

た ($a = -0.35 \pm 0.06, -0.36 \pm 0.09$)。

D. 考察

DWI の表示条件は不安定で、CJD 早期における軽微な病変の見逃しや病変と磁化率アーティファクト・正常構造との誤認が生じうる。昨年度、ASIST-Japan 法を用いることでDWIの安定した表示が可能となり、CJD 早期病変の判定能が向上することを明らかにした。

本手法適用後の DWI 信号輝度は正常脳実質および CJD 早期病変に関しては原理的には eADC とほぼ比例関係となるはずである。今回の研究によって、標準化 DWI 信号輝度と eADC が良好な正の相関を示し、その自然対数と ADC が良好な負の相関を示し、かつ回帰係数の変動が十分小さいことが示され、我々の推論を裏付ける結果となった。

ASIST-Japan 法による標準化 DWI は簡便で安定した手法であるだけでなく、簡易 ADC マップとして使用できる可能性があり、今後のプリオン病早期診断や多施設研究において即戦力となる優れた手法であると考えられる。

E. 結論

CJD 早期病変検出における表示条件標準化 DWI 画像の信号輝度は ADC map や eADC map と良好な相関を示す安定した手法と考えられ、CJD の早期診断の精度向上に有望な手法と考えられた。

[参考文献]

1. Sasaki M, et al. Standardizing display conditions of diffusion-weighted images by using concurrent b0 images: a multivendor multi-institutional study. Magn Reson Med Sci 2007; 6 (3) :133-137.

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

プリオン病の画像診断に関する研究
- 画像診断を加味した早期診断の為の基準作り -

分担研究者：湯浅 龍彦 国立精神・神経センター国府台病院
研究協力者（画像小委員会）
研究協力者：佐々木真理 岩手医科大学先端医療センター
研究協力者：佐藤 克也 長崎大学医学部・歯学部附属病院
研究協力者：三條 伸夫 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科
研究協力者：調 漸 長崎大学医学部・歯学部附属病院
研究協力者：志賀 裕正 仙台富沢病院
研究協力者：白石 淳 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科
研究協力者：高野 大樹 秋田県立脳血管研究センター神経内科
研究協力者：長田 乾 秋田県立脳血管研究センター神経内科
研究協力者：浜口 毅 金沢大学大学院医学系研究科脳老化神経病態学
研究協力者：原田 雅史 徳島大学医学部保健学科放射線科
研究協力者：藤田 浩司 徳島大学大学院医科学教育部
研究協力者：前田 哲也 秋田県立脳血管研究センター神経内科
研究協力者：町田 明 東京都立墨東病院
研究協力者：村山 繁雄 東京都老人総合研究所
研究協力者：山田 正仁 金沢大学大学院医学系研究科 (五十音順)

研究要旨

背景：MRIをはじめとして画像技術の進歩には目覚ましいものがある。しかし、現時点では画像基準を取り入れたプリオン病の診断基準は存在しない。目的：本研究では、治療法が確立される日に備えて、画像所見を加えたプリオン病、特に孤発性 CJD の新たな早期診断基準の作成を目指す。方法：平成 18 年度から班員の他に外部専門委員を加えたプリオン病画像小委員会を設置した。この小委員会で以下の検討を行った。(1) 稀な病型の画像収集、(2) MRI 特に拡散強調画像 (DWI) の標準化、(3) SPECT 画像の診断意義の検討、(4) 画像に組み合わせる生物マーカーの評価、(5) プリオン病診断における高磁場 MRI の評価、(6) 画像所見を加えた早期診断基準と診断・登録フローチャートの作成、である。結果：プリオン病の希少病型の画像を収集した (志賀・浜口・山田ら)、SPECT 画像の特徴を明らかにした (長田・前田・高野ら)。早期診断における髄液タウの意義を検討し (調・佐藤ら)、高磁場 MR 装置の診断的意義を検討した (原田ら)。早期診断の為のフローチャート案を提案した (藤田・湯浅ら)。考察：早期診断には、MRI-DWI は有用である。しかし、診断精度をあげるためには、標準化 DWI で検討すべきである。極めて早期、或は特殊な例では、MRI-DWI にても変化の捉えられないことがある。そのような場合でも SPECT にて

