

表 4. sCJD MM2 型症例の頭部画像所見のまとめ

症例	型	MRI (DWI, FLAIR) の異常信号				脳血流 SPECT での血流低下		
		皮質	深部白質	視床	時期 [§] (月)	皮質	視床	時期 [§] (月)
1	C	+	-	-	10	+	-	11
2	C	+	-	-	16	+	-	16
3	C+T	+	-	-	4	+ [¶]	+ [¶]	5 [¶]
4	T	-	-	-	26	+	+	15
5	T	-	-	-	46	+	+	11
6	T	-	+	-	58	+	+	36
7	T	-	-	-	13	NA	NA	NA
8	T	-	-	-	9	+	+	8

[§] 時期: 初めて MRI にて異常信号を認めた, あるいは脳血流 SPECT で血流低下を認めた病期 (経過中, 異常信号や血流低下を認めなかった例では, 最後に検査を行った病期)

[¶]: 症例 3 は FDG-PET

血清麻疹抗体価が持続高値を示したクロイツフェルトヤコブ病 を通じてのプリオン病全身剖検指針の提言

研究協力者：文村優一（東京都老人総合研究所・老化臨床神経科学）
研究協力者：齊藤祐子（東京都老人総合研究所・老化臨床神経科学）
班 員：村山繁雄（東京都老人総合研究所・老化臨床神経科学）

〔研究要旨〕

今回われわれは、血清麻疹抗体価が持続高値を示したクロイツフェルトヤコブ病（CJD）疑いの院外症例剖検依頼に対し、ご家族の同意のもとに、当院神経内科に転入院しプリオン病診断を確認、死亡時当施設プリオン病剖検プロトコルに従い剖検を行った。本例は type I M/M の典型的 CJD で、subacute sclerosing panencephalitis や麻疹脳炎の所見はなく、凍結脳 RT-PCR でも麻疹ゲノムは検出されなかった。しかし当施設プロトコルは脳のみを検索としており、麻疹の全身持続感染の可能性は除外できなかった。本例を通じ、一般の剖検室体制下で可能なプリオン病全身剖検指針として、以下のものを策定した。1. 脳は厳密なコントロールのもとに開頭採取、2. 脊髄は頭蓋内より高位頸髄を採取、3. 神経・筋は腓腹神経・短腓骨筋を生検の手法で採取、4. 口蓋扁桃は口腔内から採取、5. 骨髄は胸髄穿刺針で採取、6. 虫垂については右腹部からの皮切で採取、7. 脾臓は生検針を用い採取。この指針を次症例から適用する予定である。

A case report of classic Creutzfeldt-Jakob disease with persistent high-titer of serum anti-measles antibody and proposal of revised autopsy formula for systemic investigation of prion disease in our institute

Yuichi FUMIMURA M.D., Yuko SAITO M.D.Ph.D., & Shigeo MURAYAMA M.D.Ph.D.

Geriatric Neuroscience Research Group, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology

ABSTRACT

We experienced a case of Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) with persistent high titer of anti-measles antibody (IgG) in the serum, but not in the cerebrospinal fluid (CSF). RT-PCR analysis for measles was negative both in blood and CSF. The postmortem study confirmed typical pathology of CJD with type I proteinase resistant prion and codon 129 Met/Met variation. There was no feature of subacute sclerosing panencephalitis or measles encephalitis and RT-PCR for measles using the frozen brain was negative. Since our autopsy protocol for CJD permitted brain examination only, chronic systemic infection of measles could not be completely ruled out. We here propose a compromised general autopsy formula for prion disease as follows:

1. To remove the brain with strict condition against contamination.
2. To sample the upper spinal cord via the foramen magnum.
3. To excise the short peroneal muscle and the sural nerve following the biopsy manner.
4. To resect the palatine tonsil via the oral cavity.
5. To aspirate sternal bone marrow by needle puncture.
6. To resect appendix from right paramedian incision made like surgical removal.
7. To aspirate splenic tissue using a Silverman needle.

〔はじめに〕

当施設では厚生労働省の手引きに従い、脳のみを剖検を 2001 年に 18 年ぶりに再開した。プリオン病疑い臨床例に対する神経内科からの強い剖検希望が出され、また病理部責任者からの対応要請があり、部門として共同研究先の米国ノースカロライナ大学プリオン病剖検取り扱い規約、すなわち脳だけを厳密な感染防御下に取り出し、Center for Disease Control and Prevention に直送する方法に準拠し、以下の当施設プリオン病剖検取り扱い規約を制定した。

1. センター剖検室で厳密な感染コントロール下に脳のみを取り出す。
2. 前頭葉をその場で採取、ダブルシールの上、ドライアイス下に解析施設に直送する。
3. 標本作製は、ホルマリン固定、99%蟻酸 1 時間処理後、研究所で行う。

今年度、以下に呈示する症例を通じ、プリオン病院外症例取り扱い規約を制定したので報告する。さらにその症例を通じ、一般の剖検室体制で、どこまで全身検索が可能かを次年度の課題としたので、その点についても述べる。

〔症例〕

死亡時 73 歳女性。主訴：亜急性に進行する認知・運動機能障害。家族歴：類症なし。海外渡航歴・輸血歴：なし。既往歴：71 歳、完全子宮脱手術。現病歴：2001 年(71 歳)9 月頃より見当識障害出現、亜急性に進行。失調性歩行が加わり同年 11 月精査目的に前医入院。入院時身体所見：発熱・皮疹なし。その他一般内科学的に特記すべき所見なし。改訂版長谷川式簡易知能スケール 11/30。視覚認知障害、失調性歩行、両側病的反射陽性を認めた。検査所見：脳 MRI 拡散強調画像にて皮質に沿った高信号域(図 1)、脳波にて periodic synchronous discharges を認めた。脳脊髄液では細胞数 0.67/μl、TP67mg/dl、麻疹抗体価陰性。しかし血清麻疹抗体価は IgM (EIA) 3.45 (基準値<0.80)、IgG (EIA) 27.3 (基準値<2.0) といずれも高値。入院後経過：次第にミオクローヌスが明瞭となり、入院後約 1 ヶ月にて無動無言状態へ亜急性に進行。衰弱が進み全身状態は徐々に悪化。ご家人の希望により保存的療法の範囲で経過を追った。プリオン病の確定、亜急性硬化性全脳炎の除外のための脳組織の検索の許可をご家族は同意。しかし特殊感染症との理由で、前医では施行不能であり、当院への依頼があった。

