

be useful as 2nd screening to discriminate CJD from other neurodegenerative disease.

【はじめに】

プリオン病の治療法の臨床治験及び新規薬剤の開発が急速に進行しつつあり、プリオン病の早期診断法の確立が一層重要性を増しており、診断のためのより特異的なマーカーの検索が求められている。(1)

【目的】

1996年に Hsich G らは CJD 患者における脳脊髄液中の 14-3-3 蛋白を診断マーカーとして報告したが(2)、近年更に Otto らは 14-3-3 protein 陰性の CJD 患者における脳脊髄液中の t-tau 蛋白の意義を報告している。(3)(4)

我々は CJD 患者髄液中の 14-3-3 蛋白、Tau 蛋白(定量)とリン酸化 Tau 蛋白(定量)の測定を行ない、診断的意義を検討した。

【材料と方法】

1)対象

対象は CJD 患者 15 例と神経変性疾患を中心とした non-CJD 患者 87 例とした。(表 1)

2)方法

a) 対照群 (N=87)と CJD 患者(N=15)の脳脊髄液 14-3-3 蛋白(14-3-3-β 定性) (Santuz Cruz 及び IBL) 抗体を用いて検討を行った。

b) 対照群 (N=87)と CJD 患者(N=15)において脳脊髄液中の Tau 蛋白定量(Innogenetics 社)とリン酸化 Tau(P-Tau) 蛋白定量(Innogenetics 社)による比較検討を行った。

(倫理面への配慮)

患者からの検体の提供にあたり、患者及び患者家族に研究の内容・意義・検査結果のデータの公表など多岐にわたり、informed consent を行い、同意を得た。

【結果】

1) CSF 中の 14-3-3 蛋白の検出

脳脊髄液中 14-3-3 蛋白(定性)では対照群 87 例中で 2 症例陽性、CJD 患者では全例陽性。(図 1)

2) CSF 中の t-tau 蛋白の定量

脳脊髄液中 t-tau 蛋白(定量)では感度(1300pg/ml)以上を cut off 値とすると、CJD 患者では全症例で陽性あり、対照群ではわずか 3 例で陽性だった。(図 2)

3) CSF 中の p-tau 蛋白の定量

脳脊髄液中 P-Tau 蛋白(定量)を行なったところ CJD 患者の P-Tau 蛋白は AD 患者と比較して有意に低いでは現在までの報告は異なっていた。(p<0.1)5(図 3)

4) CSF 中の P-Tau/Tau 比

P-Tau/Tau 比を検討したところ Tau 高値例の AD 患者群と Tau 高値例の CJD 患者群との比較検討では、CJD 群が有意に P-Tau/Tau 比が低値であった。(図 4)

【考察】

1) CSF 中の 14-3-3 蛋白、t-tau 蛋白、p-tau 蛋白について

CSF 中の 14-3-3 蛋白の検出は特異性及び感受性の点において高い。T-tau 蛋白は 14-3-3 蛋白陰性例の患者において診断意義が高いという現在までの報告の様に、我々の検討においても T-tau 蛋白は優位に高く、診

断マーカーとして利用できるであろう。

2) P-Tau/Tau 比を比較すると CJD 群で有意に低く ($p < 0.001$)、AD との鑑別の指標となり得ると思われる。

【結論】

CJD 患者脊髄液中の 14-3-3 蛋白の定性と Tau 蛋白(定量)の 2 つ診断のマーカーの利用は CJD 患者の有用であると考えられ、14-3-3 蛋白陽性と t-tau 蛋白 ($>1300\text{pg/ml}$) の ATD 患者では p-tau/t-tau の比が鑑別に有効である。

【参考文献】

1. Demerol P, Heiner L, Robberecht W, Sciot R, Wilms G. *Neurology*. 1999 Jan 1; 52 (1):205-8. Diffusion-weighted MRI in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease.
2. Hsich G, Kenney K, Gibbs CJ, Lee KH, Harrington MG. *N Engl J Med*. 1996 Sep 26; 335(13):924-30. The 14-3-3 brain protein in cerebrospinal fluid as a marker for transmissible spongiform encephalopathies
3. Otto M, Wiltfang J, Tumani H, Zerr I, Lantsch M, Kornhuber J, Weber T, Kretzschmar HA, Poser S *Neurosci Lett*. 1997 Apr 11;225(3):210-2. Elevated levels of tau-protein in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease.
4. Otto M, Wiltfang J, Cepek L, Neumann M, Mollenhauer B, Steinacker P, Ciesieleczyk B, Schulz-Schaeffer W, Kretzschmar HA, Poser S. 2002 *Neurology*. Jan 22; 58(2):192-7 Tau protein and 14-3-3 protein in the differential diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease.
5. Van Everbroeck B, Green AJ, Vanmechelen E, Vanderstichele H, Pals P, Sanchez-Valle R, Corrales NC, Martin JJ, Cras P.J *Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2002 Jul;73(1):79-81. Phosphorylated tau in cerebrospinal fluid as a marker for Creutzfeldt-Jakob disease.

【研究発表】

1. 論文発表

1. Satoh K, Muramoto T, Tanaka T, Kitamoto N, Ironside JW, Nagashima K, Yamada M, Sato T, Mohri S, Kitamoto T. Association of an 11-12 kDa protease-resistant prion protein fragment with subtypes of dura graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease and other prion diseases. *J Gen Virol*. 2003 Oct;84(Pt 10):2885-93
2. 佐藤克也. 調 漸. 片峰茂. 医原性クロイツフェルト・ヤコブ病. *日本臨床*. 2003 in press
3. 佐藤克也. 調 漸. クロイツフェルト・ヤコブ病の治療法開発, 神経難病に対する治療の試み. *Bio Clinical*. 18: 1074-1080, 2003

2. 学会発表

- 1) KEYSTONE SYMPOSIA (Byron C, Charles W, Suzette P and Bruce. Breckenndge Colorado U S A. Apr 2-6 2003)
Satoh K, Shirabe S, Hamasaki S, Nishiura Y, Tsujino A, Nakamura T, Yoshimura T, and Eguchi K, Iwaki T:
Discordant outcome of neurological and neuro-pathological phenotypes in familial cases of GSS with P102L mutation.
- 2) 第 44 回日本神経学会総会 (篠原幸人. パシフィコ横浜. H15. 5 月 15 日-17 日)
調 漸. 佐藤克也. 辻野彰. 西浦義博. 江口勝美. 片峰茂. 中村龍文. 丹羽正美: クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) におけるベントサン・キナクリンによる治療の効果
- 3) 第 44 回日本神経学会総会 (篠原幸人. パシフィコ横浜. H15. 5 月 15 日-17 日)
佐藤克也. 調 漸. 西浦義博. 辻野彰. 中村龍文. 松尾秀徳. 辻畑光宏. 江口勝美: クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) 患者における髄液中の 14-3-3 蛋白と Tau 蛋白の有用性

4) INTERNATIONAL PRION CONFERENCE (München Germany October 8-10 2003)

Satoh K. Shirabe S. Tsujino A. Nishiura Y. Eguchi K. Satoh A. Tsujihata M. Matsuo H: Role of phosphorylated tau/total tau ratio, 14-3-3 protein in CSF and diffusion weighted MRI in diagnosis of Creutzfeldt-Jacob disease

5) 第 164 回日本神経学会九州地方会 (辻貞俊, 産業科学大学 マツイーニ・ホール, H15.12 月 13 日)

江口博人, 佐藤克也, 辻野彰, 岩永洋, 白石裕一, 福島直美, 西浦義博, 本村政勝, 調 漸, 中村龍文, 吉村俊朗, 江口勝美, 井手芳彦: 早期に診断し経過観察できたハイデンハイン型クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) の一例

【知的財産所有権の取得状況】

なし

表 1.

