

綜論傳播性海綿狀腦病致病物質普里昂 (Prion) 不活化方法及研究

李淑慧、許偉誠 本所疫學研究組

前言

傳播性海綿狀腦病(Transmissible spongiform encephalopathies, TSEs)，因其會造成人類或動物腦組織海綿狀病變而被命名。1982 年美國神經生化學家 Prusiner S.B 於科學 (Science)雜誌發表羊搔癢症(scrapie)之致病物質為一不含核酸，僅具蛋白質之粒子，並將其命名為 proteinaceous infection particle，此具感染力之病因簡稱 prion(普里昂)。正常動物及人類許多細胞表面皆含有 prion，簡稱 PrP^C，c 代表細胞(cellular)；此 PrP^C 正常結構為四個 α 螺旋結構，由於不明原因使其中兩個 α 螺旋結構異構(conformation)為 β 褶板樣結構，發生異構現象之 prion 稱 PrP^{Sc}，Sc 代表 scrapie，具感染力與病原性。PrP^{Sc} 無法被正常蛋白酵素所水解，故會堆疊於腦組織中，尤其是神經細胞，引起神經細胞凋零 (apoptosis)，繼而星狀細胞移除凋零死亡之神經細胞，形成腦組織之空洞變化。TSEs 之病原對傳統標準之消毒方法具有相當的抵抗力，完全有效的消毒方法有：132°C 4.5 小時之高壓滅菌法、1M NaOH 浸泡合併 121°C 90 分鐘之高壓滅菌法與濃度 20,000 ppm 次氯酸鈉溶液浸泡 1 小時。經 formalin 固定之組織需用 98% formic acid 加以處理，可將大部分發生異構之 Prion 不活化。

Prion 的定義

prion 疾病是由新病原 PrP^{Sc} 引起的，與已知的細菌及病毒顯著不同。例如其非常耐熱、不易被生物分解。純化病原後發現其主要為 prion 蛋白，雖然對此傳染源的性質尚有爭議，但大部分的實驗支持"只有蛋白"的假說，即此病原無核酸且只有細胞蛋白 PrP^C 的不正常相似物。在宿主中樞神經系統中，PrP^C 轉變為不正常異構物 PrP^{Sc} 且累積下來，是

prion 疾病的特徵。prion 位於細胞外表面，被 phosphatidylinositol glycolipid 所支撐，可能有訊息傳導、細胞黏著或是一些傳遞功能。PrP^C 在許多種細胞都有表現，包括神經細胞、星狀細胞以及淋巴球。雖然 PrP^C 主要在腦組織中被發現，在心臟、骨骼肌以及腎臟中也有許多，但在肝臟中則很少被偵測到。有幾種可能與 PrP^C 結合的蛋白質被報告過。其中之一是似類澱粉先質蛋白(amyloid precursor-like protein 1, APLP1)，為類澱粉先質蛋白基因族的成員之一。這引申了此病是否與老年癡呆症有關聯的新問題。其他可能的結合蛋白是人類薄受體先質 (laminin receptor precursor，一種細胞對感染源的表面受體) 以及未分類的 66kDa 膜蛋白。PrP^C 與 Bcl-2 (一種可以救援神經細胞的蛋白質) 的相互關係指向 prion 蛋白可能與神經細胞的存活有關，但還未有任何生理學上明顯的證據 [9-13]。

prion 是由在加州大學之 Prusiner S.B 於 1982 年發現，並因此於 1997 年獲頒諾貝爾獎 [10]。Prusiner 認為這個有缺憾的突變 prion 蛋白可「感染」腦部內健康的 prion 蛋白，造成其結構上的改變。結構異常的 prion 蛋白會繼續聚集，進而影響正常的腦部功能，最後會形成像海綿體狀的結構。科學家發現這個病原不需要經過遺傳物質 (例如 DNA 與 RNA) 的複製與擴散即可造成疾病，與其他會致病的微生物如病毒、細菌與黴菌等皆不相同。換言之，prion 蛋白本身即是病原體，而不是儲存胺基酸及蛋白質結構密碼的 DNA 與 RNA。prion 基因可能在七十年代時因某種未知原因產生突變，合成異常的 prion 蛋白，然後在製造肉骨粉過程時進入食物鏈。這個病原體具有抗高溫的特性，其他一般微生物與病毒在高溫下都無法生存。在過去三十年來，科學家從來沒見過這樣的病原體。