本症例を当施設で剖検する上で

1. プリオン病の診断を当施設該当科(神経内科)が責任診断としていない、
2. 東京都老人医療センター院内規約にセンター患者以外の剖検を行う項目がない、点が問題であり、関係者で討論を重ねたうえ、以下のプリオン病院外症例取り扱い規約を作製した。

- | |
|---------------------------------|
| 1. 当院神経内科に転入院のうえプリオン病の診断を確認する。 |
| 2. 死亡時当施設プリオン病剖検プロトコールに従い剖検を行う。 |
| 3. この過程すべてにご家族の同意が存在する。 |

この規約に従い本例は当施設に転入院となった。

転入院後検索結果は以下のようであった。脳 CT scan：全脳の著明な進行性萎縮(図 1)、プリオン遺伝子：codon129 Met/Met, codon219 Glu/Glu。脳脊髄液：TP90mg/dl、麻疹抗体価陰性、麻疹ウイルス RNA RT-PCR 陰性、14-3-3 蛋白(±)、tau 329.1 pg/ml、NSE 10.5 ng/ml。血液：麻疹ウイルス RNA RT-PCR 陰性。血清：全経過を通じ抗麻疹ウイルス IgM 抗体 (EIA) 2.30~4.21 (基準値<0.80)、IgG 抗体(EIA)16.1~39.8 (キット名：デンカ生検社製 麻疹ウイルス IgM, IgG-EIA「生研」)高値で推移(表 1)。キット(キット名：DADE BEHRING 社製 Enzygnost Anti-Measles Virus IgM, IgG)をかえても IgM index<1.0 (基準値<1.0)と IgM 抗体の高値は確認できなかったが、IgG index =21(基準値<1.0) と IgG 抗体は高値。ELISA の非特異反応を疑い測定した通常法でも、CF 8 (基準値<4)、HI 8 (基準値<8)、NT 64 (基準値<4) と高値であった。クロイツフェルトヤコブ病にほぼ間違いないことを告げた後、ご家族が積極的な延命措置を望まず、2003 年(73 歳)09 月 12 日、入院第 52 病日に死亡。全経過約 2 年。死後 7 時間 10 分にて剖検開始。

〔方法〕

遺伝子検索、剖検にあたってはご家族に文書による同意を得たうえ施行。剖検は厚生労働省の手引きに準拠した、東京都老人医療センタークロイツフェルトヤコブ病剖検取り扱い規約に従い、脳のみを剖検を、シールドした環境下で dry condition で行った。器具は全てディスポを使うかたちとし、125℃オートクレーブ後破棄した。右前頭極を東北大学北本哲之博士に、右側頭極を国立感染研究所佐多徹太郎・高橋秀宗両博士に、二重シールド下、ドライアイスをつめた発疱スチロールをさらに二重にしたうえ郵パックで送付した。脳は20%ホルマリンに固定後、水洗はせず、剖検室内シールド環境で、剖検時と同様の条件でブレインカッティングを行った。この際、画像との対応に配慮した。切り出した標本は、99%蟻酸で1時間処理後、再度中性緩衝ホルマリンで固定し、パラフィン包埋、その後は通常の標本と同じ処理を行った。すなわち6 μ m連続切片を作成し、hematoxylin and eosin (H.E.)、Kluver-Barrera (KB)、抗HLA-DR(CD68)抗体、抗glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体、抗リン酸ニューロフィラメント (SMI31) 抗体、抗プリオン蛋白抗体(3F4)、抗リン酸タウ抗体 (AT8)、抗Abeta 蛋白抗体 (11-28)、抗リン酸化 α シヌクレイン抗体 (pSy#64)、抗ユビキチン抗体、抗麻疹ウイルス抗体免疫染色で評価した。

〔結果〕

脳重は640g。脳萎縮は高度でいわゆるクルミ状を呈していた(図2)。固定前凍結脳を用いた不溶性プリオンの解析結果はタイプ1であり、麻疹ウイルス RT-PCR は陰性であった。ホルマリン固定後、死亡1ヶ月前のMRIとなるべく合わせた冠状断断面を作製したが、大脳皮質のびまん性かつ高度の萎縮、脳室系の拡大を認めた。一方海馬固有域はその他の部位に比し比較的よく保たれていた(図3)。大脳白質は萎縮・軟化し、基底核・視床にも変性の所見が強く認められた。小脳皮質の萎縮も高度であり、それに比し脳幹は比較的よく保たれていた。

組織学的には、海馬の神経細胞はよく保たれていたが(図4)、抗プリオン抗体免疫染色ではび漫性に陽性所見を認めた。大脳皮質神経細胞は高度に脱落、海綿状態を示し、アストロサイトの増殖、マイクログリアの反応を認め、プリオン沈着はシナプス型を呈した(図5)。大脳白質変性は高度であり、下行路の変性も著明であった。小脳では顆粒細胞が完全に脱落し、Purkinje 細胞が比較的保たれ、分子層が抗プリオン抗体免疫染色でシナプス型に染色される、典型的病理像を示した。抗麻疹ウイルス抗体による検索は陰性であり、麻疹脳炎および亜急性硬化性全脳炎の所見は認めなかった。

〔考察〕

院外症例を受け入れるにあたり、剖検のために転院するという点について、医療サイド、看護サイドいずれにも当初抵抗が存在した。しかし、担当科責任医長、及び担当病棟看護師長の、現在患者様に出来ることは、ご家族の希望を考慮すれば、診断を確実につけてあげるしかないという哲学のもとに、上記受け入れ指針で院内コンセンサスを得た。

本例の医学的問題点としては、血清抗麻疹抗体の持続高値については、末梢組織での麻疹ウイルスの持続感染が完全には否定できず、全身剖検が必要であったと考えられる。しかし、当院プリオン病剖検指針は全身剖検を含んでおらず、本例に全身剖検を施すことはできなかった。

この症例を機会に、一般剖検室における、プリオン病の全身検索の可能性について、関係者で参考資料をもとに協議した(1-6)。プリオン病の中枢神経系外進展として問題とされるのが、細網内皮系、末梢神経、骨格筋である。その事実をふまえ、プリオン病剖検指針を以下のように改訂した。1. 脳はこれまで通り、2. 脊髄は頭蓋内より高位頸髄を採取、3. 神経・筋は、腓腹神経・短腓骨筋を生検の手法で採取、4. 口蓋扁桃は口腔内から採取、5. 骨髄は胸髄穿刺針で採取、6. 虫垂については右腹部からの皮切で採取、7. 脾臓は生検針を用い採取する。この指針は次症例から適用予定であり、その結果は次年度報告予定である。