CJD patients (N=15)

- definite case 6 case
- probable case 9 case

All cases of CJD were classified by Master's criteria.

Non-CJD patients (N=86)

- Alzheimer-type dementia (ATD) 57 case
- cerebrovascular disorder (CVD) 7 case
- Pick disease 2 case
- Parkinson disease 5 case
- corticobasal degeneration (CBD) 2 case
- Huntington's disease 1 case
- frontotemporal dementia (FTD) 1 case
- progressive supranuclear palsy (PSP) 3 case
- ALS 3 case
- dementia, etiology unknown 2 case
- mild cognitive impairment (MCI) 3 case

表 2

diagnosis	number of patients	positive 14-3-3 protein	t-tau protein, median (pg/ml)	p-tau protein, median (pg/ml)	the ratio of p-tau protein/t-tau protein (10^{-2})
CJD	15	15/15	7174	36.38	0.5071
ATD	54	2/54	387.4	55.17	18.36
CVD	7	0/7	657.9	63.11	9.593
Parkinson disease	5	0/5	198.7	34	17.11
ALS	3	0/3	514.9	19.53	3.792
PSP	3	0/3	297.9	59.67	20.03
CBD	2	0/2	266.4	34.96	13.12
MCI	2	0/2	380.7	58.08	15.26
Pick disease	2	0/2	267	35.3	13.22
Huntington's disease	1	0/1	157	21.47	13.68
FTD	1	0/1	370	69.44	18.77
Hysteria	2	0/2	111	24.61	22.17
dementia, etiology unknown	2	0/2	200.5	52.27	26.07
normal control	3	0/3	75.81	22.45	29.61

患者における14-3-3蛋白の定性

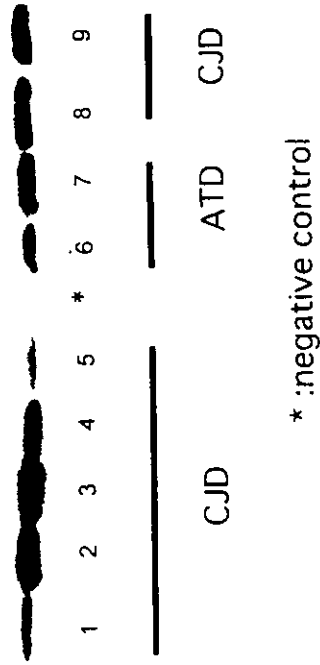


図 1

CJDとその他神経疾患における脳脊髄液のTau蛋白濃度

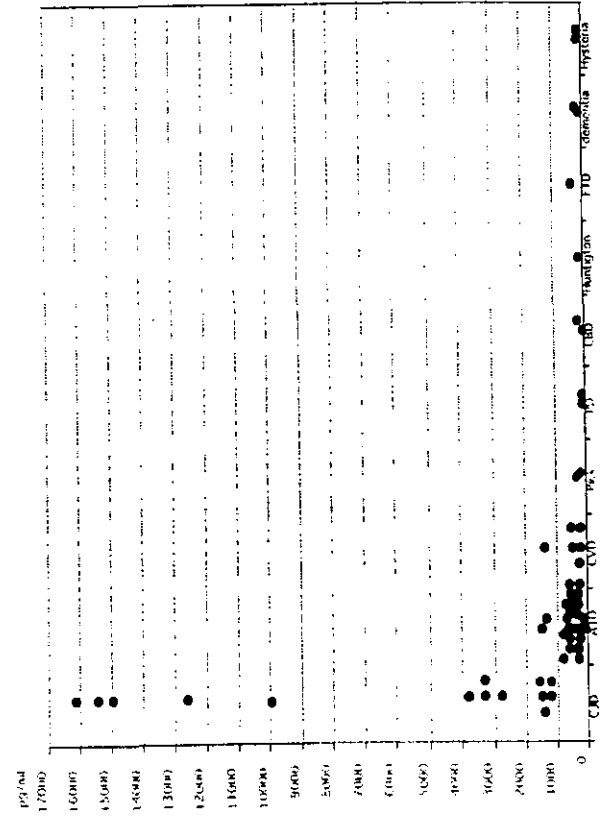


図 2

CJDとその他神経疾患における脳脊髄液のP-Tau蛋白濃度

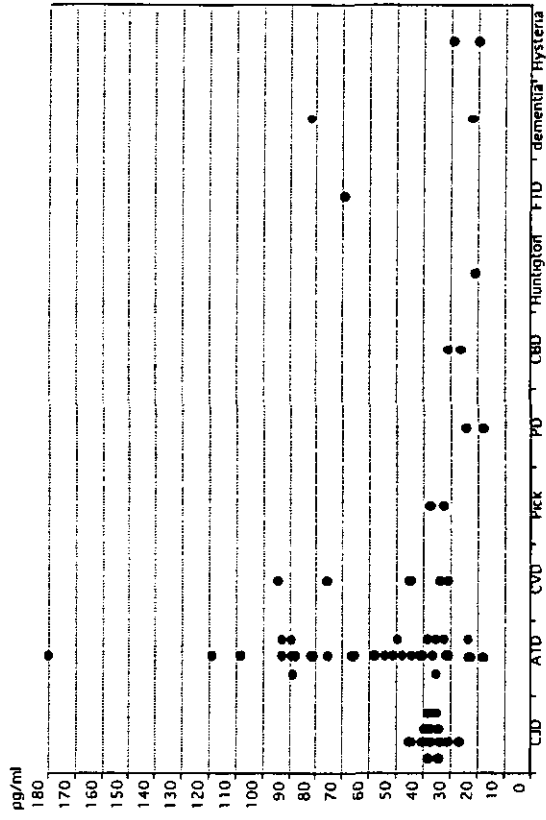


図 3

CJDとATDにおけるP-Tau/Tauの比較検討

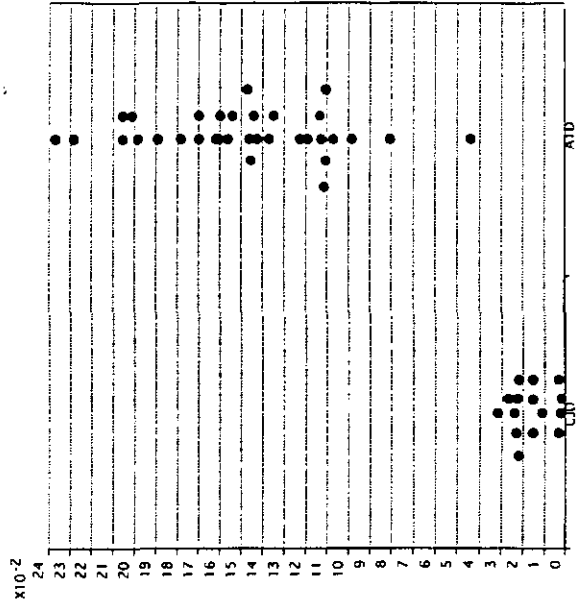


図 4

日本のクロイツフェルト・ヤコブ病の診断における脳波、脳MRI、14-3-3 蛋白の意義

研究協力者：袖山信幸(東京医科歯科大大学院脳神経機能病態学)
班 長：水澤英洋(東京医科歯科大大学院脳神経機能病態学)
班 員：山田正仁(金沢大大学院脳老化・神経病態学)
研究協力者：佐藤猛(東大和病院神経内科)
研究協力者：北本哲之(東北大大学院病態神経学)
班 員：中村好一(自治医科大疫学・地域保健部門)
研究協力者：黒岩義之(横浜市立大神経内科)
研究協力者：森若文雄(北海道医療大学心理学部言語聴覚療法学科)
研究協力者：志賀裕正(東北大神経内科)
研究協力者：武田雅俊(大阪大大学院神経機能医学)
研究協力者：西澤正豊(新潟大脳研究所神経内科)
研究協力者：葛原茂樹(三重大神経内科)
研究協力者：黒田重利(岡山大大学院精神神経病態学)
研究協力者：村井弘之(九州大大学院脳神経病研究施設神経内科)
研究協力者：村山繁雄(東京都老人総合研究所神経病理部門)
研究協力者：立石潤(老人保健施設春風)
班 員：堂浦克美(東北大学大学院プリオン蛋白分子解析分野)

