, Bern
U. Braun et al., Band 151, Heft 9, September 2009, 433–436
DOI 10.1024/0036-7281.151.9.433

Untersuchung von BSE-Nachkommen auf Protease-resistentes Prion Protein (PrP^{res}) im Blut

U. Braun[1], A. Tschuor[1], M. Hässig[1], S. Franitza[1], E. Berli[1], A. El Gedaily[2], N. Franscini[2], U. Matthey[1], R. Zahn[2]

[1]Departement für Nutztiere der Universität Zürich, [2]Alicon AG, Schlieren

Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, zu untersuchen, ob im Blut von schweizerischen BSE-Nachkommen (Gruppe A) Protease-resistentes Prion Protein (PrP^{res}) vorkommt und ob sich die Häufigkeit des Vorkommens von derjenigen einer gesunden Kontrollpopulation aus dem Jahr 2006 (Gruppe B) unterscheidet. Die Gruppe A bestand aus 181 Nachkommen von an BSE erkrankten Kühen, die Gruppe B aus 240 gesunden Rindern aus einem Gebiet, in welchem in den Jahren 2001 bis 2006 keine BSE diagnostiziert worden war. Die Blutproben wurden mit einem BSE-Lebendtest (Alicon PrioTrap®) zum Nachweis von Protease-resistentem Prion Protein untersucht. Um abzuklären, ob zwischen der Zeitdifferenz von der Geburt des Nachkommens bis zur Erkrankung der Mutter an BSE eine Beziehung in Bezug auf den Nachweis von PrP^{res} beim Nachkommen bestand, wurde diese Zeitdauer bei jedem Nachkommen errechnet. Bei 29 (16.1 %) von 181 untersuchten BSE-Nachkommen wurde im Blutplasma PrP^{res} nachgewiesen, 152 Tiere waren negativ. Nachkommen, die innerhalb eines Jahres vor dem Auftreten von klinischen Symptomen des Muttertieres geboren worden waren, wiesen im Blut signifikant häufiger PrP^{res} auf als Tiere, bei denen der zeitliche Abstand von der Geburt bis zur Erkrankung mehr als ein Jahr betragen hatte ($P < 0.05$). In der Kontrollgruppe wurden 10 von 240 Tieren (4.2 %) positiv auf PrP^{res} getestet. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass beim Rind im Blut Protease-resistentes Prion Protein nachgewiesen werden kann und dass dieses bei Nachkommen von BSE-Kühen häufiger vorkommt als bei Tieren aus einer gesunden Kontrollpopulation.

Schlüsselwörter: Rind, BSE-Nachkommen, Protease-resistentes Prion Protein

[1]*Die vorliegende Publikation beruht auf den Ergebnissen der Dissertation von Dr. Andreas Tschuor*

Protease-resistant prion protein (PrP^{res}) in the blood of offspring of cows that developed BSE

The goal of the present study was to investigate whether protease-resistant prion protein (PrP^{res}) occurs in plasma samples of offspring of cows that developed bovine spongiform encephalopathy (BSE; group A) and to compare the prevalence with that of a healthy control group in 2006 (Group B). Group A consisted of 181 offspring of cows that developed BSE and group B consisted of 240 healthy animals from a region in Switzerland where no cases of BSE occurred from 2001 to the end of 2006. All plasma samples were evaluated using Alicon PrioTrap®, an antemortem test for PrP^{res}. The time between birth of the offspring and onset of BSE in the dam was calculated to determine its relationship with the presence of PrP^{res} in the plasma of the offspring. From 181 offspring, 29 (16.1 %) had PrP^{res}-positive plasma samples. Offspring that were born within one year of the onset of BSE in the dam had a significantly higher prevalence of PrPres-positive plasma samples than those born more than one year before the onset of BSE in the dam. Ten (4.2 %) of 240 control cattle had PrP^{res}-positive plasma samples. Thus, PrP^{res} can be detected in bovine blood and occurs more frequently in the offspring of cows that develop BSE than in cattle of a healthy control population.

Keywords: cattle, offsprings of BSE cows, PrP^{res}

The material on this page was copied from the collection of the National Library of Medicine by a third party and may be protected by U.S. Copyright law.