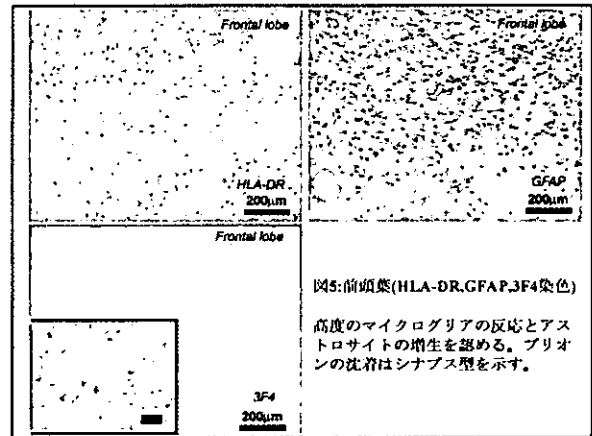
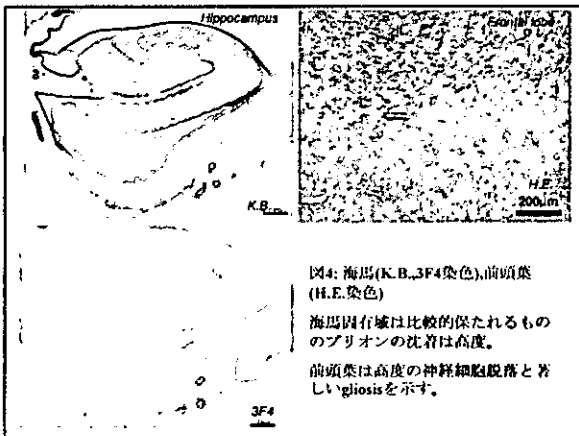
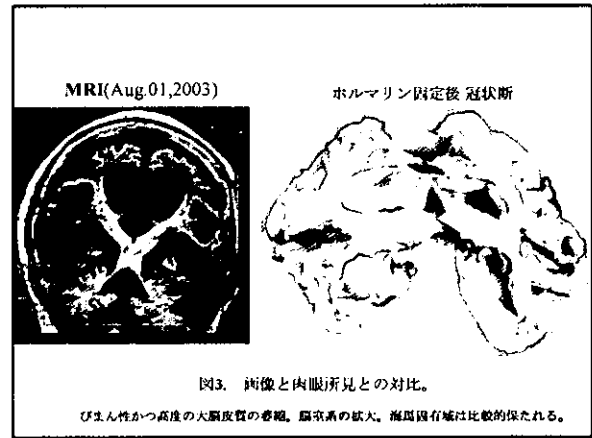
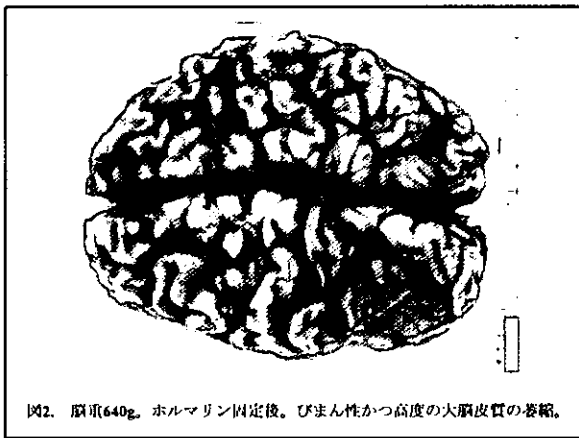
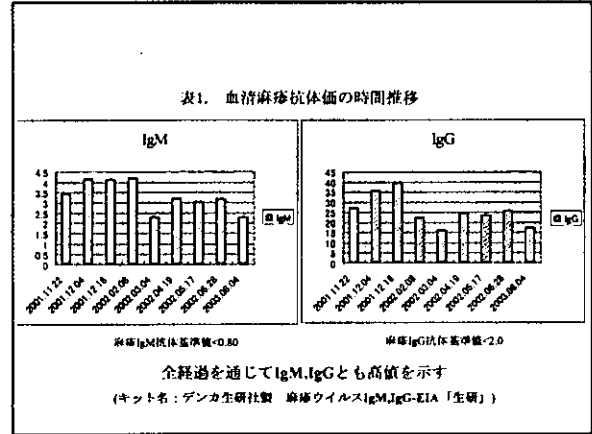
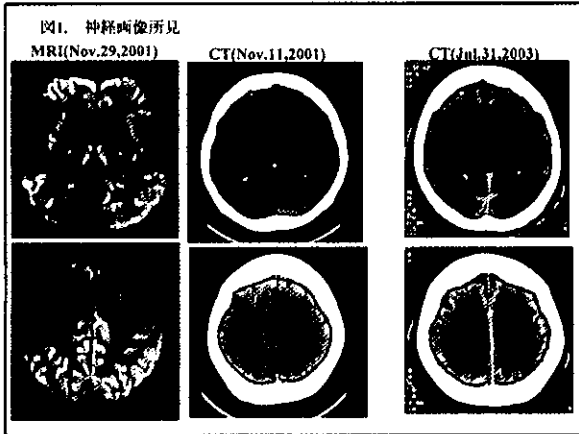
プリオン病の剖検に関しては、臨床側の熱意、病理側の許容、病理評価が確実にできることが前提である。本施設においては、ひとつひとつのステップを総員の同意のもとに進めている。プリオン病剖検率向上のためには、臨床・病理双方の熱意が前提となることを強調したい。

〔参考文献〕

- 1.WHO infection control guidelines CJD autopsy manual(2000)
- 2.CJD surveillance unit,Edinburg;Protocol for neuropathological high risk autopsy(2002)
- 3.High risk autopsy.Neuropathology Techniques,Arnold.London(2003)
- 4.東京都老人医療センター病理部門 剖検業務における感染防止マニュアル(2001)
- 5.厚生労働省遅発性ウイルス感染調査研究班 診療マニュアル(2002)
- 6.厚生労働省科学研究費補助金特別研究事業 クロイツフェルトヤコブ病感染予防ガイドライン(2003)

〔研究発表〕

1. 論文発表
 - 1) 村山繁雄、齊藤祐子：プリオン病の病理概説。最新医学 2003; 58: 973-978
 - 2) 村山繁雄、齊藤祐子：CJD: Diffusion MRI と病理との対比。Clinical Neuroscience 2003; 21: 1332-33
2. 学会発表
 - 1) 三谷和子、山之内博、村山繁雄、石井賢二：Cerutzfeldt-Jakob 病における MRI 拡散強調画像大脳皮質高信号域は海綿状態を反映する。第 43 回日本神経学会総会プログラム抄録集 p267, 2002 年 5 月、札幌