TSEs 之病原是一種非傳統的傳染性病原，稱為變性 prion，亦稱 PrP^{Sc}，該病原主要造成動物致死性神經變性的疾病，在人引起庫賈氏症(Creutzfeldt-Jakob Disease, CJD)、在牛引起牛海綿狀腦病(Bovine Spongiform Encephalopathy, BSE)、在山羊及綿羊引起搔癢症等，在受感染宿主會形成腦組織的海綿狀變性、神經膠細胞增生等病變。疾病之致病機序各有所不同，於牛海綿狀腦病的病例，可能是食用含有 prion 病原之飼料所引起，潛伏期平均為五年。prion 蛋白質稱為 PrP^C 是正常細胞之蛋白質存在於神經細胞膜上，PrP^C 分子特性為全長約 254 個胺基酸，可完全被蛋白酵素所分解；但若 PrP^C 於後轉譯過程中經修飾處理形成 209 個胺基酸的 PrP^C 或結構轉變形成異常之 PrP^{Sc}，PrP^C 具有四個 α 螺旋構造，若其中兩個 α 螺旋構造轉變為 β 褶板構造就形成 PrP^{Sc}，此結構改變之 PrP^{Sc} 無法完全被蛋白酵素水解，其與蛋白酵素作用後會失去約 67 個胺基酸，形成約 142 個胺基酸，分子量約 27~30 kD 的 prion rod，此 PrP^{Sc} 對細胞及組織有病原性，其會插入腦神經細胞

膜內且堆疊造成腦神經組織之空泡病變 [2, 6-8]。

Prion 之不活化方法

TSEs 之病原對傳統標準之消毒方法具有相當的抵抗力，完全有效的消毒方法有：132°C 滅菌 4.5 小時之高壓滅菌、1M NaOH 浸泡合併 121°C 滅菌 90 分鐘與 20,000 ppm 次氯酸鈉溶液浸泡 1 小時。在製做組織切片時，經 formalin 固定後之組織，需用 98% formic acid 加以處理 1 小時以上，如此可將大部分發生異構之 prion 不活化而不影響組織型態 [16]。

一、照射法 (Irradiation)：

非游離輻射、紫外線及微波照射對 TSEs 病原之影響很小，並無實用效果。

二、乾熱法：

冷凍乾燥的 263K 株 TSEs 病原經 360°C，1 小時乾熱處理，小部份仍具感染力。已有學者指出，乾燥會使 TSEs 病原的耐熱性增強。另有人對浸濕的 ME7 株做研究，在 200°C、加熱 1 小時即可將之不活化；然而 263K 與 301V 株則在 200°C、加熱 1 小時處理後仍具有部分感染力。Parveen 等人在 263K 株的研究發現，將 1 g 具感染性腦組織放入坩鍋中加熱至 150 ~1000 °C，持續 5 或 15 分鐘。結果顯示未加熱的對照組腦組織中，變異 prion 蛋白含量為 9.9 Log₁₀LD₅₀/ g tissue；加熱至 150 °C 之變異蛋白含量 ≥ 6 Log₁₀LD₅₀/ g tissue；加熱至 300 °C 之變異蛋白含量 ≥ 4 Log₁₀LD₅₀/ g tissue；加熱至 600 °C 時，可觀察到腦組織完全化為灰燼，但加入與原來重量相當的生理食鹽水、進行腦內注射後，仍可造成約 14% 的倉鼠發病(5/35)；加熱至 1000 °C 才能完全將變異的 prion 蛋白不活化 [4]。

三、高壓消毒：

高壓消毒對 TSEs 病原之消毒效果來自重力置換(gravity displacement, GD)及 porove-load (PL) 兩種高壓消毒方式。GD 高壓消毒係利用蒸氣將消毒釜內之空氣逐出。PL 高壓消毒則利用抽真空方式將釜內空氣抽出。GD 與 PL 不同之處在於後者之蒸氣可快速充滿消毒釜內。

GD 高壓消毒：

在 121°C、90 分鐘的消毒下可使 263K 株感染力降低 6 logs，但仍有 3.4 logs 存活。而 Brown 等人在 1990 年的研究發現，132°C、1 小時的消毒能將 S. Co. 與 263K 株不活

化。在美國，此法後來即被採用做為 CJD 之標準消毒方法。但後來的研究又認為 132°C、4 小時不能完全保證可將 CJD 不活化，建議改用 132°C、4.5 小時。