Einleitung

Bei Nachkommen von britischen BSE-Kühen wurde neurohistologisch signifikant häufiger BSE diagnostiziert als bei Nachkommen von Kühen, die nicht an BSE erkrankt waren (SEAC, 1996). Das Risiko eines BSE-Nachkommens, selbst an BSE zu erkranken, wurde vom britischen Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (MAFF) auf ca. 10% geschätzt, und es wurde proklamiert, dass eine Übertragung von BSE von der erkrankten Mutter auf das Kalb nicht ausgeschlossen werden kann (Masood, 1996). Diese Untersuchungen veranlassten die schweizerischen Behörden im Jahr 1996, alle Nachkommen von BSE-Kühen klinisch untersuchen, euthanasieren und danach auf BSE abklären zu lassen. Bei keinem Tier wurden damals Hinweise für eine BSE-Infektion gefunden (Braun et al., 1998; Fatzer et al., 1998). In der seither vergangenen Zeit haben sich viele Forschergruppen mit der Entwicklung eines Bluttests zum Nachweis von BSE beschäftigt. Einer dieser Gruppen ist es gelungen, einen Test zum Nachweis von Protease resistentem Prion Protein (PrP^{res}) in Körperflüssigkeiten zu entwickeln (Firma Alicon, unveröffentlicht). In der vorliegenden Arbeit wurde ein in der Validierung befindlicher Prototyp des ante mortem Testverfahrens zum Nachweis von BSE eingesetzt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe des neuen Testverfahrens zu untersuchen, ob im Blut von schweizerischen BSE-Nachkommen Protease-resistentes Prion Protein (PrP^{res}) vorkommt und ob sich die Häufigkeit des Vorkommens von derjenigen einer gesunden Kontrollpopulation aus dem Jahr 2006 unterscheidet.

Tiere, Material und Methoden

Tiere

Blutproben von 2 Tiergruppen (A und B) wurden auf das Vorhandensein von Protease resistentem Prion Protein (PrP^{res}) im Blut untersucht. Die Gruppe A bestand aus 181 Nachkommen von an BSE erkrankten Kühen. Die Nachkommen dieser Kühe waren im Winter 1996/97 auf Anordnung des schweizerischen Bundesrats an der Klinik für Wiederkäuer untersucht und danach euthanasiert worden (Braun et al., 1998). Bei den Müttern dieser Tiere konnte BSE in allen Fällen histologisch und immunhistochemisch nachgewiesen werden. Bei den 181 Nachkommen dieser Tiere war BSE postmortal weder bei der neurohistologischen noch bei der immunhistochemischen Untersuchung gefunden worden (Fatzer et al., 1998). Für den Nachweis von Protease-resistentem Prion Protein stand von jedem Nachkommen eine Blutplasmaprobe zur Verfügung, die seit 1996/97 bei -80 °C gelagert worden war. Die Gruppe B bestand aus 240 gesunden Rindern der Schweizer Braunviehrasse im Alter von 1 bis 9 Jahren aus dem Vorderrheintal des Kantons Graubünden. Die Blutplasmaproben von diesen Tieren waren im Jahr 2006 speziell für diese Untersuchung gewonnen worden. BSE war in diesem Gebiet in den Jahren 2001 bis 2006 bei keinem einzigen Tier nachgewiesen worden.

Untersuchung der Blutproben auf PrP^{res}

Die Blutproben wurden mit dem Ante Mortem BSE-Test untersucht. Das Testprinzip beruht darauf, dass in einem ersten Schritt die Prion Proteine PrP^{C} und PrP^{res} an ein Liganden-gekoppeltes Harz (Franscini et al., 2006) gebunden werden, welches die Prion Proteine mit hoher Affinität und Spezifität bindet. In einem zweiten Schritt wird PrP^{res} nach Behandlung der Probe mit Proteinase K wie beschrieben (McKinley 1983) im Westernblot nachgewiesen. Das normale Prion Protein, PrP^{C}, ist Proteasesensitiv und wird daher im Test nicht nachgewiesen. Ob es sich bei dem nachgewiesenen Protein tatsächlich um infektiöses Prion Protein (PrP^{Sc}) handelt, muss im Tierexperiment noch bestätigt werden.