プリオン病の神経病理 — 海馬病変について —

天野 直二 (信州大学医学部精神医学教室)

【研究要旨】

プリオン病は孤発性、家族性、感染性に分類され、孤発性の Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) の神経病理の基本像は、神経網の海綿状変化、神経細胞の変性脱落、星形グリアの反応であり、プリオンの免疫組織による染色性が診断に大きく寄与する。また、家族性のうちで P102L と P105L に代表される Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease (GSS) ではクル斑に似た特異なアミロイド斑が出現する。このような基本的な病理像も脳の部位によってその病変に軽重がみられ、海馬では極めて軽い変性にとどまることが指摘されてきた。従って、この海馬における病変を検討することは、プリオン病における変性の過程、とくに初期的な過程を推測するには適切な検討対象であると考えた。

今回は孤発性 18 例、家族性 8 例、感染性 1 例の剖検例で、海馬を含む切片で神経病理学的に詳細な比較検討を加えた。CJD の基本病変は大脳皮質では高度に進行していても subiculum、cornu Ammonis (CA)、さらに dentate gyrus の神経網は保存されている傾向にあった。神経細胞の脱落は subiculum、CA 4 にみられる症例が多かったが、海馬病変の進行例では CA 1、2、3 にほぼ同程度に及んでいた。異常グリアの反応は神経細胞の変性に比して海馬全体に及ぶ傾向がみられたが、CA 4 では生理的、非特異的な反応であり、海馬構造の一部を占め、殆どが軸索線維によって構成されている stratum radiatum、stratum lacunosum、stratum moleculare、vestigial hippocampal sulcus の層状構造には線維性グリオシスを認めた。また、異常プリオンの沈着も海馬には他の灰白質と同様に多く沈着する傾向にあり、さらに大きな特徴として、その沈着は stratum moleculare を中心に帯状に沈着する症例が多く認められた点である。

プリオン病における海馬病変は他の部位に比較すれば明らかに軽度であるが、プリオンの沈着、異常グリアの反応、そして海綿状変化と進行し、また海馬の中でも部位により病変が多彩であることが強く示唆された。今回は全体に脳病変の進行した例で検討しており、今後においては、プリオンの沈着が早期から脳内でどのように分布するかという経時的な変化と海馬病変の進行との相関を検索することが極めて重要な課題であると考えられた。

Neuropathology of prion diseases – concerning the lesions of hippocampus -

Naoji AMANO

Department of Psychiatry, Shinshu University School of Medicine

ABSTRACT

Prion disease includes sporadic CJD, infectious diseases such as variant CJD and CJD after dura transplantation, and familial inherited diseases. The main histological features of prion disease are spongiform change, marked neuronal loss and astrogliosis. Anti-prion staining reveals synaptic and plaque types of abnormal prion protein deposits. The hippocampal lesions are supposed to be mild in prion disease. It may be possibly proportional to studying the target of the initial changes of prion disease to examine hippocampal lesions precisely.

We examined 18 sporadic cases, 8 familial cases (4 cases of E200K-129M, 1 case of E200K-129M-219V, 2

cases of P102L-129M, 1 case of P105L-129V), and 1 infectious case associated with cadaveric dura mater. In summary, although the main lesions of cerebral cortex were very severe in the points of neuronal loss, astrogliosis and spongiform change, hippocampal lesions were mild. Both of severe and mild lesions were observed in the entorhinal cortex. The subiculum was the following site of lesions, where small spongiform vacuoles appeared, and CA1, CA4, CA2~3 were degenerated in order. There appeared astrogliosis in CA4. Abnormal prion protein was accumulated in hippocampus, especially in stratum moleculare and gray matters of subiculum and CA1~4. There was fibrillary gliosis without spongy state in stratum radiata and stratum lacunosum, and spongiform change was chiefly observed in stratum moleculare.

Abnormal prion protein deposits may trigger severe degeneration in neural nets. On the other hand, astroglial reaction is also diverse. It is very important to clarify the initial process of the degenerated neuropil in hippocampal regions for the study of destructive process in the brains of prion disease.

【はじめに】

プリオン病は Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) に代表され、そのほとんどは孤発性であるが、プリオン蛋白遺伝子 prion protein gene (PRNP) の検索が進んで遺伝レベルでの側面も浮彫りになってきた。昨年度はプリオン病を孤発性、家族性、感染性に分類し、これらの分子生物学的な特徴を踏まえながら脳内病変を神経病理学的に比較検討した。その中で海馬は病変を免れるか、軽微であることが示された。この点はすでに周知の事実であるが、海馬病変を検討した研究が意外に少ないのが現状である。同一標本内においては病変の強弱は明らかに認められるが、この点をもって海馬病変が初期病変に匹敵すると明言はできないが、病変の進行する過程を研究するには絶好の部位であると考えている。海馬がどのように障害され、CJD の基本病変がどのように組み合わされているかを検討することは、プリオン病における神経網の破壊過程を整理するには重要な判断材料となりうる。

【目的】

プリオン病の多彩な病理所見について、とくに病変の程度が軽いと判断される海馬で、破壊されていく過程を、神経細胞の脱落、異常グリアの増殖、海綿状変化をターゲットに比較検討することが目的である。また、その変性過程に異常プリオン蛋白の蓄積がどのように関連しているかが二番目の目的である。これらを正確に把握することは、プリオン病の発症機序を研究する上では必須である。また、病変の起きにくい部位、初期病変などの検討は、プリオン病の進行防止、治療方法の獲得に貢献するものと考えられる。

【材料と方法】

今までに剖検され蓄積されてきた症例である。孤発性 18 例、家族性は E200K-129M 4 例、E200K-129M-219M 1 例、P102L-129M 2 例、P105L-129V 1 例、感染性である硬膜移植に関連した 1 例、計 27 例の海馬について、ヘマトキシリン・エオジン染色、ホルツァー染色、ルクソール・ファースト・ブルー染色、ポディアン染色、抗プリオン抗体染色等を実施し、鏡検した結果を定性的に判定し、その特徴を評価した。

（倫理面への配慮）

過去に剖検された症例の検討が主な研究過程であるが、医倫理委員会を通して研究の妥当性を検討する。さらに新しい剖検についてはこの研究の趣旨を家族に説明し、同意を得ることとする。さらに個人の情報は表に出ることがないように十分に配慮し、その個人及び関連する人に弊害が及ばないように万全を期することとする。