PL 高壓滅菌：

136°C、4 分鐘 PL 高壓滅菌可將 50 mg 浸濕腦組織中之 22A 或 139A 株不活化。由此試驗結果建議 134 ~ 138°C 1 個 cycle 18 分鐘或 6 個 cycles、每 cycle 3 分鐘可不活化 CJD 病原。

對罹患或疑似 CJD 病人實施神經外科或眼球外科手術中所使用之器具最好丟棄，不要考慮給予消毒後再使用，此一建議後又擴及罹患、疑患 CJD 病人有血緣關係之家屬，以及曾經接受往生者腦下垂體荷爾蒙、硬膜或眼角膜移植之個人。CJD 病原出現變異以及其與 BSE 之相關性，大大提高了人們對外科手術器具安全性之關心，此乃因 PrP^{Sc} 蛋白可輕易地在 vCJD 病患之淋巴網狀組織中析出；所以對罹患 CJD 病人一般外科手術中所使用之器械亦應丟棄 [1, 3]。試驗結果顯示，340mg 浸濕之 BSE、ME7 及 263K 病原株無法在 134 ~ 138°C、滅菌 1 小時的條件下完全不活化。此外當我們將大塊檢體放入滅菌器滅菌時，往往會有一些殘留的腦組織沾附在玻璃容器表面。當這些殘留物在玻璃或金屬表面乾掉後，其耐熱性會增強。因此更突顯出英國建議標準：134 ~ 138°C、18 分鐘能將所有感染性物質不活化的條件有待商榷。

為化解疑慮，科學家遂進行下列試驗，設定三組溫度條件：134、136 與 138°C：滅菌時間在 9 ~ 60 分鐘之間；感染性腦組織重量分成兩組：50 mg 與 375 mg。使用的 TSEs 病原株有(a) A22 株：為鼠源 TSEs 中耐熱性最強的。(b) 263K 株：為文獻指出經高溫高壓滅菌後，存活率最高者。(c) 301V 株：為文獻中鮮少提及的一株。在 A22 株的試驗中，50 mg 的感染物質在 134°C 與 136°C 皆可完全被不活化，但反常的是 138°C、滅菌 9 分鐘後仍具感染力。在 375 mg 的感染物質實驗中亦有類似現象：134°C 條件可將病原不活化，但 136 與 134°C 條件卻反而還具有感染性。這個試驗的結果顯示，22A 株的耐熱性會隨著滅菌溫度的升高而增加，134°C 與 138°C 條件下之結果具顯著差異。263K 株、301V 株的結果皆與 22A 株相似：動物接種經 134°C 滅菌的感染物質有 60% 發病；但是接種經 138°C 滅菌的感染物卻有 72% 發病，兩者具顯著差異 [16]。由試驗可知，單純地升高滅菌溫度與增加滅菌時間，無法達到有效將 TSEs 物質不活化之目的。

乾燥之感染物質的耐熱性增加的可能原因為：當溫度迅速升高時，邊緣乾燥的感染物會在外圍形成一層薄膜，在薄膜內的 PrP^{Sc} 物質會迅速被固定。快速固定對病原具有良好保護效果，此現象在經 formalin 固定的 poliovirus 也曾被提出。同樣地，搔癢症感染物質經酒精與 formalin 固定後之耐熱性也會增強。雖然 TSEs 物質的分子結構目前仍未十分明瞭，但 TSEs 物質可能是一個不甚穩定的複合物，依賴其內部的次級結構具有的高耐熱性 [15, 16]。

四、 酸鹼法：

Mould 等人發現搔癢症病原經 pH 2~10 處理後，僅失去些許感染力；而 S. Co. 病原株經 pH 1 的 HCl 作用 1 小時後，亦只會失去部分感染力。然而，經固定後的組織以濃縮的 formic acid 處理後，TSEs 感染物質的量會降低至 100 ID₅₀/g，但不會影響到鏡檢下組織結構的完整性。

有報告指出，S. Co. 與 263K 病原株經 1 M (pH 14) 的 NaOH 作用 1 小時可使之不活化。然而，此實驗因在動物接種前需先稀釋而降低其敏感性。另一學者的研究顯示，殘留物在經 1 M 的 NaOH 作用 24 小時後仍具有感染性。ME7、263K 株及 BSE 的研究發現，即使經 2M NaOH 作用 2 小時，仍具有部分活性 [16]。