【研究要旨】

日本のサーベイランス調査での脳波(EEG)上の周期性同期性放電、脳MRI、脳脊髄液中の14-3-3蛋白のク
ロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)の診断における意義と、診断基準に脳MRIまたは14-3-3蛋白を導入する妥
当性について検討した。3検査のdefinite群における感度は71%から75%で類似していたが、全例群での施行
率はEEG:99%、脳MRI:76%、14-3-3蛋白:36%と大きく異なっていた。Probableの診断基準に脳MRIか14-3-3
蛋白を採用した場合、definite群で生前にprobableと診断される比率は脳MRIの場合90%、14-3-3蛋白の場合
88%でほぼ同じであったが、possible群の症例のうち診断基準の変更によりprobableと診断される比率は脳
MRIは49%、14-3-3蛋白は28%と脳MRIの方が影響が大きかった。文献的には14-3-3蛋白はCJD診断におけ
る感度・特異度はともに高いが、陽性予測率が低いとする報告があり、また、脳MRI拡散強調画像はその
極めて高い有用性が少数例の検討ではあるが報告されている。偽陽性を生じる疾患は脳MRIの方が14-3-3
蛋白より鑑別が容易と思われ、脳MRIが早期よりCJDに特徴的な所見を検出可能であることと考え合わせ
ると、脳MRIの診断基準への採用を視野に入れる必要がある。

Significance of electroencephalogram, brain MRI and 14-3-3 proteins in the diagnostic criteria for Creutzfeldt-Jakob
disease

Nobuyuki SODEYAMA¹, Hidchiro MIZUSAWA¹, Masahito YAMADA², Takeshi SATO³, Tetsuyuki KITAMOTO⁴,
Yosikazu NAKAMURA⁵, Yoshiyuki KOROIWA⁶, Fumio MORIWAKA⁷, Hiromasa SIGA⁸, Masatoshi TAKEDA⁹,
Masatoyo NISHIZAWA¹⁰, Shigeki KUZUHARA¹¹, Shigetoshi KURODA¹², Hiroyuki MURAI¹³,
Shigeo MURAYAMA¹⁴, Jun TATEISHI¹⁵, Katsumi DOH-URA¹⁶

¹Department of Neurology and Neurological Science, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University

²Department of Neurology and Neurobiology of Aging, Kanazawa University Graduate School of Medical Science

³Department of Neurology, Higashiyamato Hospital

⁴Department of Neurological Science, Tohoku University Graduate School of Medicine

⁵Department of Public Health, Jichi Medical School

⁶Department of Neurology, Yokohama City University, School of Medicine

⁷Department of Communication Disorders, Health Sciences University of Hokkaido School of Psychological Science

⁸Department of Neurology, Tohoku University Graduate School of Medicine

⁹Psychiatry · Department of clinical Neuroscience, Osaka University Graduate School of Medicine

¹⁰Department of Neurology, Brain Research Institute, Niigata University

¹¹Department of Neurology, Mie University Graduate School of Medicine

¹²Department of Neuropsychiatry, Okayama University Graduate School of Medicine

¹³Department of Neurology, Neurological Institute, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

¹⁴Department of Neuropathology, Tokyo Institute of Gerontology

¹⁵Shunpu Health Care Center for the elderly

¹⁶Division of Prion Protein Biology, Department of Prion Research, Tohoku University Graduate School of Medicine

ABSTRACT

We evaluated significance of electroencephalogram (EEG), brain MRI and 14-3-3 proteins in the diagnostic criteria for Creutzfeldt-Jakob disease in Japanese surveillance, and assessed propriety of inclusion of brain MRI or 14-3-3 proteins in the diagnostic criteria. While sensitivity in the definite CJD cases was not significantly different among these three examinations, the performed rates of EEG, brain MRI and 14-3-3 proteins in the total cases were 99%, 76% and 36%, respectively. Inclusion of either brain MRI or 14-3-3 proteins in the diagnostic criteria had similar effect on the antemortem diagnosis in the definite cases. In the possible cases, however, inclusion of brain MRI in the diagnostic criteria had stronger effect on the clinical diagnosis of probable CJD more than that of 14-3-3 proteins. Many researchers reported high sensitivity and specificity of 14-3-3 proteins while some studies showed low positive predictive value. One study on several definite CJD cases demonstrated excellent diagnostic accuracy and reliability of brain MRI diffusion weighted images (DWI). By referring clinical course and laboratory data, disorders which cause false-positive results on brain MRI DWI can be differentiated from CJD more easily than those with false-positive 14-3-3 proteins. Together with possible early detection of typical abnormal findings of CJD on MRI DWI, we propose inclusion of brain MRI DWI in the diagnostic criteria for CJD.

[背景]

従来よりクロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)の診断には脳波(EEG)上の周期性同期性放電(PSD)の存在が重視されてきた。しかし、近年、脳MRIで発症早期よりCJDに特徴的な所見が検出可能なことや脳脊髄液中の14-3-3蛋白がCJDの診断において感度・特異度とも極めて高いことが報告されている。1998年度版のWHOの診断基準では既に14-3-3蛋白が取り入れている。また、プリオン蛋白遺伝子コドン129番の多型と異常プリオン蛋白タイプによる孤発性CJDのサブグループの中にはコドン129Met/Met type2のように元来PSDが認められないものが存在することも知られるようになってきている。以上よりEEG以外の検査を診断基準に取り入れるべきか検討する必要がある。

[目的]

本研究の目的は、日本のサーベイランス調査でのEEG、脳MRI、脳脊髄液中の14-3-3蛋白のCJD診断における意義と、現在の診断基準に脳MRIまたは脳脊髄液中の14-3-3蛋白を導入することの妥当性を検討することである。

[方法]

対象は日本のCJDサーベイランス調査にてpossible以上の孤発性または感染性CJDと診断された408例である。CJDサーベイランス調査票の記載に基づいて脳MRI FLAIR、T2WI、diffusion weighted image (DWI)での大脳皮質・大脳基底核の特徴的高信号病変の有無と14-3-3蛋白の陽性/陰性を判定し、definite、probable、possibleの各群におけるEEG、脳MRI、14-3-3蛋白の感度と施行率を算出した。Probableの診断基準に脳MRIまたは14-3-3蛋白を採用した場合にdefinite群で生前にprobableと診断される比率がどのように変わるかを脳MRIと14-3-3蛋白の場合に分けて検討した。さらに、probableの診断基準を変更した場合にpossible群の診断がどのように変化するかを試算した。

(倫理面への配慮)

本研究はCJDサーベイランス委員会が施行したCJDサーベイランス調査に基づいている。調査については患者御本人または御家族へ十分に御説明をし、文書にて同意が得られている。倫理審査委員会の承認も得られており、倫理面における問題はない。

[結果]