脳血流の低下所見が見つかる場合もあり、早期診断は、標準化 DWI,又は SPECT と髄液の総タウ量の組み合わせによってなされる。

A. 研究目的

プリオン病には様々な病型が存在し、それぞれ特有の臨床症状を呈す。孤発性 CJD (sCJD) が最も一般的な疾患である。sCJD は経過が速く、将来治療法が確立したとしても、早期診断が重要なポイントとなる。今日脳の画像技術の進歩は目覚ましく、プリオン病の診断に威力を発揮する。我々は、近い将来プリオン病の治療法が確立されることを念頭に置いてプリオン病早期診断の為の診断基準を定めておく必要がある。本研究では、最新の画像技術、或は生物学的マーカーを組み合わせ、プリオン病、特に sCJD の早期診断基準の作成を目指す。

B. 研究方法

平成 18 年度から本研究班内に班員と外部専門委員からなるプリオン病画像小委員会を設置した。そして、(1) 稀な病型の画像収集、(2) MRI 特に拡散強調画像 (DWI) の標準化、(3) SPECT 画像の診断意義の検討、(4) 画像に組み合わせる生物マーカーの評価、(5) プリオン病診断における高磁場 MRI の評価、(6) 画像所見を加えた早期診断基準と診断・登録フローチャートの作成など検討した。

(倫理的配慮)

本研究では、患者に直接介入することはない。専ら個別の臨床の範囲を越えず、個々に得られる画像や臨床検査値を利用して実施した。多施設で検討する事項は、それぞれ必要に応じて個々の施設・組織における倫理委員会での承認を得た。

C. 研究結果

(1) MRI-T2 強調画像, FLAIR 画像

sCJD の T2 強調画像では、一般的に線条体における両側対称性の高信号が知られている。しかし、初期にはこれらの変化は軽微であり、感度も高くない。また、大脳皮質と線条体のコントラストで線条体の高信号が重視されるが、早期ではこの点も一概にそうとは言えない。むしろ現在では皮質にも高信号が出現することが認識されるようになった。尚、皮質病変は T2WI よりも FLAIR 画像の方が明瞭である。

(2) 拡散強調画像 (DWI)

MRI-DWI は sCJD の早期病変を検出する。皮質、線条体などに明瞭な高信号を認める。Demaerel らは possible または probable sCJD 12 例で病理所見を確認した上で、DWI は感度・特異度・陽性的中率ともに 100%であったという。このように DWI は、脳波や従来の MRI より明らかに診断能に優れるため、プリオン病を疑えば早期に DWI を施行すべきである。このように有用な DWI であるが、日を変えて経過観察したり、異なる施設の異なる機種を比較する為には、あるいは、病変を正確に検出する為には、DWI の表示条件の標準化が必要である。DWI の標準化手法としては、DWI ($b=1,000\text{mm}^2/\text{s}^2$) と同時に取得される b_0 画像の正常脳実質の信号強度を計測し、その値を window 幅、その 1/2 を window レベルとする方法 (ASIST-Japan 標準化手法) による。この標準化条件では正常皮質は高信号を呈さず、また淡い皮質病変も良好に認められ、早期診断に適した条件と考えられた。

(3) PET 或は SPECT 画像

CJD の診断に際し、PET や SPECT による脳循環代謝測定を加えて行うことで、早期診断ないし診断精度向上に結びつくと期待される。

PET は半減期の極めて短い核種を用いて、脳血流量（CBF）に加えて、脳酸素消費量、脳グルコース消費量（CMRGlc）などを定量的に測定することができる。CJD において PET では、MRI 上の形態変化よりも早期に脳循環代謝量の低下として病巣を検出することができる。