雖然單獨使用 NaOH 無法將 TSEs 病原完全不活化，但若與其他滅菌方法併用亦可達將感染物質不活化的目的[15]。目前已被證實有效的方法有：先經 1M NaOH 浸泡，之後以 121°C 滅菌 30 或 60 分鐘，可使 Kitasato-1 與 263K 病原株不活化。另有文獻指出將 263K 株浸泡在 1M NaOH 中以 121°C 滅菌 90 分鐘可將其不活化。22A 株浸於 2M NaOH 經 121°C 滅菌 30 分鐘可被不活化。最新的研究則顯示，耐熱性最強的 301V 株在沸騰的 1M NaOH 中作用 1 分鐘即喪失感染力 [16]。

五、 烷化基藥劑(Alkylating agents)：

烷化基藥劑對 TSEs 感染物質之不活化效果很有限，常見的烷化基藥劑有：formalin、戊二醛、β-丙內酯及環氧乙烷...等。

六、 清潔劑：

清潔劑除十二烷基硫酸鈉(sodium dodecyl sulphate, SDS)外，對 TSEs 感染物質不活化效果都不好。SDS 對搔癢症與 CJD 病原不活化有一些效果，尤其加熱後的效果更佳。有報告指出，3%沸騰的 SDS 能有效將感染性腦組織不活化。但也有實驗顯示 50 mg 的感染性腦組織經 5 %沸騰的 SDS 處理 15 分鐘後，仍具有感染力。因此 SDS 較適合

用於液態的感染性物質的處理。

七、 鹵素：

在 S. Co.與 263K 株的研究顯示，次氯酸鈉濃度大於 25,000 ppm 可產生足夠的氯氣將感染物質不活化。在另一個大規模的研究中發現，22A 與 139A 株經 13,750 ppm 的次氯酸鈉溶液作用 30 分鐘可被不活化，據此結果，訂出次氯酸鈉的建議滅菌濃度為 20,000 ppm、作用 1 小時。另一種消毒水 dichloroisocyanurate solutions 則效果較差，因為它產生的氯氣較次氯酸鈉少了 3.5 倍 [16]。

八、 有機溶劑：

有機溶劑如：丙酮、5 %氯仿、乙醚、酒精與 4 %酚...等，對 TSEs 感染物質的滅菌效果不彰。

九、 氧化劑：

18%的過氧乙酸無法使腦組織不活化，而 2 %過氧乙酸則可有效將腦組織不活化。這個反常的結果被認為與均質化腦組織中 PrP^{Sc} 物質聚集之保護效果有關。近幾年有科學家針對過氧化氫對具感染力之 prion 物質的不活化效果進行研究，發現過氧化氫對物體表面的消毒效果顯著，有潛力做為醫療器材之表面消毒劑 [14]。

十、 蛋白分解酵素：

胰蛋白酶(trypsin)效果不好，但廣效蛋白酶如：pronase 及 proteinase K 若延長消化時間則可顯著降低 TSEs 感染物質。

十一、 超高壓高溫滅菌法：

肉品可能經機械性作用混入動物的中樞神經組織，產生感染 TSE 相關疾病的風險，但是目前已知有效的 prion 不活化方法，如：高溫高壓滅菌法、強酸強鹼處理等，皆會造成處理過之肉品無法食用，故不適用於食品工業。因此一種新的消毒方法—超高壓高溫滅菌法 (ultra pressure-temperature treatment)，逐漸開始被研究。其原理為利用極高的壓力，約 690-1200 MPa，搭配 120-145°C 溫度，將肉品中的 prion 感染物質不活化，目前的研究結果顯示，汙染的肉品以 690 MPa、120°C 處理後，可大幅降低 TSE 物質感染力(約 1000 倍) [5]。

結論

prion 之發現顛覆傳統生命繁衍所依循之孟德爾定律，一個僅由 142 個胺基酸組成

之蛋白質小粒子，不具核酸但卻能繁衍下一代具增殖及感染力，此可怕的小東西其致病性之產生居然是緣由正常組織所擁有之細胞表面蛋白質，些微立體結構之改變所造成，此異構後之變種蛋白質 PrP^{Sc} 居然無法用一般處理傳染性病原之方法將其消滅，許多實驗直接或間接證明攝入高濃度 PrP^{Sc}，會導致人類或動物感染 TSEs，而經由醫療行為感染 TSEs 更是需正視之問題。綜論之，狂牛症的起因似乎與人類違反自然法則有關，人類為了一己之私，以動物性飼料餵食原本只吃草的牛隻所造成的。這也引發人們對另一項科技產物基因修改 (genetically modified) 食品安全性的關注。往後食品安全將會成為已開發國家政府的關注的焦點。另外，從統計資料顯示，雖然感染狂牛症的牛隻數量近幾年已經減少，但其他種類的動物之病例數目卻持續增加。一旦其他的食用動物也爆發類似疫情，恐會造成新的衝擊。