【結果】

(1) 大脳皮質で高度な病変がみられる症例でも、海馬病変は比較的軽微である症例が殆どである。

- (2)基本病変では、entorhinal cortex においては高度から軽微な病変に移行する部位が歴然としている症例が多い。
- (3)Subiculum では海綿状の変化が軽微にみられる例があり、その病変は CA 1、CA 2 に及ぶ場合がある。
- (4)異常グリアの反応は海馬全体にみられる傾向にあるが、CA 4 や、軸索が多く層状構造を成している stratum radiata から stratum moleculare には線維性グリオシスをみる。
- (5)症例によっては stratum moleculare に海綿状変化を認める。
- (6)異常プリオンは海馬全体に沈着する傾向にあるが、とくに stratum moleculare、あるいは CA 1～4 や subiculum 等の灰白質に沈着しやすい。
- (7)プリオンの斑状の蓄積の場合も stratum moleculare、あるいは CA 1～4 や subiculum 等の灰白質に多く沈着する。

【考察】

プリオン病の海馬病変が比較的軽いのは今までにもよく知られた事実であるが、その病変の質、程度においては多彩な変化が認められた。プリオンの沈着と神経網の変性とは極めてパラレルな現象であることは推測できるが、海馬のように神経細胞、樹状突起、軸索の入り組んでいる組織障害の病態を検討することは、その発症機序を検討する上で極めて有用である。また、今回のように神経細胞の変性、神経網の海綿状変化、異常グリアの反応がそれぞれ独立して存在する部位が観察されたことから、それぞれの病変の意義を継続的に詳細に検討することは重要な課題である。

【結論】

プリオン病の海馬病変は軽微であり、海馬の部位によって病変の質が異なるという特徴が観察された。また、プリオンの蓄積にも一つの類似傾向がみられ、CA 1～4 と subiculum の灰白質は勿論のこと、stratum moleculare にも共通して多く貯まる傾向にあることが分かった。海馬病変の検討は、プリオン病の発症機序の解明に大きく寄与すると考えられる。

【参考文献】

- 1) Mizusawa H. et al.: Involvement of hippocampus in Creutzfeldt-Jakob disease. J Neurol Sci. 82:13-26, 1987
- 2) Masullo C. et al. Resistance of the hippocampus in Creutzfeldt-Jacob disease. Clin Neuropathol. 16:37-44, 1997
- 3) Kaneko M et al.: Parahippocampal pathology in Creutzfeldt-Jacob disease. Clin Neuropathol. 18:9-16, 1999, 2001
- 4) 田丸恒実、天野直二：プリオン病の神経病理－硬膜移植後 CJD、変異型 CJD を含めて－. 神経進歩. 47: 91-99, 2003

【研究発表】

1.論文発表

- 1) 田丸恒実、天野直二：プリオン病の神経病理－硬膜移植後 CJD、変異型 CJD を含めて－. 神経進歩. 47: 91-99, 2003

尿中プリオン蛋白検出によるプリオン病診断の問題点

班 員： 古川 ひさ子（長崎大学・大学院医・神経感覚薬理学）
研究協力者： 堂浦 克美（東北大学・大学院・プリオン蛋白分子解析分野）
奥脇 龍、片峰 茂（長崎大学・大学院医・感染分子解析学）
調 漸（長崎大学大学院・医歯薬学総合・神経病態制御）
山本 一男（長崎大学・大学院医・感染防御因子解析学）
鶴殿 平一郎（理化学研究所・免疫シャペロン分子機能研究チーム）
伊藤 敬（長崎大学・大学院医・生化学）
丹羽 正美（長崎大学・大学院医・神経感覚薬理学）

【研究要旨】

プリオン病の確定診断には異常型プリオン蛋白(PrP^{Sc})の存在を証明することが必須とされている。このため、生前早期に確定診断をするための検査方法開発が急がれている。我々は尿中プロテアーゼ抵抗性プリオン蛋白検出の診断的有用性、信頼性についてウエスタン・ブロット法、質量分析、およびアミノ酸配列解析法を用いて詳細に検討した。Shakedらが報告した32kDaのシグナル(U PrP^{Sc})は検出されず、37kDaのプロテナーゼ K(PK)抵抗性蛋白シグナルが多くのプリオン病患者尿から検出された。このシグナルは4種類の異なる抗プリオン特異抗体によるウエスタン・ブロット法で検出されたが2次抗体のみでも検出され、非特異的な反応と判断された。質量分析およびN末端アミノ酸配列解析の結果、この37kDaのシグナルはEnterobacteriaの細胞外膜蛋白(OMP)であることがわかった。プリオン蛋白を含めてヒト由来の蛋白は検出されなかった。実験的に肺炎桿菌から抽出したOMPはPK抵抗性を示し、複数種類の2次抗体と反応して約37kDaのシグナルを生じることから、ウエスタン・ブロットなどの免疫学的手法でプリオン蛋白と誤認される可能性が示された。またSPF条件で感染マウス尿からのUPrP $^{\text{Sc}}$ 検出を試みたところ、やはり緑膿菌由来のOMPがヒト同様に検出された。UPrP $^{\text{Sc}}$ 検出による診断には尿路感染による細菌性蛋白の混入が大きく影響するため、検出方法の改善が必要であると考えられた。

A pitfall in diagnosis of human prion diseases using detection of protease-resistant prion protein in urine

Hisako FURUKAWA¹, Katsumi DOH-URA², Ryo OKUWAKI³, Susumu SHIRABE⁴, Kazuo YAMAMOTO⁵,
Heiichiro UDONO⁶, Takashi ITO⁷, Shigeru KATAMINE³, Masami NIWA¹

¹Department of Pharmacology 1, ³Department of Molecular Microbiology and Immunology, Institute of Atomic Bomb Disease, ⁴The First Department of Internal Medicine, ⁵Division of Cytokine Signaling, Department of Molecular Microbiology and Immunology, ⁷Department of Biochemistry,
Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences.

²Department of Prion Research, Tohoku University Graduate School of Medicine.

⁶Laboratory for Immunochaperones, Research Center for Allergy and Immunology,
RIKEN Yokohama Institute.