SPECT は、PET に比べると画像分解能、定量性ともに劣るが、検査は遥かに簡便でコストも安く、CBF の相対値を測定する ^{123}I -IMP, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ECD による測定が普及している。CJD の病早期では、DWI 高信号病変の出現に先行して SPECT で脳血流の低下を捉えることができる。また、DWI 高信号病変よりも広範に低灌流を認める場合には、その後 DWI の病巣がさらに拡大する可能性を示唆している。

(4) 非典型例の画像所見

急速に認知症が進行し全身性ミオクローヌスを呈し、脳波で PSWCs を認める症例を典型的 CJD と定義し、こういった症状、検査所見を呈さない症例を非典型的 CJD と定義する。PSWCs を呈さない非典型的 CJD 自験 11 例の遺伝子検査所見、髄液特殊蛋白検査所見、DWI 所見を検討した。この様な症例では髄液 neuron-specific enolase（NSE）や 14-3-3 蛋白、tau 蛋白の陽性率が低い傾向にあるが、DWI では異常所見が検出されることが多い。個々のタイプで特徴的な画像所見を呈するものがある。

MM2 型 sCJD、MV2 型 sCJD、VV2 型 sCJD、V180I 遺伝性 CJD、M232R 遺伝性 CJD などの特徴を報告したが、例えば codon180 変異例では、後頭葉が比較的保たれる、あるいは、sCJD-MM2 視床型では、MRI-DWI での病変検出が困難である。

(5) 鑑別疾患

DWI を含め MRI は CJD の診断に有用であるが、画像上鑑別を要する疾患も多数存在する。髄膜脳炎などの中枢神経感染症や辺縁系

脳炎、MELAS、低血糖脳症、CO 中毒、低酸素性虚血性脳症、reversible posterior leukoencephalopathy syndrome (RPLS)、Leigh 脳症、Wilson 病、悪性リンパ腫、痙攣重積 などである。また、橋本脳症、ビタミン欠乏症などが挙げられる。これらを鑑別するためには、発症様式や検査所見を総合して判断することが必要である。

一定の間隔（2 週間程度）をおいて再検することで鑑別しやすくなる。例えば、follow up にて病変が縮小あるいは消退している場合は、他疾患の可能性が高くなる。

D. 考察

プリオン病に特異的な症状はないものの、以下の症状や条件の揃う患者ではプリオン病を疑う。即ち、「物の見え方が変」などといった視覚異常、原因不明の体のふらつき、極めて初期の失行・失認、或は、言葉が出にくいなど高次機能障害、その他、とまどい、記憶の不確実性、わずかな行動異常や性格変化、更にはうつ傾向などを呈す患者では、まず疑診することが大切である。およそ 2 週間程度の観察期間に明らかな症状の増悪があればより疑わしいと考える。この間、家族による症状の記録が極めて有用である。

画像所見にて、大脳皮質、線条体、または視床に、DWI の高信号所見のある例では、髄液の tau 蛋白を測定して、それが 1,300 mg/dl 以上の高値を示すものでは、プリオン病の初期診断 probable と判定する。また、疑わしき臨床症状があつて初回 DWI が陰性の例では、2 週後に DWI を再検する。と同時に SPECT 検査を行なつて陽性例では、DWI が陰性であっても髄液 tau を測定し、高値であれば、プリオン病の初期 probable と判断する。SPECT における陽性所見とは、大脳皮質、線条体、または視床における血流低下の所見を特徴とする。そして SPECT が陰性の例では、プリオン蛋白遺伝子解析をオーダーし、