Zeitdifferenz von der Geburt der BSE-Nachkommen zur BSE-Erkrankung der Mutter

Um abzuklären, ob zwischen der Zeitdifferenz von der Geburt des Nachkommens bis zur Erkrankung der Mutter an BSE eine Beziehung in Bezug auf den Nachweis von PrP^{res} beim Nachkommen besteht, wurde diese Zeitdauer für jeden Nachkommen errechnet.

Statistik

Die statistische Auswertung der Häufigkeiten erfolgte mit dem Programm StatView 5.0 (SAS Institut, 8602 Wangen, Schweiz).

Ergebnisse

Nachweis von PrP^{res}

Bei 29 (16.1%) der 181 untersuchten BSE-Nachkommen wurde im Blutplasma PrP^{res} nachgewiesen, 152 Tiere waren im Test negativ. In der Kontrollgruppe wurden 10 von 240 Tieren (4.2%) positiv auf PrP^{res} getestet (Differenz $P < 0.05$).

Zeitdifferenz von der Geburt der BSE-Nachkommen zum Diagnosedatum BSE beim Muttertier

41 Nachkommen waren ein Jahr, 79 Nachkommen zwei Jahre, 41 Nachkommen drei Jahre und 20 Nachkommen 4 oder mehr Jahre vor der BSE-Diagnose beim Muttertier geboren worden. Nachkommen, die innerhalb eines Jahres vor der Erkrankung des Muttertieres geboren worden waren, wiesen im Blut signifikant häufiger PrP^{res} auf als Tiere, bei denen der zeitliche Abstand von der Geburt bis zur Erkrankung mehr als ein Jahr betragen hatte ($P < 0.05$, Mann-Whitney-U-Test, Abb. 1).

The material on this page was copied from the collection of the National Library of Medicine by a third party and may be protected by U.S. Copyright law.

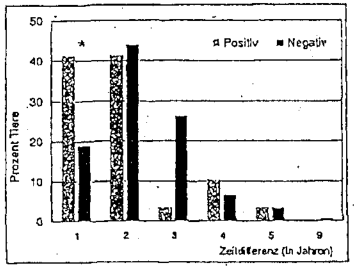

Abbildung 1: Häufigkeitsverteilung der zeitlichen Abstände von der Geburt der BSE-Nachkommen bis zur Erkrankung der Muttertiere an BSE bei Rindern mit positivem und negativem Nachweis von PrP^{res} im Blut (*Differenz zwischen den 2 Gruppen zum Zeitpunkt 1 $P < 0.05$).

Diskussion

Bei 16.1% der schweizerischen BSE-Nachkommen konnte im Blut PrP^{res} nachgewiesen werden, obschon diese Tiere neurohistologisch und immunhistochemisch BSE-negativ waren. Im Vergleich dazu wurde PrP^{res} nur bei 4.2% der gesunden Kontrollpopulation aus dem Jahr 2006 gefunden. Unsere Befunde sind ähnlich wie diejenigen der britischen Kohortenstudie. Bei dieser Studie zeigten 14% von 301 BSE-Nachkommen die für BSE charakteristischen neurohistologischen Befunde (SEAC, 1997). Die Ergebnisse können verschieden interpretiert werden. Einerseits ist es möglich, dass bei den BSE-Nachkommen deshalb mehr positive Fälle entdeckt wurden als bei den Kontrolltieren, weil die Nachkommen von ihren an BSE erkrankten Müttern infiziert wurden. Andererseits kann die niedrigere Häufigkeit bei den Kontrolltieren mit dem starken Absinken der BSE-Häufigkeit in der Schweiz erklärt werden. Die Tatsache, dass nur 16.1% der BSE-Nachkommen PrP^{res} positiv reagiert haben, zeigt, dass der maternalen Übertragung von BSE nur eine Nebenrolle bei der Verbreitung der BSE zukommt. Für die Bekämpfung der BSE ist es aber wichtig, dass auch dieser Infektionsweg durch die Keulung der Nachkommen von BSE-Kühen unterbrochen wird. Eine weitere Frage stellt sich, weshalb in der britischen Studie 14% der Nachkommen neurohistologische Symptome zeigten und in unserer Studie kein einziges Tier. Dieser Unterschied ist damit zu erklären, dass die von uns untersuchten Nachkommen im Alter von 3.1 ± 0.8 Jahren getötet und untersucht wurden, das heisst zu einem Zeitpunkt, wo es nur in seltensten Fällen zur BSE-Erkrankung gekommen ist. Im Gegensatz dazu wurden die britischen Tiere erst im Alter von 7 Jahren neurohistologisch untersucht. Die im Blut positive Reaktion bei gleichzeitig negativem neurohistologischem Befund weist darauf hin, dass die Infektion im Blut nachweisbar ist, bevor es zur Ausbildung neurohistologischer Veränderungen kommt.