3検査の陽性数(感度%)/検査施行数(施行率%)は、definite群(48例)、EEG:36(75%)/48(100%)、MRI:30(71%)/42(88%)、14-3-3蛋白:19(73%)/26(54%)、probable群(321例)、EEG:321(100%)/321(100%)、MRI:178(74%)/241(75%)、14-3-3蛋白:97(92%)/106(33%)、possible群(39例)、EEG:0(0%)/35(90%)、MRI:19(70%)/27(69%)、14-3-3蛋白:11(69%)/16(41%)、全例群(408例)、EEG:357(88%)/404(99%)、MRI:227(73%)/310(76%)、14-3-3蛋白:127(86%)/148(36%)であった(表1)。Definite群のPSD陰性例は12例であり、感度/施行率はMRI:64%/92%、14-3-3蛋白:75%/67%であった。MRIか14-3-3蛋白が陽性の場合にもprobable CJDと判定するように診断基準を変更すると、definite群において生前にprobableと診断される比率は従来の基準による75%から、MRIの場合は90%へ、14-3-3蛋白の場合は88%へそれぞれ変化する(表2)。Possible群(39例)では、MRIか14-3-3蛋白をprobableの診断基準に採用すると、MRIの場合はpossible群のうちの49%が、14-3-3蛋白の場合は28%がprobableと診断されるようになる(表3)。

[考察]

本邦のdefinite群における3検査の感度はEEG:75%、MRI:71%、14-3-3蛋白:73%と3検査の間で著明な差はなかったが、全例群での検査施行率はEEG:99%、MRI:76%、14-3-3蛋白:36%と大きく異なっており、14-3-3蛋白の施行率が著明に低値であった。Definite群のPSD陰性例における感度は14-3-3蛋白の方がMRIに比べて軽度高値であったが、施行率はMRIの方が高かったため、生前にprobableと診断される比率に対する診断基準の変更による影響は両方で明らかな差はなかった。Possible群では検査の感度はMRI:70%、14-3-3蛋白:69%でほぼ同じであったが、施行率がMRI:69%、14-3-3蛋白:41%と大きく異なるために診断基準の変更によりprobableと診断される率はMRI:49%、14-3-3蛋白:28%であり、MRIの影響の方が大きかった。

過去の文献ではCJD診断におけるEEGの感度は概ね60%台後半、特異度は70-80%台と報告されている(表4)¹⁻⁴⁾。14-3-3蛋白は、Geschwindらが32例のdefinite例で感度53%と低い値を報告している以外は⁵⁾、多くの研究では感度は71-97%、特異度は84-98%、陽性予測率は76-97%と報告されている(表5^{1,2,4,6-12)}。しかし、診断基準としての14-3-3蛋白には問題点が2つある。第1点は測定法が施設間で均一ではなく、cut-off値にも違いがあることである。方法にはwestern blot法とELISA法の2種があり、western blot法にはさらに半定量的に判定する場合とdensitometry等を用いて定量化して判定する場合がある。測定する14-3-3蛋白のアイソフォームにもβとγの2通りがあり、さらにwestern blot法をdensitometryで定量化した場合とELISAの場合はcut off値をどこに設定するかによって感度と特異度に違いを生じる。Aksamitらはpossible以上のCJD患者および当初CJDが疑われた非CJD群を対象としたELISA法を用いた検討で、cut off値を8ng/mL以上とすると感度61%/特異度100%、4ng/mLとすると感度94%/特異度49%となるとし、cut off値によって感度、特異度の値が大きく変化することを報告している¹³⁾。第2点は、元来14-3-3蛋白は脳の障害による脳脊髄液中への14-3-3

蛋白の非特異的な放出を見ており、CJDに特異的な変化を見ているわけではないことである。この特徴は数的パラメーターとしては陽性予測率の低値に反映されるが、Burkhardらは種々の痴呆を呈する患者100名で14-3-3蛋白を測定し14名で陽性であったがそのうちCJDは2名しかおらず、感度・陰性予測率は100%、特異度は88%と高値であったが、陽性予測率は14%と低値であったと報告している⁷⁾。Demacrelらも同様に陽性予測率56%と低い結果を報告している⁴⁾。一方、陰性予測率は対象群の症例数がCJD群より少ない対象を検討した報告以外ではいずれも96%以上の高値となっている^{4,6,7,9-12)}。陰性予測率は高値だが陽性予測率が低い場合があるということは、14-3-3蛋白は陰性であればCJDは否定的だが、陽性であってもCJDとは必ずしも限らないということを示す。そのため、14-3-3蛋白をCJDの診断に使用するのはCJDが強く疑われる例に限るべきとの意見があり、実際WHOの診断基準では14-3-3蛋白を適応させるのは死亡までが2年以内という付帯事項がついている。HuangらもCJD以外のrapidly progressive dementiaを呈する疾患の患者のうちの14%で14-3-3蛋白が陽性だったと報告しており、日常良く見かけるrapidly progressive dementiaの鑑別には14-3-3蛋白は必ずしも有用ではないことを指摘している¹²⁾。MRIについてはDemacrelらはdefinite CJD5例、CJDが疑われたが後に否定された7例の検討にて、MRI DWIは感度、陽性予測率、特異度とも100%であり、同一対象においてMRI T2/FLAIRは感度60%、特異度100%、EEGの感度40%、特異度86%、14-3-3蛋白の感度100%、特異度43%であったことからMRI DWIはMRI T2/FLAIR、EEG、14-3-3蛋白より優れているとし、診断基準に採用することを推奨している(表6)⁹⁾。TschampaらもCJD6例全例で大脳基底核がDWIで高信号を呈していたと報告している¹⁴⁾。SchröterらはMRI T2による検討で感度67%、陽性予測率96%、特異度93%の成績を¹⁵⁾、FinkenstaedtらはMRI T2/protonによる検討で感度79%の成績を報告しており¹⁶⁾、MRI T2/protonはDWIより有用性が劣ると考えられる(表6)。

上述した数的パラメーター以外で診断基準に採用する検査について検討すべき重要な点はそれぞれの検査で偽陽性を呈する疾患が、臨床症状や他の検査所見でどの程度鑑別が可能かということである。表7に14-3-3蛋白で偽陽性を呈する疾患を¹⁷⁾、表8に脳MRIで偽陽性を呈する疾患を示した^{16,18-21)}。14-3-3蛋白で偽陽性を呈する疾患にはAlzheimer's disease, frontotemporal lobe dementia, dementia with Lewy bodies, infectious encephalitis, metabolic encephalopathy等があるが、診断に苦慮するCJDの症例でたびたび鑑別診断の対象とされるものが多く、臨床症状や他の検査所見での鑑別は必ずしも容易ではないと考えられる。それに対して脳MRIで偽陽性を呈する疾患はMELAS, status epilepticus, anoxic/ischemic encephalopathy等であるが、そのほとんどは臨床症状や他の検査所見から鑑別が比較的容易であると思われる¹⁸⁻²¹⁾。また、皮質がDWI high intensityを呈する疾患について画像所見を詳細に比較すると、CJDはDWI high intensity lesionが皮質に局限しかつ皮質の障害も広範であるのに比べ、MELASとstatus epilepticusはhigh intensity lesionが皮質に局限せず皮質下白質にまでおよんでおり、かつ皮質の障害は巣状である^{20,21)}。Anoxic/ischemic encephalopathyは左右対称性で皮質の障害は広範であるが、high intensity lesionが皮質に局限せず皮質下白質にまでおよんでおり、かつCJDでは正常である小脳半球等もhigh intensityを呈することから鑑別される^{18,19)}。また、ADCではCJD、MELAS、status epileptica、anoxic/ischemic encephalopathyはlow intensityを呈するのに対し、status epilepticusは時期によって様々なintensityを呈し、発作中はhigh intensityとなる^{20,21)}。画像所見の点からもMRIで疑陽性を呈する疾患は鑑別が比較的容易と考えられる。

[結論]