結果を待つ。それと平行してプリオン病以外の他の疾患の鑑別診断を行う（プリオン病早期診断のためのフローチャート 案参照）。

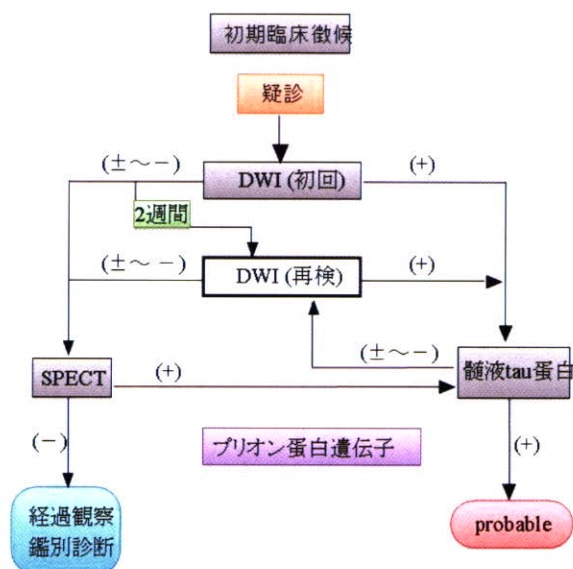
以下に画像所見を取り入れた sCJD 早期診断基準（案）を提示する。まず（1）臨床徴候として、視覚異常、ふらつき、高次機能障害、物忘れ、ミオクローヌス、錐体路/錐体外路障害の中からの 2 つ以上の症候を有し、かつ（2）画像所見として、大脳皮質、線条体、視床の DWI における高信号、又は、SPECT における血流低下所見のどちらかがあって、

更に、（3）髄液の tau 蛋白の高値（ $\geq 1,300$ mg/dl）をもって判断する。（1）と（2）の組み合わせがあれば、初期診断 possible と判定し、（1）+（2）+（3）を満たす例では初期診断 probable と判定する（表）。

E. 結論

過去 3 年間の検討を通して、プリオン病早期診断のための画像を用いた診断フローチャート案と画像所見を取り入れた sCJD 早期診断基準（案）を提案した。今後は、これらの案

画像を用いた診断フローチャート案



図：プリオン病早期診断のためのフローチャート（案）

表：画像所見を取り入れた sCJD 早期診断基準（案）

1. 臨床徴候: 以下のうち2つ以上
視覚異常 ふらつき 高次機能障害
物忘れ ミオクローヌス 錐体路/錐体外路障害
2. 画像所見: 以下のいずれか
A. DWIにおける高信号 (大脳皮質, 線条体, または視床)
B. SPECTにおける血流低下 (大脳皮質, 線条体, または視床)
3. 髄液所見
tau蛋白陽性 ($\geq 1,300$ mg/dl)
判定:
1+2 => early possible, 1+2+3 => early probable (→ 治療開始へ)

に沿って症例を登録して、これらの基準案の精度を検証して行かなければならない。

F. 健康危険情報
特になし

G. 研究発表
特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

わが国の CJD サーベイランスにおける問題例：変異型 CJD 疑い例の MRI 所見

分担研究者：山田 正仁 金沢大学・大学院医・脳老化・神経病態学（神経内科）
研究協力者：野崎 一朗 金沢大学・大学院医・脳老化・神経病態（神経内科）
研究協力者：浜口 毅 金沢大学・大学院医・脳老化・神経病態（神経内科）
研究協力者：篠原もえ子 国立病院機構医王病院・神経内科
研究協力者：森若 文雄 北海道医療大学・心理学・言語聴覚療法
研究協力者：志賀 裕正 仙台富沢病院・内科
研究協力者：三條 伸夫 東京医科歯科大学・大学院医歯・脳神経病態（神経内科）
研究協力者：村山 繁雄 東京都老人総合研究所・老人病のゲノム解析研究チーム・
高齢者ブレインバンク
研究協力者：黒岩 義之 横浜市立大学・医・神経内科
研究協力者：西澤 正豊 新潟大学・脳研究所・神経内科
研究協力者：葛原 茂樹 国立精神神経センター武蔵病院
研究協力者：武田 雅俊 大阪大学・大学院医・精神医学
研究協力者：黒田 重利 岡山大学・大学院医歯・精神神経病態
研究協力者：村井 弘之 九州大学・大学院医・神経内科
研究協力者：北本 哲之 東北大学・大学院医・病態神経
研究協力者：中村 好一 自治医科大学・医・公衆衛生
研究協力者：立石 潤 老人保健施設・春風
研究協力者：佐藤 猛 東大和病院・神経内科
研究協力者：水澤 英洋 東京医科歯科大学・大学院医歯・脳神経病態（神経内科）