Bei den BSE-Nachkommen mit einem einjährigen Zeitabstand zwischen ihrer Geburt und der BSE-Erkrankung der Mutter wurde signifikant häufiger PrP^{res} detektiert als bei den Tieren mit längerem Zeitabstand. Die Befunde decken sich mit den Befunden der MAFF-Studie, in welcher für den gleichen Zeitabstand ebenfalls eine signifikante Häufung der neurohistologisch positiven Ergebnisse festgestellt wurde (Donnelly et al., 1997). Eine mögliche Erklärung für die Befunde liegt darin, dass PrP^{Sc} gegen Ende der Inkubationszeit ausser im Nervengewebe auch vermehrt im Blut vorkommt und über den Blutweg den Fetus transplazentar infiziert (Aguzzi, 2006). Die maternale Transmission einer TSE konnte allerdings bisher erst bei Scrapie nachgewiesen werden, als in den plazentären Kotyledonen von präklinisch und klinisch kranken Scrapie-Schafen PrP^{Sc} gefunden wurde (Andreoletti et al., 2002). Die maternale Übertragung von BSE bei einer Antilope (Aldhous, 1990) und die BSE-Erkrankung einer Kuh, bei deren Mutter ebenfalls BSE diagnostiziert worden war, liessen allerdings den Verdacht aufkommen, dass eine maternale Transmission auch bei mit BSE infizierten Rindern vorkommen könnte (Aldhous, 1991).

Literatur

Aguzzi, A., M. Glatzel: Prion infections, blood and transfusions. Nat. Clin. Pract. Neurol. 2006, 6: 321–329.

Aldhous, P.: Maternal transmission in antelope. Nature 1990, 348: 666.

Aldhous, P.: BSE: First maternal transmission? Nature 1991, 350: 368.

Andreoletti, O., C. Lacroux, A. Chabert, L. Monnereau, G. Tabouret, F. Lantier, P. Berthon, F. Eychenne, S. Lafond-Benestad, J. M. Elsen, F. Schelcher: PrP(Sc) accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie: influence of foetal PrP genotype and effect on ewe-to-lamb transmission. J. Gen. Virol. 2002, 83: 2607–2616.

Braun, U., E. Amrein, U. Estermann, J. Egli, T. Schweizer, H. Lutz, F. Ehrensperger, M. Vandevelde, U. Kihm: Untersuchungen an 182 Nachkommen von an boviner spongiformer Enzephalopathie (BSE) erkrankten Kühen in der Schweiz. Teil 1: Klinische Befunde. Schweiz. Arch. Tierheilk. 1998, 140: 240–249.

Donnelly, C. A., A. C. Ghani, N. M. Ferguson, J. W. Wilesmith, R. M. Anderson: Analysis of the bovine spongiform encepha-

U. Braun et al., Band 151, Heft 9, September 2009, 433–436
Schweiz. Arch. Tierheilk.
© 2009 by Verlag Hans Huber, Hogrefe AG, Bern

lopathy, maternal cohort study: evidence for direct maternal transmission. Applied Statistics 1997, 46: 321–344.

Fatzer, R., F. Ehrensperger, D. Heim, J. Schmidt, A. Schnitt, U. Braun, M. Vandevelde: Untersuchungen an 182 Nachkommen von an boviner spongiformer Enzephalopathie (BSE) erkrankten Kühen in der Schweiz. Teil 2: Epidemiologische und pathologische Befunde. Schweiz. Arch. Tierheilk. 1998, 140: 250–254.

Franscini, N., A. El Gedaily, U. Matthey, S. Franitza, M.-S. Sy, A. Bürkle, M. Groschup, U. Braun, R. Zahn: Prion protein in milk. PLoS ONE 2006, (1), e71. doi:10.1371/journal.pone.0000071.