Abstract

Since a definite diagnosis of prion diseases relies on the detection of abnormal isoform of prion protein (PrP^{Sc}), it has been urgently necessary to establish a non-invasive diagnostic test to detect PrP^{Sc} in human prion diseases. To

evaluate diagnostic usefulness and reliability of the detection of protease-resistant prion protein in urine, we extensively analyzed proteinase K (PK)-resistant protein in patients affected with prion diseases and the control subjects by Western blot, a coupled liquid chromatography and mass spectrometry analysis, and N-terminal sequence analysis. The PK-resistant signal migrating around 32 kDa previously reported by Shaked et al. was not observed in this study. Instead, discrete protein bands with an apparent molecular mass of approximately 37 kDa were detected in the urine of many patients affected with prion diseases and two diseased controls. Although these proteins also gave strong signals in the Western blot using a variety of anti-PrP antibodies as a primary antibody, we found that the signals were still detectable by the incubation of secondary antibodies alone. Mass spectrometry and N-terminal protein sequencing analysis revealed that majority of the PK-resistant 37 kDa proteins in patients urine were outer membrane proteins (OMPs) of *Enterobacterial* species. OMPs isolated from these bacteria were resistant to PK and the PK-resistant OMPs from *Enterobacterial* species migrated around 37 kDa on SDS-PAGE. Furthermore, non-specific binding of OMPs to antibodies could be mistaken for PrP^{Sc}. We also found that PK-resistant 25-kDa protein isolated from infected mice was composed of OMP of *Pseudomonas aeruginosa*. These findings caution that bacterial contamination can affect the immunological detection of prion protein. Therefore, the presence of *Enterobacterial* species should be excluded in the immunological tests for PrP^{Sc} in clinical samples, in particular, urine.

[はじめに]

プリオン病治療薬剤の開発と臨床応用が進められる中、プリオン病早期確定診断のための検査技術の開発が急がれている。我々は Shaked らにより報告された尿中プロテアーゼ抵抗性プリオン蛋白(UPrP^{Sc})に着目し、昨年度までに①プリオン病患者尿から約 37kDa の UPrP^{Sc}が高頻度に検出される②不明の痴呆症例でも検出される③プリオン病の疾患重症度との相関はないことを報告した。本年度は UPrP^{Sc}の特異性についてさらに詳しく検討した。

[目的]

プリオン病診断のためのバイオマーカー開発を目的とする。

[材料と方法]

研究の対象

国内複数施設から集められた 54 例の患者尿を用いた。対照は 66 例とした。(表 1)

尿中プロテアーゼ抵抗性蛋白解析

1) Western blot

早朝尿または随時尿 (4℃ 保存) より遠心分離操作で細胞成分を除去し、生理食塩水で透析を行った。得られた尿 15 ml を超遠心分離(100,000 x g, 4℃ 1 時間)して沈殿した蛋白を 0.5% NP-40, 0.5% DOC を含む PBS 30 μl で溶解し Proteinase K で処理(40 μg/ml, 37℃, 1 時間)したのちに SDS-PAGE, Western blot で解析した。1 次抗体には 3F4 (Signet), 6H4 (Prionics), 3o8(Cayman), PrP2B(堂浦克美教授より提供)、2 次抗体には Chemicon, Promega, Lockland 各社の抗マウス IgG 抗体、Chemicon 社の抗ウサギ IgG 抗体を用いた。

2) coupled liquid chromatography and mass spectrometry (LC/MS)

上記のようにして得た PK 抵抗性蛋白を SDS ポリアクリルアミドゲルから切り出し、ゲル内でトリプシン消化したペプチド混合物を 50% アセトニトリル/50% トリフルオロ酢酸で抽出し LC/MS で測定した。得られた質量データを SwissProt data base を用いて検索した。散发性 CJD3 例について行った。

3) N-terminal protein sequencing

上記のようにして得た PK 抵抗性蛋白を SDS-PAGE で展開し PVDF membrane に blot したのち目的のバンドを切り出し、N 末端アミノ酸配列解析 (13~23 サイクル) を行った。得られた配列データを SwissProt

data base で検索した。

細菌外膜蛋白(outer membrane proteins: OMPs)の生化学的・免疫学的性質の検討

Klebsiella pneumoniae, *Salmonella typhi* を SuperBroth 培地で培養し集菌した後、バッファーに懸濁し sonication によって破碎した。バッファーに界面活性剤を添加し超遠心分離を繰り返して不溶性の OMP を分離した。尿蛋白と同条件で PK 処理を行い、SDS-PAGE で展開し CBB 染色した。また一部のゲルは PVDF membrane に blot して、抗マウス IgG 抗体(F(ab)' fragment にしたもの)を probe として反応させた。

感染マウス尿の検討

4 週齢 ddY マウスに福岡 1 株感染マウス脳乳剤(2% in PBS, 20 μ L)を脳内接種し、接種後 11 週目からメタボリックケージ内で毎週尿を回収した。PK 抵抗性尿蛋白は前述の方法で抽出した。Western blot および N-terminal protein sequencing を行った。

(倫理面への配慮)

患者からの検体提供にあたっては、研究の内容・検体の保管・検査データの取り扱いについての十分な説明を患者本人あるいは家族に行い、同意を得た。動物実験は長崎大学動物実験委員会の指針の範囲内において行った。

【結果】

抗プリオン蛋白抗体を用いた Western blot にて約 37 kDa の強い PK 抵抗性シグナルが検出されたが(図 1 左パネル)、Shaked らが報告したような 32 kDa のシグナルは認められなかった。表 1 に示すように、プリオン病患者の 70.4% (38/54)、対照群の 3% (2/66)で 37 kDa の PK 抵抗性蛋白が検出された。しかしこのシグナルは 2 次抗体に非特異的に反応し、プリオン蛋白に特異的ではないと考えられた(図 1 右パネル)。このシグナル部分を精製して LC/MS で測定したところ、ヒト由来の蛋白は検出されず *Enterobacterial species* の OMP が有意に検出された。この結果は N 末端アミノ酸配列解析においても確認された。

Klebsiella pneumoniae, *Salmonella typhi* から得られた OMP は、PK 処理に抵抗性を示し、SDS-PAGE では 37 kDa 付近にメインバンドを認めた(図 2 A)。また、OMP は各種の 2 次抗体と強く反応し、F(ab)' fragment とも反応することが明らかになった(図 2 B)。

感染マウスでは 25 kDa の PK 抵抗性蛋白が検出された(図 3)が、ヒトと同様に 2 次抗体にも非特異的に反応した。N 末端アミノ酸配列解析により、この蛋白は *Pseudomonas aeruginosa* 由来の OMP であることが明らかになった。