研究要旨

1999年4月から2007年9月までにCJDサーベイランス委員会が調査した1222例中12例（1%）が変異型CJD（vCJD）の疑いにて緊急調査され、うち1例がvCJDと確認された。vCJD以外の11例中、6例がMRI上の視床高信号によりvCJDが疑われた。この6例中4例はvCJD以外のプリオン病であり、vCJDとの画像上の鑑別が問題となった。この4例は孤発性CJD MV2型2例、硬膜移植後CJD（dCJD）1例、GSS（コドンP102L変異）1例からなり、dCJD、GSSの拡散強調画像（DWI）では“pulvinar sign”に合致する所見を認めた。Pulvinar signはT2強調画像及びFLAIR画像に基づいて提唱されたものであり、DWIに適用した場合、vCJD診断上の特異度は低下することが示唆された。

A. 研究目的

Creutzfeldt-Jakob病（CJD）サーベイランス委員会は、2005年2月、わが国初の変

異型CJD（vCJD）例を確認した¹⁾。本報告は、CJDサーベイランス委員会がこれまでにvCJDの疑いにて緊急調査を行った症例の中

で、MRI 所見が vCJD に類似していたため vCJD の疑いにて CJD サーベイランス委員会が緊急調査を行った症例の MRI 所見の特徴を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1999 年から 2007 年 9 月までに、現行のサーベイランスシステムにより調査された 1222 例のうち、「vCJD の疑いあり」との情報により緊急調査を行った症例の MRI を検討した。

(倫理面の配慮)

CJD サーベイランスは、委員長の所属施設である金沢大学医の倫理審査委員会の承認を得て、それに基づく説明と同意のもとに行われた。

C. 研究結果

1222 例のうち、「vCJD の疑いあり」とされ緊急調査を行ったケースは 12 例 (1%) あった。12 例 (男 7/女 5) の調査時年齢 3 ~ 62 歳であった。vCJD が疑われた理由は、MRI 上の視床高信号や若年発症の精神神経症状であった。調査後の診断は以下のようであった：

1. vCJD1 例 (確実例)
2. その他のプリオン病 7 例 [内訳：孤発性 CJD 5 例 (MM2 視床型 3 例 (確実 2 例/疑い 1 例)、MV2 型 2 例 (確実 1 例/疑い 1 例)、硬膜移植後 CJD 1 例、コドン 102 変異に伴う Gerstmann-Sträussler-Scheinker 病 (GSS102) 1 例]。
3. プリオン病以外 4 例 [内訳：Wernicke 脳症 1 例、脳幹脳炎の疑い 1 例、てんかん+悪性症候群 1 例、infantile neuroaxonal dystrophy 1 例]。

本邦唯一の vCJD 確実例 1) を除く 11 例中、vCJD 診断に有用とされる視床高信号を示す MRI 所見により vCJD が疑われた例は 6 例あ

り、内訳は sCJD MV2 型 2 例、dCJD, GSS102、Wernicke 脳症、infantile neuroaxonal dystrophy 各 1 例であった。この 6 例中 vCJD との鑑別が特に問題となったのはプリオン病の 4 例であった。

sCJD MV2 型 2 例については、1 例 (確実例) (59 歳男性) では、拡散強調画像 (DWI) 及び FLAIR 画像では左右対称性の両側視床の高信号は尾状核及び被殻前方の高信号と同程度、T2 強調画像 (T2WI) では基底核前方の方が視床より高信号であった。もう 1 例 (疑い例) (62 歳女性) では、DWI 及び FLAIR 画像で、視床よりも基底核前方がより高信号で、やや右側優位であった。

dCJD プラーク型 (疑い例) (24 歳女性) では、DWI では両側視床枕が基底核と較べてより高信号であり大脳皮質の一部にも高信号を認めた。FLAIR 及び T2WI では両側視床と基底核前方の高信号は同程度であった。緊急調査後、硬膜移植歴が判明した。