現時点で診断基準への採用を検討すべき検査には脳MRIと14-3-3蛋白があるが、1. 脳MRIの方が日本における検査の施行率が高い、2. 日本のサーベイランス調査の検討では脳MRIの方がpossible群の診断に与える影響が大きい、3. 文献的には14-3-3蛋白は陽性予測率が必ずしも高くはないとする報告がある、4. MRI DWIの少数例の検討では良好な結果が報告されている、5. 疑陽性を生じる疾患はMRIの方が鑑別が容易である、6. 脳MRIは発症早期から異常所見が検出可能である、等の特徴から脳MRI DWIを診断基準に組み入れることを視野に入れて、今後は脳MRIで疑陽性を生じる疾患についてのさらなる知見の蓄積とサーベイランス調査における剖検率の向上と生存例の追跡調査を充実が重要である。

[参考文献]

- 1) Zerr I, Pocchiari M, Collins S, Brandel JP, de Pedro Cuesta J, Knight RSG, Bernheimer H, Cardone F, Delasnerie-Lauprêtre N, Cuadrado Corrales N, Ladogana A, Bodemer M, Fletcher A, Awan T, Ruiz Bremón A, Budka H, Laplanche JL, Will RG, Poser S. Analysis of EEG and CSF 14-3-3 proteins as aids to the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology*. 55:811-815, 2000.
- 2) Poser S, Mollenhauer B, Krauß A, Zerr I, Steinhoff BJ, Schroeter A, Finkenstaedt M, Schulz-Schaeffer WJ, Kretzschmar HA, Felgenhauer K. How to improve the clinical diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain*. 122:2345-2351, 1999.
- 3) Steinhoff BJ, Racker S, Herrendorf G, Poser S, Grosche S, Zerr I, Kretzschmar H, Weber T. Accuracy and reliability of periodic sharp wave complexes in Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch Neurol*. 53:162-166, 1996.
- 4) Demaerel P, Sciot R, Robberecht W, Dom R, Vandermeulen D, Maes F, Wilms G. Accuracy of diffusion-weighted MR imaging in the diagnosis of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol*. 250:222-225, 2003.
- 5) Geschwind MD, Martindale J, Miller D, DeArmond SJ, Uyehara-Lock J, Gaskin D, Kramer JH, Barbaro NM, Miller BL. Challenging the clinical utility of the 14-3-3 protein for the diagnosis of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch Neurol*. 60:813-816, 2003.
- 6) Van Everbroeck B, Quoilin S, Boons J, Martin JJ, Cras P. A prospective study of CSF markers in 250 patients with possible Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 74:1210-1214, 2003.
- 7) Burkhard PR, Sanchez J-C, Landis T, Hochstrasser DF. CSF detection of the 14-3-3 protein in unselected patients with dementia. *Neurology*. 56:1528-1533, 2001.
- 8) Otto M, Wiltfang J, Cepek L, Neumann M, Mollenhauer B, Steinacker P, Ciesielczyk B, Schulz-Schaeffer W, Kretzschmar HA, Poser S. Tau protein and 14-3-3 protein in the differential diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology*. 58:192-197, 2002.
- 9) Lemstra AW, van Meegen MT, Vreyling JP, Meijerrink PHS, Jansen GH, Bulk S, Baas F, van Gool WA. 14-3-3 testing in diagnosing Creutzfeldt-Jakob disease: a prospective study in 122 patients. *Neurology*. 55:514-516, 2000.
- 10) Hsich G, Kenney K, Gibbs C, Lee KH, Harrington M. The 14-3-3 brain protein in cerebrospinal fluid as a marker for transmissible spongiform encephalopathies. *N Engl J Med*. 335:924-930, 1996.
- 11) Kenney K, Brechtel C, Takahashi H, Kurohara K, Anderson P, Gibbs CJ. An enzyme-linked immunosorbent assay to quantify 14-3-3 proteins in the cerebrospinal fluid of suspected Creutzfeldt-Jakob disease patients. *Ann Neurol*. 48:395-398, 2000.
- 12) Huang N, Marie SK, Livramento JA, Chammas R, Nitrini R. 14-3-3 protein in the CSF of patients with rapidly progressive dementia. *Neurology*. 61:354-357, 2003.
- 13) Aksamit AJ, Preissner CM, Homburger HA. Quantitation of 14-3-3 and neuron-specific enolase proteins in CSF in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology*. 57:728-730, 2001.
- 14) Tschampa HJ, Mürtz P, Flacke S, Paus S, Schild HH, Urbach H. Thalamic involvement in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: a diffusion-weighted MR imaging study. *Am J Neuroradiology*. 24:908-915, 2003.
- 15) Schröter A, Zerr I, Henkel K, Tschampa HJ, Finkenstaedt M, Poser S. Magnetic resonance imaging in the clinical diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch Neurol*. 57:1751-1757, 2000.
- 16) Finkenstaedt M, Szudra A, Zerr I, Poser S, Hise JH, Stoebner JM, Weber T. MR imaging of Creutzfeldt-Jakob disease. *Radiology*. 199:793-798, 1996.
- 17) Aksamit AJ. Cerebrospinal fluid 14-3-3 protein. *Arch Neurol*. 60:803-804, 2003.
- 18) Singhal AB, Topcuoglu MA, Koroshetz WJ. Diffusion MRI in three types of anoxic encephalopathy. *J Neurol Sci*. 196:37-40, 2002.
- 19) Hald JK, Brunberg JA, Dublin AB, Wootton-Gorges SL. Delayed diffusion-weighted MR abnormality in a

- patient with an extensive acute cerebral hypoxic injury. *Acta Radiologica*. 44:343-346, 2003.
- 20) Senn P, Lövblad KO, Zutter D, Bassetti C, Zeller O, Donati F, Schroth G. Changes on diffusion-weighted MRI with focal motor status epilepticus: case report. *Neuroradiology*. 45:246-249, 2003.
- 21) Iizuka T, Sakai F, Kan S, Suzuki N. Slowly progressive spread of the stroke-like lesions in MELAS. *Neurology*. 61:1238-1244, 2003.

[研究発表]

1. 論文発表

- 1) 袖山信幸、水澤英洋。「プリオン病-最近の進歩-」4. プリオン病の遺伝学的診断。老年精神医学雑誌 14:1483-1487, 2003.
- 2) 佐藤猛、水澤英洋、袖山信幸、増田眞之、黒岩義之、戸田宏幸、山田正仁、黒田重利、北本哲之。感染性プリオン病：硬膜移植後CJDと変異型CJD。神経進歩 47:100-108, 2003.
- 3) 袖山信幸、水澤英洋。プリオン病の新しい展開。Gerstmann-Sträussler-Sheinker病と遺伝性プリオン病。最新医学 58:995-1000, 2003.

2. 学会発表

- 1) 袖山信幸。5. プリオン病の診断と問題例。2)臨床検査(MRI、14-3-3、NSE、tau、尿)。Creutzfeldt-Jakob病サーベイランスに関する全国担当者会議。(東京) 2004年3月。

表1 日本のCJDサーベイランス調査におけるdefinite群、probable群、possible群、全例群のEEG、MRI、14-3-3蛋白の施行数、陽性数、施行率、感度

	総数	EEG	MRI	14-3-3蛋白
Definite CJD 陽性数/施行数	48例	36/48例	30/42例	19/26例
感度/施行率		75/100%	71/88%	73/54%
Probable CJD 陽性数/施行数	321例	321/321例	178/241例	97/106例
感度/施行率		100/100%	74/75%	92/33%
Possible CJD 陽性数/施行数	39例	0/35例	19/27例	11/16例
感度/施行率		0/90%	70/69%	69/41%
全例 陽性数/施行数	408例	357/404例	227/310例	127/148例
感度/施行率		88/99%	73/76%	86/36%