TSEs 之病原對傳統標準之消毒方法具有相當的抵抗力，完全有效的消毒方法有：132°C 滅菌 4.5 小時之高壓滅菌、1M NaOH 浸泡合併 121°C 滅菌 90 分鐘與 20,000 ppm 次氯酸鈉溶液浸泡 1 小時。舉凡使蛋白質快速凝固的滅菌方法，都會保護 TSEs 病原免於被不活化，且增強其耐熱性。例如：酒精、乙醛等。因此欲研究不活化 TSEs 病原的滅菌方法時，需注意該方法是否能將蛋白質結構“摧毀”而非使蛋白質“凝固”。另外研究發現所有 TSEs 病原中，以 301V 株耐熱性最強且對化學物的耐性與其他病原株無異，因此 301V 株是研究 TSEs 病原不活化方法的首選。

探討台灣狂牛病發生之風險，所幸行政院農業委員會早有警覺性，早於 86 年就禁止國內反芻動物肉骨粉回飼反芻動物，並禁止有 BSE 發生國家之畜產品輸入，但台灣畜產品走私則會增加本病發生之風險，本所依世界動物衛生組織 (OIE) 規定進行國內牛海綿狀腦病之監測，以組織病理學、免疫酵素吸附法及西方墨點轉漬法來偵測之，結果皆無發現牛海綿狀腦病之疑似病例。值得慶幸的是，台灣業經 OIE 認定為牛海綿狀腦病風險已控制之國家。

參考文獻

1. The BSE Inquiry. UK. 2000.
2. Basler K, Oesch B, Scott M, Westaway D, Walchli M, Groth DF, McKinley MP, Prusiner SB, Weissmann C. Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. Cell 46: 417-428, 1986.

3. Bovine Spongiform Encephalopathy . In OIE Manual. Chapter 3.2.13: 338-341, 1996.
4. Brown P, Rau EH, Johnson BK, Bacote AE, Gibbs CJ Jr, Gajdusek DC. New studies on the heat resistance of hamsteradapted scrapie agent: Threshold survival after ashing at 600°C suggests an inorganic template of replication. PNAS 97: 3418–3421, 2000.
5. Cardone F, Brown P, Meyer R, Pocchiari M. Inactivation of transmissible spongiform encephalopathy agents in food products by ultra high pressure-temperature treatment. Biochim Biophys Acta. Mar 1764: 558-62, 2006.
6. Griffith JS. Self-replication and scrapie. Nature 215: 1034-1044, 1967.
7. Glatzel M, Aguzzi A. PrP^C expression in the peripheral nervous system is a determinant of prion neuroinvasion. J.Gen.Virol. 81: 2813-2821, 2000.
8. Oesch B, Westaway D, Walchli M, McKinley MP, Kent SB, Aebersold R, Barry RA, Tempst P, Teplow DB, Hood LE, Prusiner SB, and Weissmann C. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protien. Cell 40: 735-746,1985.
9. Parveen I, Moorby J, Allison G, Jackman R. The use of non-prion biomarkers for the diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies in the live animal. Vet. Res. 36: 665–683, 2005.
10. Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. Science 216: 136-144, 1982.
11. Prusiner SB, McKinley MP, Bowman KA, Bolton DC, Bendheim PE, Groth DF, Glenner GG. Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefrigent rods. Cell 35: 349-358, 1983.
12. Prusiner SB. Prion disease and the BSE crisis. Science 278:245-251,1997.
13. Prusiner SB. Prions. Proc. Natl. Acad. Sci. 95: 13363-13383, 1998.
14. Rogez-Kreuz C, Yousfi R, Soufflet C, Quadrio I, Yan ZX, Huyot V, Aubenque C, Destrez P, Roth K, Roberts C, Favero M, Clayette P. Inactivation of animal and human prions by hydrogen peroxide gas plasma sterilization. Infect Control Hosp Epidemiol.30: 769-77, 2009.
15. Taylor DM. Inactivation of prions by physical and chemical means. J Hosp Infect. 43 Suppl: S69-76, 1999.
16. Taylor DM. Inactivation of transmissible degenerative encephalopathy agents: a review. Vet. J. 159: 10–17, 2000.