Masood, E.: BSE transmission data pose dilemma for UK scientists. Nature 1996, 382: 483.

McKinley, M. P., D. C. Bolton, S. B. Prusiner: A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. Cell 1983, 35: 57–62.

SEAC: Statement on maternal transmission of BSE. Spongiform Encephalopathy Advisory Committee. www.seac.gov.uk/statements/state29jul96.htm, 1996.

SEAC: Statement on maternal transmission of BSE. Spongiform Encephalopathy Advisory Committee. www.seac.gov.uk/statements/state16apr97.htm, 1997.

Tschuor, A. C.: Untersuchung von BSE-Nachkommen auf Protease-resistentes Prion Protein im Blut. Dissertation, Universität Zürich, 2007.

Zahn, R.: Persönliche Mitteilung, 2007.

Korrespondenz

Ueli Braun
Departement für Nutztiere
Winterthurerstrasse 260
CH-8057 Zürich
E-Mail: ubraun@vetclinics.uzh.ch
Fax: + 41 44 63 58 904

Manuskripteingang: 23. November 2008
Angenommen: 25. November 2008

Examens de descendants d'animaux BSE quant à la présence de protéines prioniques protéases résistantes (PrP^{res}) dans le sang

Le but du présent travail était d'étudier si les protéines prioniques protease résistantes (PrP^{res}) étaient présentes dans le sang de descendants d'animaux BSE (groupe A) et de voir si la fréquence de cette présence était différente de celle constatée dans une population de contrôle en 2006 (groupe B). Le groupe A se composait de 181 descendants de vaches atteintes de BSE, le groupe B de 240 bovins d'une région dans laquelle de 2001 à 2006 aucun cas de BSE n'avait été diagnostiqué. Les échantillons ont été testés avec Alicon Prio Trap ® pour mettre en évidence la protéine prionique protéase résistante (PrP^{res}). Afin de savoir s'il y avait une relation entre l'intervalle de temps séparant la naissance du veau de la maladie de la mère par rapport à la mise en évidence de PrP^{res} chez le veau, cette durée a été calculée pour chaque animal. Chez 29 (16.1 %) des 181 descendants BSE, la PrP^{res} a été trouvée dans le plasma, 152 animaux étaient négatifs. Les animaux qui étaient nés dans l'année précédant l'apparition des symptômes cliniques chez leur mère avaient de façon significative plus souvent la PrP^{res} dans le sang que les animaux chez lesquels l'intervalle entre la naissance et la maladie dépassait une année ($P < 0.05$). Dans le groupe de contrôle, 10 des 240 animaux (4.2 %) ont été positifs au PrP^{res}. Ces examens montrent que la protéine prionique protéase résistante peut être mise en évidence chez les bovins dans le sang et qu'elle est plus souvent présente chez les descendants d'animaux BSE que dans une population de contrôle saine.

Esame sanguigno della proteina prionica resistente alle proteasi (PrP^{res}) nella discendenza da mucche affette da BSE

Scopo del seguente studio è di esaminare se, nel sangue della discendenza da BSE svizzera (gruppo A), era presenta la proteina prionica resistente alle proteasi (PrP^{res}) e se si distingueva, nella sua frequenza, dalla popolazione di controllo sana del 2006. Il gruppo A era composto da 181 discendenti di mucche malate di BSE, il gruppo B era formato da 240 bovini sani provenienti da una regione nella quale dal 2001 al 2006 non sono stati diagnosticati casi di BSE. Le prove di sangue sono state analizzate con un test BSE (Alicon PrioTrap®) per la ricerca della proteina prionica resistente alle proteasi. Per chiarire se nel lasso di tempo tra la nascita della discendenza alla malattia (BSE) della madre ci sia un rapporto in relazione alla presenza di PrP^{res} nella discendenza, questa durata temporale è stata calcolata per ogni discendente. In 29 (16.1 %) dei 181 discendenti da BSE è stato rilevato nel plasma sanguigno la presenza di PrP^{res}, mentre 152 animali sono risultati negativi. I discendenti nati nell'arco di un anno dall'apparizione dei sintomi clinici della madre mostravano nel sangue una frequenza più significativa di PrP^{res} che gli animali nei quali il lasso di tempo dalla nascita fino alla malattia della madre era maggiore di un anno ($P < 0.05$). Nel gruppo di controllo 10 dei 240 animali (4.2 %) sono risultati positivi al test. Gli esami hanno rilevato che, si può ritrovare nel bovini, la proteina prionica resistente alle proteasi (PrP^{res}) e che la discendenza da mucche con BSE appare più di frequente che negli animali provenienti da una popolazione di controllo sana.