表2 Definite群で診断基準の変更により生前にprobableと診断される比率の変化

	総数	EEG	MRI	14-3-3蛋白
現行の診断基準による場合				
Definite CJD	48例	36/48例	30/42例	19/26例
PSD陰性例	12例	0/12例	7/11例	6/8例
生前のprobable診断率	36/48 (75%)			
MRI所見を診断基準に入れた場合				
Definite CJD	48例	36/48例	30/42例	19/26例
PSD陰性例	12例	0/12例	7/11例	6/8例
生前のprobable診断率	43/48 (90%)			
14-3-3蛋白所見を診断基準に入れた場合				
Definite CJD	48例	36/48例	30/42例	19/26例
PSD陰性例	12例	0/12例	7/11例	6/8例
生前のprobable診断率	42/48 (88%)			
Definite CJD	12例		7/11例	6/8例
のPSD陰性例				
感度/施行率			64/92%	75/67%

表3 Possible群で診断基準の変更によりprobableと診断される比率

	総数	EEG	MRI	14-3-3蛋白
現行の診断基準による場合				
Possible CJD	39	0/35	19/27	11/16
感度/施行率		0/90%	70/69%	69/41%
MRI所見を診断基準に入れた場合				
Probable CJD	19(49%)	0/19	19/19	7/9
Possible CJD	20	0/16	0/8	4/7
14-3-3蛋白所見を診断基準に入れた場合				
Probable CJD	11(28%)	0/10	7/10	11/11
Possible CJD	28	0/25	12/17	0/5

表4 過去の報告におけるEEGの感度、陽性予測率、特異度

報告者	CJDの診断の判定基準	コントロール群の構成	感度	陽性予測率	特異度
本研究	definite		71%	??%	??%
Zerrら	definite	other cases	66%	??%	74%
Poserら	probable以上	other cases	65%	??%	86%
Steinhoffら	definite	CJD s/o	67%	??%	86%
Demaerelら	definite	CJD s/o	40%	75%	85%

表5 過去の報告における14-3-3蛋白の感度、陽性予測率、陰性予測率、特異度

報告者	検査方法	CJD診断の判定基準, 症例数	コントロール群の構成, 症例数	感度	陽性予測率	陰性予測率	特異度
本研究	WB	definite, 48		73%	??%	??%	??%
Lemstraら	WB	probable以上, 33	CJD s/o, 77	97%	76%	99%	87%
Hsiehら	WB	possible以上, 71	control, 94	96%	94%	97%	96%
Everbroeckら	WB, 定量化	possible以上, 52	CJD s/o, 198	96%	89%	99%	97%
Poserら	WB	probable, 201	other cases, 109	95%	??%	??%	93%
Zerrら	WB	definite, 219	CJD s/o, 43	94%	97%	72%	84%
Kennedyら	ELISA	definite, 41	neurological disorders, 84	93%	95%	96%	98%
Ottoら	WB	possible以上, 204	others, 93	90%	??%	??%	88%
Huangら	WB	possible以上, 24	rapid dementia, 22	71%	85%	73%	86%
Geschwindら	WB, ELISA	definite, 32		53%	??%	??%	??%
Aksamitら	ELISA	possible以上, 31	CJD s/o, 121		??%	??%	100%
		Cut off 値 : >8ng/mL		61%	??%	??%	??%
		Cut off 値 : >4ng/mL		94%	??%	??%	49%
Burkhardら	WB	CJD, 2	dementia, 98	100%	14%	100%	88%
Demaerelら	?	definite, 5	CJD s/o, 7	100%	56%	100%	43%

WB: western blotting.

表6 過去の報告における脳MRIの感度、陽性予測率、特異度

報告者	検査の種類	CJDの診断の判定基準, 症例数	コントロール群の構成, 症例数	感度	陽性予測率	特異度
本研究	MRI	definite, 48		75%	??%	??%
Demaerelら	MRI DWI	definite, 5	CJD s/o, 7	100%	100%	100%
	MRI T2/FLAIR	definite, 5	CJD s/o, 7	60%	100%	100%
	EEG	definite, 5	CJD s/o, 7	60%	75%	86%
	14-3-3蛋白	definite, 5	CJD s/o, 7	100%	56%	43%
Tschampaら	MRI DWI	probable以上, 6		100%	??%	??%
Schröterら	MRI T2	probable以上, 162	CJD s/o, 58	67%	96%	93%
Finkenstaedtら	MRI T2/Proton	probable以上, 29		79%	??%	??%

表7 14-3-3蛋白で偽陽性を生じる疾患

Alzheimer's disease, Frontotemporal lobe dementia, Dementia with Lewy bodies
Cerebral infarction, Infectious encephalitis, Subarachnoid hemorrhage,
Acute transverse myelitis, Brain tumor, Paraneoplastic neurological syndrome
Tuberous sclerosis, Amyotrophic lateral sclerosis with dementia
Rett syndrome, Down syndrome, Cerebral amyloid angiopathy
Metabolic encephalopathy, Multiple sclerosis, MELAS, Carcinomatous meningitis
Anoxic encephalopathy

表8 脳MRIで偽陽性を生じる疾患

大脳皮質のhigh intensityを生じる疾患
MELAS, Status epilepticus, Anoxic/ischemic encephalopathy

大脳基底核のhigh intensityを生じる疾患
Anoxic/ischemic encephalopathy, Hypoglycemia, Hemolytic-uremic syndrome
Osmotic myelinolysis, Encephalitis, Leigh disease, MELAS, Glutaric aciduria
Wilson disease

研究協力者：調 漸（長崎大学・大学院医・神経病態制御学）
研究協力者：佐藤克也（長崎大学・大学院医・神経病態制御学）
研究協力者：江口勝美（長崎大学・大学院医・神経病態制御学）
研究協力者：片峰 茂（長崎大学・大学院医・感染分子病態学）
研究協力者：西田教行（長崎大学・大学院医・感染分子病態学）
研究協力者：丹羽正美（長崎大学・大学院医・神経感覚医学解析学）
研究協力者：片岡泰文（福岡大学・薬学部・薬学疾患管理学）

〔研究要旨〕

我々はプリオン病の治療方策の開発を目指して①既存薬剤として quinacrine（キナクリン）と pentosan polysulfate（PPS）を選択し患者へ投与し治療効果の検討を行なっている。既に投与を終了したキナクリン使用例では覚醒度の向上、ミオクローヌスの頻度の減少、驚愕反応の一過性の軽快、脳波所見の一過性の軽快がみられたが、病勢の進行を遅延させることはできなかった。②既存薬剤の効果的投与法の改良として薬剤の血液脳関門機能を修飾することで脳移行性を高める目的でベラパミルの併用を行い髄液中のキナクリン濃度を検討した。③PPSの脳移行性を高める目的でPPSを酸加水分解処理しグリコシド結合を開裂させ低重合化した低分子量PPSを作成する試みを行ない、低分子PPSで抗プリオン作用を有する分画が分取でき、*in vitro*血液脳関門モデルで一部脳に移行すると思われる分画を見出した。

Clinical and preclinical therapeutic trials of Prion diseases with quinacrine, PPS and chemically modified PPS.

Susumu SHIRABE, Katsuya SATOH and Katsumi EGUCHI. Shigeru KATAMINE, Noriyuki NISHIDA. Masami NIWA, Yasufumi KATAOKA

Division of Clinical Neurosciences, Neurology and Neurosurgery Graduate School of Biochemical Sciences, Nagasaki University. Division of Cellular and Molecular Biology, Department of Molecular Microbiology and Immunology Graduate School of Biochemical Sciences, Nagasaki University. Department of Pharmaceutical Care and Health Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University

ABSTRACT

To create effective treatment of Prion diseases, we designed clinical protocol with quinacrine and pentosan polysulfate (PPS). We reported with 5 CJD patients treated with combination with quinacrine and verapamil. We also treated 6 CJD patients with PPS 1) Alertness of consciousness, suppression of startle reaction and decreased frequency of myoclonus were observed transiently in a quinacrine-treated patient with sporadic CJD. 2) To increase the uptake of quinacrine into brain tissue, we reported efficient co-administration of verapamil with quinacrine orally. In these patients, we measured quinacrine concentration in cerebrospinal fluid. As a result of combination of quinacrine and verapamil, favorable concentration was observed. CJD patients were treated with minimal adverse effects. 3) To deliver PPS into brain tissue, we digested PPS with acidic chemical agent. Digested PPS to smaller fraction were obtained by liquid chromatography. Some fraction of low molecular weight PPS had anti-prion effect in persistently prion-infected GTFK cell line. Only one fraction of these fractions penetrate BBB kit, which suggest this small-size PPS faction may be usual as a candidate of anti-prion agent.