【考察】

プリオン病症例では対照群に比べ高頻度に尿中 PK 抵抗性蛋白が検出され、診断マーカーとしての有用性が期待された。しかし症例を重ねて検討を進めたところ、我々が検出してきたシグナルはプリオン蛋白ではない可能性が高くなった。LC/MS での測定および N 末端アミノ酸配列解析の結果、本研究で観察された 37 kDa の PK 抵抗性蛋白はグラム陰性桿菌、特に尿路感染の起炎菌として一般的な *Enterobacterial species* の外膜蛋白 (OMP) であることが確認された。OMP は β -sheet 構造に富み、トリプシン抵抗性であることが知られている。今回我々は OMP が *in vitro* において PK 抵抗性かつ免疫グロブリンと非特異的に反応することを確認した。これらの性質のため、Western blot など抗体を用いた検出方法では OMP がプロテアーゼ抵抗性プリオン蛋白と誤認されやすいと考えられた。

尿路感染は頻度の高い院内感染であり、特に尿路カテーテルを用いている症例では無症候性感染を伴いやすいことが知られている。プリオン病患者の多くが検査の時点で既に症状が進行し、何らかの尿路管理を受けていることがプリオン病での高頻度な検出結果の一因となったと考えられた。

【結論】

今回の結果は Shaked らが報告した UP Pr^{Sc} の存在を否定するものではないが、尿を検査材料とする場合には細菌由来蛋白の影響を常に考慮する必要があることを強く示唆するものであった。また、SPF 管理下

で行われたマウス感染実験においても尿から OMP が検出されたことは、今後の感染実験結果判定をさらに慎重に行う必要を示唆すると思われる。

[参考文献]

- 1) Shaked GM, Shaked Y, Kariv-Inbal Z, Halimi M, Avraham I, and Gabizon R.: A protease-resistant prion protein isoform is present in urine of animals and humans affected with prion diseases. *J Biol Chem.* 276:31479-82, 2001
- 2) Hernandez-Alles S, Alberti S, Alvarez D, Domenech-Sanchez A, Martinez-Martinez L, Gill J, Tomas JM, and Benedi VJ. : Porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiol* 145:673-9, 1999
- 3) Furukawa H, Doh-ura K, Okuwaki R et al. A pitfall in diagnosis of human prion diseases using detection of protease-resistant prion protein in urine.: Contamination with bacterial outer membrane protein., in submission.

[研究発表]

1.論文発表

- 1) Yamamoto S, Furukawa H, Kitamoto T et al. : An atypical form of sporadic panencephalopathic Creutzfeldt-Jakob disease in Japan.*Neuropathol Appl Neurobiol.* 29:77-80, 2003
- 2) Furukawa H, Doh-ura K, Okuwaki R et al. : A pitfall in diagnosis of human prion diseases using detection of protease-resistant prion protein in urine.: Contamination with bacterial outer membrane protein., in submission.
- 3) 古川ひさ子、丹羽 正美: プリオン病の早期診断-臨床症候と検査所見- 最新医学 58:1035-1040, 2003
- 4) 古川ひさ子: プリオン病早期診断方法開発の展望. 獣医畜産新報 56:361-365, 2003

2.学会発表

- 1) 古川ひさ子 他 Prospects of the development of *in vivo* test for prion diseases. 第76回薬理学会総会シンポジウム 2003年3月 福岡国際センター
- 2) 古川ひさ子 他「尿中プリオン蛋白解析によるヒト・プリオン病早期診断の試み」第44回日本神経学会総会 2003年5月 横浜パシフィコ
- 3) 古川ひさ子 他「プリオン病早期診断における尿中プロテアーゼ抵抗性蛋白解析の有用性に関する検討」第22回日本痴呆学会学術研究会 2003年10月 大田区産業文化センター
- 4) Hisako Furukawa et al. Diagnostic usefulness of urine protein analysis in prion diseases. XVth International conference of Neuropathology, September, 2003 in Torino, Italy

[知的所有権の取得状況]

なし

表 1. 尿中 PK 抵抗性プリオン蛋白(37kDa)を基準とした検査結果

臨床診断	陽性例 / 検査症例	陽性率 (%)
散発性 CJD	30 / 45	66.7
硬膜移植関連 CJD	4 / 4	100
家族性 CJD (E200K)	2 / 2	100
GSS (P102L)	2 / 3	66.7

	38 / 54	70.4

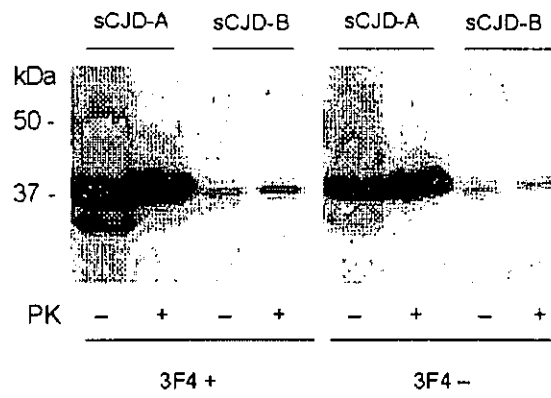
アルツハイマー病	0 / 19	0
脳血管性痴呆	0 / 1	0
非痴呆性疾患	2* / 23	8.7
正常対照	0 / 23	0

	2 / 66	3.0

本検査のプリオン病における感度=70.4%, 特異度=97.0%		

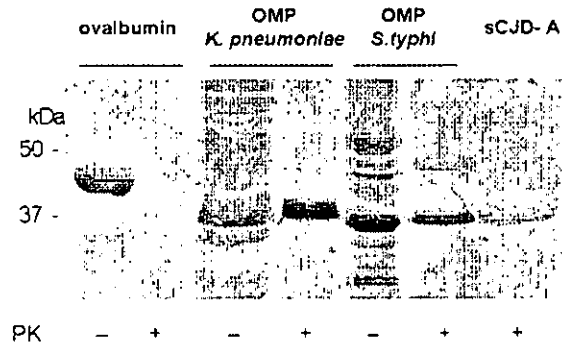
*神経因性膀胱を合併した多発性硬化症 および NIDDM に脳梗塞を合併した症例

図 1



各レーンには尿 15ml より抽出した蛋白 ; PK 処理前(-)、処理後 (+) をのせている。
membrane は複数用意し、1 次抗体(3F4)と反応させたもの (左) と 1 次抗体を省き 2 次抗体で
反応させたもの (右) を示す。いずれにおいても 37 kDa 付近に明らかなシグナルを認める。