The material on this page was copied from the collection of the National Library of Medicine by a third party and may be protected by U.S. Copyright law.

Protease-resistant prion protein (PrPres) in the blood of offspring of cows that developed BSE

はじめに

英国においては、BSE に罹患した母ウシから生まれた仔ウシは、BSE に罹患していない母ウシから生まれた仔ウシと比較して、神経組織学的に BSE と診断される率が有意に高いとするデータが得られている（英国海綿状脳症諮問委員会 SEAC、1996）。英国農漁業食糧省（MAFF）は、BSE の母ウシから生まれた仔ウシが BSE に罹患するリスクを約 10％と見積もっており、BSE に罹患した母ウシから仔ウシへの BSE 感染は排除できないとの見解をとっている（Masood, 1996）。こうしたデータを踏まえて、1996 年にスイス当局は、BSE の母ウシから生まれたすべての仔ウシに対して臨床所見検査を実施し、安楽死させ、その後に BSE の有無について検査を行った。その結果、BSE 感染の徴候を示す仔ウシは 1 頭も発見することができなかった（Braun et al., 1998; Fatzer et al., 1998）。その後は今日に至るまで、数多くの研究グループが BSE 検出用の血液検査の開発に取り組んできた。そのうちのある研究グループは、プロテアーゼ抵抗性プリオン蛋白（PrP^{res}）を体液中から検出する方法の開発に成功した（Alicon 社、未公開）。本研究の実施に際しては、この BSE 死亡前検査法の、現時点ではバリデーションの段階にあるプロトタイプを利用した。本研究は、スイスの BSE に罹患した母ウシから生まれた仔ウシの血液中からプロテアーゼ抵抗性プリオン蛋白（PrP^{res}）が検出されるかどうか、また、対照群としての 2006 年時点における正常ウシと比較して、その検出率に差が示されるかどうかについて、この新規検査法を利用して検討することを目的として実施した。

動物、材料、方法

動物

２群（A 群と B 群）の動物から採取した血液検体を対象に、血液中からプロテアーゼ抵抗性プリオン蛋白（PrP^{res}）が検出されるか否かについて検査を実施した。BSE に罹患した母ウシから生まれた仔ウシ 181 頭を A 群とした。これらの仔ウシは 1996 年から 1997 年にかけての冬季間に、スイス連邦評議会の命令を受けて、反芻動物病院にて検査を実施した後、安楽死させた（Braun et al., 1998）。これらの仔ウシの母ウシは、組織検査の際にも免疫組織化学検査の際にもすべてが BSE 陽性であった。これに対して、181 頭の仔ウシに対する死後検査では、組織検査の際にも免疫組織化学検査の際にもすべてが BSE 陰性であった（Fatzer et al., 1998）。プロテアーゼ抵抗性プリオン蛋白（PrP^{res}）の検査用として、すべての仔ウシから血液検体を採取し、1996 年から 1997 年にかけての冬季間以降は－80℃の温度で保存しておいた。グラウビュンデン州のフォルデルラインタールで飼育された、年齢 1～9 歳の健康なスイス褐色牛 240 頭を B 群とした。B 群のウシからは、

2006 年に本研究のために特別に血液検体を採取した。2001 年から 2006 年の期間中に、この地域に飼育されていたウシで BSF に罹患したケースは皆無であった。

血液検体に対する PrPres の検査

血液検体に対してこの新規の BSE 死亡前検査を実施した。この検査法の原理について順を追って説明すると、第一段階としてはプリオン蛋白 PrP^{C} と PrP^{res} をリガンド固定化樹脂（Franscini et al., 2006）に結合させる。このリガンド固定化樹脂は、高い親和性および特異性のもとにプリオン蛋白と結合する。第二段階としては、文献に記述の方法（McKinley 1983）に準拠して、検体に対してプロテイナーゼ K 処理を行った後に、ウェスタンブロット法によって PrP^{res} を検出する。正常プリオン蛋白 PrP^{C} はプロテアーゼに感受性を示すので、検出されることはない。検出された蛋白が実際に感染性のプリオン蛋白（PrP^{Sc}）であるかどうかについては、動物実験を実施して検証する必要がある。