〔はじめに〕

急速に脳の変性を引き起こし数ヶ月以内に脳死状態に陥るプリオン病は、有効な治療法が全くない致死性疾患である。狂牛病の伝播による新変異型クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) の出現や、本邦における汚染ヒト脳硬膜移植による医原性 CJD の多発を背景に、治療あるいは病態進展阻止のための臨床方策の開発が急務となっている。試験管内で異常プリオン蛋白の産生を抑制することが確認されている薬剤は複数存在するものの、臨床試験レベルまで進展しているものはほとんどない。これは主に、末梢投与された薬剤の血液脳関門(以下 BBB)を越えた脳内送達の問題が克服されていないことに因る。

〔目的〕

今回我々は試験管内での異常プリオン抑制効果が判明している薬剤の中で、既に他疾患への治療薬剤として使用され安全性が確認されているものを材料として、脳内送達に優れる薬剤の開発を行い、プリオン病治療・病態進展阻止のための臨床方策の早期確立を目指している。そのために、①既存薬剤 (キナクリン、PPS) を用いたプリオン病患者治療の治療研究、②p 糖蛋白阻害剤を併用した既存薬剤の脳内送達性の向上を目指す研究、③PPS の脳内送達性を高める目的での低重合化による低分子 PPS の開発を行なっている。これらの研究計画のこの一年間の成果について報告する。④これらの治療法を応用する上で必須である早期診断法についての研究も現在までに得られた知見について述べる。

〔材料と方法〕

1) 既存薬剤によるプリオン病治療研究

CJD、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病、家族性クロイツフェルト・ヤコブ病、ヒト硬膜移植による医原性クロイツフェルト・ヤコブ病、家族性致死性不眠症からなるプリオン病患者を対象とする。その診断は本会議の提唱する診断マニュアル¹⁾に加えて、髄液 tau 蛋白、髄液 14-3-3 蛋白測定で診断が確認できた症例について別項に述べる長崎大学倫理委員会の定めるインフォームドコンセントを十分に得た上で上記のいずれかの診断の患者の治療への参加を得る。これまでに、

使用薬剤は米国で一定の効果が報告されたキナクリン²⁾と試験管内で最大の異常プリオン蛋白抑制効果を発揮することが判明している PPS³⁾を候補薬剤として用いる。PPS は脳移行性が低い CJD では血液脳関門が破壊されており薬剤移行が期待して投与する。これまでに、孤発性 CJD 6 例、硬膜移植例 1 例、遺伝性 CJD 1 例 (キナクリン治療 5 例、PPS 治療 6 例、3 例は両薬をウォッシュアウトの期間をおいて使用した)。

2) 既存薬剤の脳内送達性向上のための併用薬剤の探索

キナクリン投与については以下に述べる脳内送達性の向上のためのベラパミルの併用をプロトコールに追加し、常用量とされた 300mg/day を 200mg/day に減量した上で髄液中の薬物濃度をモニターした。

3) 既存薬剤の改変による脳内送達性を向上させた薬剤の創薬の試み

酸加水分解法を用いて、PPS の低分子化を検討した。

PPS の酸加水分解は PPS-Ca 0.5 g を 0.2N HCl 50 ml に溶解し、還流しながら 100 °C で 30 分間、酸加水分解を行った。反応後は氷冷しながら 1N NaOH で中和し、エバポレータで溶媒を留去後、蒸留水 10 ml に再溶解して、Bio-Gel P-4 カラムに apply した。カラムは 0.1M NaCl (flow rate=0.5 ml/min) で溶出し、溶出液は 4 ml ずつ試験管 110 本に分取した。溶出液の各フラクションを TLC で確認し、A?D の 4 画分に分画した。各分画を濃縮し、エタノール沈殿を行い、生じた沈殿物を減圧下で乾燥した。A?C の 3 画分について、HPLC による分子量推定及び硫酸基の測定を行った。

これらの分画に Ca 塩、Na 塩を付加したものを調整し GTFK 細胞 PrPSc 持続感染細胞に添加して 72 時間培養した後、回収。プロテイナーゼ K 処理後、抗プリオン抗体を一次抗体としてウエスタンブロットで PrPSc を半定量し、各々の分画の抗プリオン効果を判定した。

(倫理面への配慮)

1) 本研究は長崎大学倫理委員会の承認を経て行われている。(承認番号 14042342)

2) 副作用監視に特に注意を払うために副作用監視医師を当該研究グループに属さない内科教官に委託している。

〔結果〕

1) 既存薬剤による治療研究

これまでに5例のキナクリンの投与を終了した。(表1)

ミオクロオヌスの減少は全例に見られた。一例のみ一過性の脳波所見の改善がみられたが、他の例では覚醒度の改善が一過性に観察されるが臨床経過を修飾し得るものではなく、経過中一過性の周囲への反応の改善などみられたものの脳波所見は改善後2週間以内に全般徐波から PSD へ移行した症例があった。

PPS を6例に投与した。(表2) 投与した症例の内、MM2,cortical 型の一例に有効で、歩行時間の著明な改善、言語の保続の改善などがみられた。その他の急速進行例ではミオクロオヌスなど極く一部の症状が軽快傾向にあったのみで、有効性に乏しかった。副作用としては便潜血がみられたが、その時点で投薬を中止すれば下血などに進展する症例はみられなかった。

2) 既存薬剤の脳内送達性向上のための併用薬剤の探索

キナクリン脳移行におよぼす P-gp 阻害薬として昨年度 cyclosporine および verapamil 存在下でキナクリンの脳移行が *in vitro* で有意に増大することを報告した。今年度は verapamil をキナクリン 200mg/day と併用し、作用、副作用、髄液中の薬剤濃度を検討したところ、有効性は 300mg/day とほぼ同等で、副作用では皮膚黄染は全例にみられるものの肝障害は軽度で2名にみられるに留まり、髄液中薬剤濃度は、0.23-0.4Mm と *in vitro* の有効濃度とされる 0.4-1M に近いレベルまで上昇することが判った。

3) 既存薬剤の改変による脳内送達性を向上させた薬剤の創薬の試み

3種の PPS-Ca 酸加水分解物画分は GPC カラムを用いた HPLC で、それぞれ単一のピークとして得られた重量平均分子量は A 画分が PPS-Ca 原末の約 80%、B 画分 70%、C 画分 PPS-Ca の 50-60% に減少していた。これらの分画の内、80%、70% に低分子化したもので抗プリオン効果が得られた。(表3)

これらの分画を我々が開発した血液脳関門再構築モデル⁵⁾ を用いて脳移行性を検討したところ、一つの分画で脳移行性を示唆する結果が得られた。

〔考察〕

1) 既存薬剤による治療研究

キナクリン投与例では覚醒度、追視などの改善に加えて驚愕反射、ミオクロオヌスの頻度に改善がみられたが1例で脳波所見に一過性の改善がみられたが、無言無動に至る臨床経過には改善はみられなかった。

Verapamil を併用すれば副作用を軽減した上で、有効な髄液中濃度に近い濃度が得られることが判った。ペントサン経口投与については MM2,cortical form で有効であったが、その他の急速進行例では有効性は極く軽度に留まった。副作用は便の潜血陽性のみであった。