図 2-A



培養した *K.pneumoniae*, *S.typhi*より OMP を抽出し、PK 処理(+)した。コントロールとして ovalbumin, 散発性 CJD 症例尿蛋白を PK で消化した。OMPs は PK 抵抗性であり、SDS-PAGE において患者尿の PK 抵抗性蛋白とほぼ同様の位置に migrate することが示された。

☒ 2-B

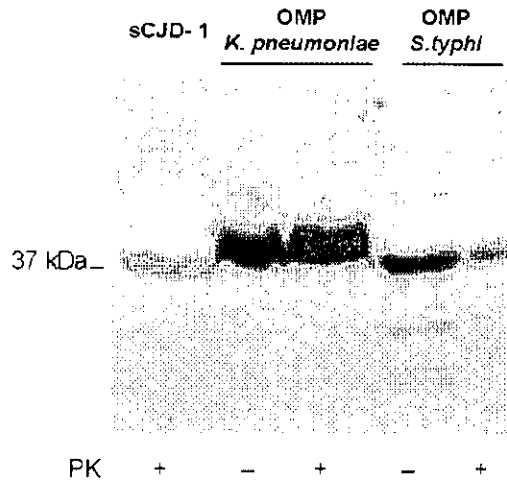
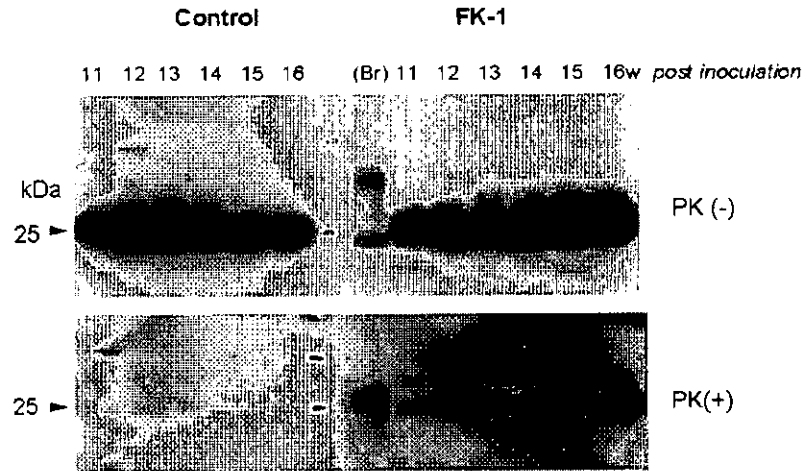


図 2 A と同様にして得たゲルの 1 部を PVDF membrane に転写し、ブロッキング後抗マウス IgG 抗体 (F(ab)2 fragment にしたもの) と反応させたところ、やはり 37kDa のシグナルが見られた。OMP は protein A と免疫グロブリンとの反応 (Fc 部分と結合する) とは異なる様式で免疫グロブリンと反応することが示された。

図 3



福岡 1 株を脳内接種したマウス尿を症状が出現する 11 週目より毎週採取し、PK 抵抗性尿蛋白を検出した。PK 処理前は対照マウス、感染マウスともに 25kDa 付近に SAF32 抗体と強く反応するシグナルが出現しているが、感染マウスではこの蛋白がより強い PK 抵抗性を示した。

硬膜移植後 CJD: 移植部位から進展した初発症状と DWI 異常像

研究協力者:佐藤 猛(東大和病院神経内科)

研究協力者:小林佐千夫(東大和病院神経内科)

研究協力者:増田眞之(東京医大第三内科)

〔研究要旨〕

硬膜移植後 CJD の患者では移植部位に関連した症状で発症する患者の存在が指摘されているが、明確な関連性は不明であった。われわれは硬膜移植部位から DWI の異常所見が始まった CJD 例を経験した。この症例を契機として移植部位と初発症状との関連性を明らかにするため、従来の硬膜 CJD 症例 107 例についてカルテ、手術記録等の全記録の再調査を開始した。硬膜移植部位を小脳天幕上群(47 例)と天幕下群(60 例)とに分けて検討中であるが、天幕上群では移植部位を反映した反対側の片麻痺や同名半盲で初発したものが 11 例(22.4%)みられたのに、天幕下群では 0 であった。逆に脳幹症状で初発したものは天幕下群では 19 例(31.7%)、天幕上群では 2 例(4.3%)($P=0.004$)であった。硬膜 CJD では移植部位と初発症状との間に関連を示す症例が存在することを明らかにした。

Relationship between sites of dura mater grafts and clinical features
in Creutzfeldt-Jakob disease.

¹Takeshi SATO, ¹Sachio KOBAYASHI and ²Masayuki MASUDA

¹Department of Neurology, Higashiyamato Hospital, Tokyo, ²Department of 3rd Internal
Medicine, Tokyo University School of Medicine, Tokyo

ABSTRACT

We report a patient who received a dura mater graft and in whom the initial abnormal signals developed in the cerebrum in the region surrounding the graft site, as demonstrated in magnetic resonance diffusion-weighted images (DWI). Based on the evidence of this patient, we conducted a retrospective re-appraisal review of the full medical records of 107 dura-related CJD (dCJD) patients. The patients were divided into two groups depend the site of neurosurgical or orthopedic procedures (supratentorium or infratentorium cerebelli).

In initial manifestations, cases with grafts at the supratentorium developed hemiparesis/ hemianopsia in 11/47 (23.4%) and brain stem symptoms in 2/47 (4.3%), whereas cases in the infratentorium developed 0/60 (0%) and 19/60 (31.7%), respectively ($p=0.004$). In conclusion, we clarified the initial symptoms are correlate to the site of graft.

〔はじめに〕

硬膜移植後に発症した CJD 患者では移植部位と初発症状との相関については、われわれの初期の調査報告では天幕下移植例に小脳失調が多いと記載した。しかし、その後、硬膜例が増加するに従って、移植部位との関連はむしろ不明とされていた。しかし、最近、硬膜 CJD の1例を発症初期から診察する機会に恵まれ、初発症状とDWIでの異常信号が移植部位の近傍から始まることを観察することが出来た。この症例を契機として移植部位と初発症状との関連性を明らかにするため、硬膜 CJD 107 例の全臨床記録の再調査した。

〔目的〕

硬膜 CJD 患者において硬膜移植部位と初発症状との間に関連があることを明らかにすることを目的とした。

〔方法〕

硬膜 CJD の症例は全国調査、および CJD サーベイランス委員会で把握した症例 107 例を対象とした。発症の時期は 1978 年から 2003 年 9 月にわたっている。直接、患者を診察