母ウシの BSE 発症と BES 仔ウシ誕生との時間的な差

仔ウシが生まれてから母ウシが BSE を発症するまでの時間的長さと、仔ウシにおいて PrP^{res} が検出される率との関係を探るために、すべての仔ウシについて、上記の時間的長さの調査記録を行った。

統計処理

度数の統計評価は、Programm StatView 5.0（SAS Institut、8602 Wangen、スイス）を利用して実施した。

結果

PrPres の検出

BSE の母ウシから生まれた仔ウシ 181 頭中 29 頭（16.1%）の血液検体から PrP^{res} が検出され、残りの 152 頭は陰性であった。対照群で PrP^{res} 陽性の結果を示したのは、240 頭中 10 頭（4.2%）であった（危険率 $p>0.05$）。

仔ウシ誕生から母ウシが BSE と診断されるまでの時間的長さ

母ウシが BSE と診断された時点を基準とした場合、仔ウシ全体(181 頭)のうちの 41 頭が 1 年前、79 頭が 2 年前、41 頭が 3 年前、残りの 20 頭が 4 年またはそれ以前に生まれていた。母ウシが BSE と診断される 1 年前以内に生まれていた仔ウシでは、それ以外の時期に生まれた仔ウシと比較して、血液中から PrP^{res} が検出される率が有意に高かった（$p<0.05$、Mann-Whitney U 検定、図 1）。

考察

スイスの BSE に罹患した母ウシから生まれた仔ウシの血液検体から 16.1%の割合で PrP^{res} が検出された。ただし、これらの仔ウシに対する神経組織検査結果や免疫組織化学検査結果はいずれも BSE 陰性であった。これに対して、対照群としての 2006 年時点における正常ウシの PrP^{res} の検出率は 4.2%程度にすぎなかった。著者のこの所見は英国で実施されたコホート研究の結果と類似していた。英国のコホート研究の際には、BSE に罹患した母ウシから生まれた仔ウシ 301 頭のうちの 14%が、BSE に特徴的な神経組織学的所見を示した（英国海綿状脳症諮問委員会 SEAC、1997）。これらの研究結果については、様々な解釈が可能であろう。そのひとつは、BSE に罹患した母ウシから生まれた仔ウシでは、BSE の母ウシから BSE に感染してしまったために、対照群と比較して BSE の陽性率が高くなったのではないかとする考え方である。他方では、対照群において BSE 陽性率がかなり低かったのは、スイスにおける極度に低い BSE 発症率から説明することができるだろう。また、BSE の母ウシから生まれた仔ウシにおいて PrP^{res} 陽性率が 16.1%程度にすぎなかった事実からは、BSE の伝播拡散にとって、BSE の垂直感染は副次的な意味しか持たないと考えることができるだろう。しかし、BSE との戦いにおいては、BSE に罹患した母ウシから生まれた仔ウシを殺処分することによって、こうした感染経路を絶つのも大切なことであろう。ここで疑問となるのは、英国で実施された研究の際には 14%の仔ウシにおいて神経組織検査結果が陽性であったが、本研究の際には神経組織検査結果が陽性の仔ウシが何故皆無であったかという点である。こうした相違は次のように説明できるだろう。著者の研究の際、殺処分ならびに検査の実施時の仔ウシの年齢は 3.1±0.8 歳であり、これは BSE がほとんど発症することのない年齢である。これに対して、英国で実施された研究の際は 7 歳のウシに対して神経組織検査が実施された。また神経組織検査結果が陰性であったにもかかわらず、血液中の PrP^{res} が陽性という結果を示したことは、神経組織学的異常が開始される前に、血液検体を用いて感染の有無を確認することが可能なことを示している。