現在、早期診断においては MRI、髄液検査で早期診断がある程度可能になったが、治療効果の判定のための病態評価マーカーの確立が重要であると思われた。

2) 既存薬剤の脳内送達性向上のための併用薬剤の探索

キナクリンは、脳に移行する場合、能動的な細胞外排出輸送系によって排出されているが、排出輸送系として P-gp が関与している。従って、P-gp 阻害によりキナクリンの脳内移行量が増大する可能性が考えられ、この知見に基づいてキナクリンと verapamil 併用療法を行なったところ、良好な治療効果と副作用の軽減が可能となり、髄液中のキナクリン濃度も治療可能なレベルに達すると思われた。新たな治療戦略として提案できると考える。

3) 害損薬剤の改変による脳内送達性を向上させた薬剤の創薬の試み

PPS の酸加水分解により、PPS を硫酸基を保持したまま低分子化することが可能であり、高速液体クロマトにて分画として分取可能なことが明らかになった。これによって低分子量 PPS の経口投与によって脳内送達できる可能性が示された。今後、更に他の分画の検討、分取された分画の大量抽出と、得られた低分子量

ペントサンの脳内移行性と持続感染細胞系での検討が必要である。

〔参考文献〕

- 1) 疾病対策研究会: 難病の診断と治療指針 3、クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) の診断基準. 六法出版社. 138-140, 2002
- 2) Rebecca Love: Old drugs to treat new variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet*. 563, 2001
- 3) Chistine F. Alan D. Moria Bruce: Prophylactec potential of pentosan polysulfate in transmissible spongiform encephalopathies. *Lancet*. 353:117, 1999
- 4) 古川ひさ子, 中島雅土, 高橋美津雄, 山田達夫: クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) に対する診療法 (マラリア治療薬) の開発展望. *日本臨床*. 60: 1649-1657, 2002

〔研究発表〕

1.論文発表

1. Dohgu S, Yamauchi A, Takata F, Sawada Y, Higuchi S, Naito M, Tsuruo T, Shirabe S, Niwa Masami, Kataoka Y: Uptake and Efflux of Quinacrine, a Candidate for the Treatment of Prion Disease at Blood-Brain Barrier. *Cell Mol Neurobiol*. 2003 in press
2. Osoegawa M, Ochi H, Kikuchi H, Shirabe S, Nagashima T, Tsumoto T, Tamura Y, Yamabe K, Takahashi H, Iwaki T, Kira J: Eosinophilic myelitis associated with atopic diathesis : a combined neuroimaging and histopathological study. *Acta Neuropathol*. 105: 289-295, 2003
3. 佐藤克也, 調 漸, 片峰茂, 村本環, 北本哲之: 医原性クロイツフェルト・ヤコブ病. *日本臨床*. 62: 248-251, 2003
4. 佐藤克也, 調 漸: クロイツフェルト・ヤコブ病の治療法開発, 神経難病に対する治療の試み. *Bio Clinical*. 18: 1074-1080, 2003
5. 調 漸, 片峰茂: プリオン病の病態モデルマウスにおける運動失調. *Clinical Neuroscience*. 21171-173, 2003

2.学会発表

- 1) KEYSTONE SYMPOSIA (Byron C, Charles W, Suzette P and Bruce, Breckenndge Colorado U S A, Apr 2-6 2003)
Sato K, Shirabe S, Hamasaki S, Nishiura Y, Tsujino A, Nakamura T, Yoshimura T, and Eguchi K, Iwaki T: Discordant outcome of neurological and neuro-pathological phenotypes in familial cases of GSS with P102L mutation.
- 2) 第 44 回日本神経学会総会 (篠原幸人, パシフィコ横浜, H15. 5 月 15 日-17 日)
調 漸, 佐藤克也, 辻野彰, 西浦義博, 江口勝美, 片峰茂, 中村龍文, 丹羽正美: クロイツフェルト・ヤコブ病 (CDJ) におけるペントサン・キナクリンによる治療の効果
- 3) 第 44 回日本神経学会総会 (篠原幸人, パシフィコ横浜, H15. 5 月 15 日-17 日)
佐藤克也, 調 漸, 西浦義博, 辻野彰, 中村龍文, 松尾秀徳, 辻畑光宏, 江口勝美: クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) 患者における髄液中の 14-3-3 蛋白と Tau 蛋白の有用性
- 4) INTERNATIONAL PRION CONFERENCE (München Germany October 8-10 2003)
Sato K, Shirabe S, Tsujino A, Nishiura Y, Eguchi K, Sato A, Tsujihata M, Matsuo H: Role of phosphorylated tau/total tau ratio, 14-3-3 protein in CSF and diffusion weighted MRI in diagnosis of Creutzfeldt-Jacob disease
- 5) 第 164 回日本神経学会九州地方会 (辻貞俊, 産業科学大学 ラマツイーニ・ホール, H15.12 月 13 日)
江口博人, 佐藤克也, 辻野彰, 岩永洋, 白石裕一, 福島直美, 西浦義博, 本村政勝, 調 漸, 中村龍文, 吉村俊朗, 江口勝美, 井手芳彦: 早期に診断し経過観察できたハイデンハイン型クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) の一例

〔知的財産所有権の取得状況〕 なし

表 1) キナクリン投与例

年齢	性別	小脳症状	痴呆	歩行障害	ミオクロームス	周囲への反応	脳波(PSD)	髄液	MRI
67	M	不変	不変	悪化	改善	改善	悪化	悪化	悪化
67	M	不変	不変	悪化	改善	改善	悪化	悪化	悪化
64	F	不変	不変	不変	改善	改善	悪化	悪化	悪化
63	F	不変	不変	悪化	改善	改善	改善	改善	改善
68	F	不変	悪化	悪化	不変	悪化	悪化	悪化	悪化

硬膜移植例の一例で脳波、MRI 所見の軽快がみられたが一過性であった。

表 2) ペントサン投与例

年齢	性別	小脳症状	痴呆	歩行障害	ミオクロームス	周囲への反応	脳波(PSD)	髄液	MRI
67	M	不変	不変	悪化	改善	改善	悪化	悪化	悪化
67	M	不変	不変	悪化	改善	悪化	悪化	悪化	悪化
64	F	不変	不変	不変	改善	不変	悪化	悪化	悪化
69	F	—	不変	悪化	改善	悪化	悪化	悪化	悪化
67	F	不変	不変	悪化	改善	悪化	悪化	悪化	悪化
54	F	—	一部改善	改善	—	改善	不変	改善?	不変

MM2,cortical form の一例で有効であった。

表 3) 低分子化した PPS の効果

	Sample	MW(%)	PT(sec)	抗体プリオン効果
1	CaXPS-OS-A Na	80.1	32.4	+
2	CaXPS-OS-B Na	68.4	>300	±
3	CaXPS-OS-C Na	54.5	>300	±
4	CaXPS-OS-A Ca	77.7	30.4	+
5	CaXPS-OS-B Ca	70.6	>300	+
6	CaXPS-OS-C Ca	56.4	>300	±
7	CaXPS-HOS-A Na	82	>300	±
8	CaXPS-HOS-B Na	60.1	30.0	—
9	CaXPS-HOS-C Na	54	28.6	—
10	CaXPS-HOS-A Ca	83.7	>300	+
11	CaXPS-HOS-B Ca	60	32.0	—
12	CaXPS-HOS-C Ca	53.7	24.7	—
PPS	CaXPS(PPS-Ca)	100	>300	+

PPS を酸化酸化分解し、塩を付加した。原末に比して%分子量で 60-70%まで低分子化したもので抗プリオン効果を保持したものがみられたがプロトンピン時間とは無関係であった。