母ウシが BSE と診断される 1 年前以内に生まれていた仔ウシでは、それ以外の時期に生まれた仔ウシと比較して、血液中から PrP^{res} が検出される率が有意に高かったが、この所見は MAFF（英国農漁業食糧省)研究の所見と一致している。ただし、MAFF 研究の際にも、同じ 1 年前以内に生まれていた仔ウシでみた場合、神経組織検査結果の陽性率が有意に高くなった（Donnelly et al., 1997）。こうした所見に対しては、PrP^{res} は潜伏期の終わりごろになると、神経組織以外に血液中にも多く存在するようになり、血行路から胎盤を経て胎仔に移行するためとする解釈が可能かもしれない（Aguzzi, 2006）。しかし、伝達性海綿状脳症（TSE）の垂直感染が確認されているのは、現時点ではスクレイピーに限られている。つまり、無症候性または症候性スクレイピーヒツジの胎盤葉からは PrP^{Sc} が検出されている（Andreoletti et al., 2002）。しかし、母動物が BSE と診断されている場合、

アンテロープにおいてはBSEの垂直感染（Aldhous, 1990）が認められ、ウシにおいてはBSEの発症が認められることから、ウシがBSEに感染する際にも垂直感染による可能性も存在するという疑いを払拭することができない（Aldhous, 1991）。

図1：仔ウシが生まれてから母ウシがBSEを発症するまでの時間的長さと、仔ウシの血液検体におけるPrP^{res}の陽性率と陰性率との関係の度数分布（* 母ウシの発症までの時間的長さが1年の際の差，$p<0.05$）

別紙様式第２－１

医薬品　研究報告　調査報告書

識別番号・報告回数			報告日	第一報入手日	新医薬品等の区分	総合機構処理欄
一般的名称	－		研究報告の公表状況	Neuropathology. 2009 Oct;29(5):625-31.	公表国 オーストラリア	
販売名（企業名）	－					

研究報告の概要	使用上の注意記載状況・その他参考事項等
脳神経外科用器具、脳波計（EEG）用脳内電極、ヒト下垂体ホルモン、硬膜移植片、角膜移植、輸血を介してクロイツフェルト・ヤコブ病（CJD）に罹患した患者は400名を超えている。 医原性CJD患者の新規の罹患数は減少しているが、輸血を介して伝播された多様なCJD症例が2004年以降報告されている。 CJDの医原性感染は、依然として明らかに深刻な問題である。近年、我々はこの9年間に日本CJDサーベイランス委員会（CJD Surveillance Committee）の登録患者に実施された医療（全ての外科処置、脳神経外科処置、眼科手術、および輸血）を調査した。 孤発性CJD（sCJD）患者753名と対照被験者210名で構成した症例対照試験で、プリオン病がsCJD発症以前に調査対照の医療を介して伝播したことを示すエビデンスを見出せなかった。 これまでに報告された症例対照試験のレビューでは、輸血がCJDの有意なリスク因子であることは一度も明らかにされておらず、我々の研究でも同じ結果が得られている。 手術がsCJDの有意なリスク因子であることを報告している症例対照試験もいくつかあるが、外科処置を手術のタイプ別に分類すると、その結果は相互に相容れないものがあり、これは外科処置を介してのプリオン伝播の可能性がほとんどないことを示唆している。我々の試験では、sCJD患者の4.5%がsCJD発症後に手術を受けており、これには脳神経外科処置0.8%および眼科手術1.9%が含まれる。sCJD発症後ですら、脳神経外科処置を含めて、手術を受けた患者がいるという事実は、医療処置を介したプリオン伝播の可能性を除外できないことを示唆している。 医原病リスクを低減するためには、我々はプリオン病に対して警戒を続けなければならない。	重要な基本的注意 現在までに本剤の投与により変異型クロイツフェルト・ヤコブ病（vCJD）等が伝播したとの報告はない。しかしながら、製造工程において異常プリオンを低減し得るとの報告があるものの、理論的なvCJD等の伝播のリスクを完全には排除できないので、投与の際には患者への説明を十分行い、治療上の必要性を十分検討の上投与すること。

報告企業の意見	今後の対応
輸血がCJDの有意なリスク因子であることは明らかにされていないが、警戒は続ける必要があるとの報告である。 現時点まで血友病以外で血漿分画製剤からvCJD伝播が疑われた報告はなく、血漿分画製剤の製造工程でプリオンが除去できるとの情報もある。 なお、当社血漿分画製剤の原料血漿は現在まで英国の血漿を使用していない。	今後ともvCJDに関する安全性情報等に留意していく。

24