GSS102 例 (ほぼ確実例) (32 歳男性) では、DWI で両側視床 (視床枕及び背内側核) 優位の高信号及び皮質の高信号が明らかで、T2WI では両側基底核前方及び視床に同程度の高信号を認めた。家族歴はなかったが、緊急調査後、P102L 変異が検出された。

D. 考察

dCJD 及び GSS102 の DWI で “pulvinar sign” に合致する所見を認めた。dCJD プラーク型²⁾ では視床高信号がみられる³⁾。Pulvinar sign は T2WI、FLAIR 画像に基づいて提唱されたものであり、DWI に適用すると vCJD 診断上の特異度は低下するものと考えられる。

sCJD MV2 型では視床高信号を認めるものの、pulvinar sign 陽性と判定できる例はなかった。sCJD MV2 型では時に vCJD 類似の MRI 所見を呈する例があることが報告されている^{4,5)}。

以上のことから、vCJD 類似の MRI 所見を呈する例の診断では、dCJD (プラーク型) や遺伝性プリオン病を病歴や遺伝子検査によって除外すること、sCJD では MV2 型を鑑別することが重要であると考えられた。

E. 結論

1. dCJD 及び GSS102 の DWI で“pulvinar sign”に合致する所見を認めた。Pulvinar sign は T2WI、FLAIR 画像に基づいて提唱されたものであり、DWI に適用すると vCJD 診断上の特異度は低下する。
2. sCJD MV2 型では視床高信号を認めるものの、pulvinar sign 陽性と判定できる例はなかった。
3. vCJD 類似の MRI 所見を呈する例の診断では、dCJD (プラーク型)、遺伝性プリオン病の除外、sCJD MV2 型との鑑別が重要である。

[参考文献]

1. Yamada M on behalf of the Variant CJD Working Group, CJD Surveillance Committee, Japan. The first Japanese case of variant Creutzfeldt-Jakob disease showing periodic electroencephalogram. *Lancet* 2006; 36; 874.
2. Noguchi-Shinohara M, Hamaguchi T, Kitamoto T, Sato T, Nakamura Y, Mizusawa H, Yamada M. Clinical features and diagnosis of dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 2007; 69; 360-367.
3. Wakisaka Y, Santa N, Doh-ura K, Kitamoto T, Ibayashi S, Iida M, Iwaki T. Increased asymmetric pulvinar magnetic resonance imaging signals in Creutzfeldt-Jakob disease with florid plaques following a cadaveric dura

mater graft. *Neuropathology* 2006; 26; 82-88.

4. Haik S, Brandel JP, Oppenheim C, Sazdovitch V, Dormont D, Hauw JJ, Marsault C. Sporadic CJD clinically mimicking variant CJD with bilateral increased signal in the pulvinar. *Neurology* 2002; 58; 148-149.
5. Martindale J, Geschwind MD, De Armond S, Young G, Dillon WP, Henry R, Uyehara-Lock JH, Gaskin DA, Miller BI. Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease mimicking variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch Neurol.* 2003; 60; 767-770.

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表 (2007/4/1~2008/3/31 発表)

1. 論文発表

1. Noguchi-Shinohara M, Hamaguchi T, Kitamoto T, Sato T, Nakamura Y, Mizusawa H, Yamada M. Clinical features and diagnosis of dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 2007; 69; 360-367.
2. Shiga Y, Satoh K, Kitamoto T, Kanno S, Nakashima I, Sato S, Fujihara K, Tkata H, Nobukuni K, Kuroda S, Takano H, Umeda Y, Konno H, Nagasato K, Satoh A, Matsuda Y, Hidaka M, Takahashi H, Sano Y, Kim K, Konishi T, Doh-ura K, Sato T, Sasaki K, Nakamura Y, Yamada M, Mizusawa H, Itoyama Y. Two different clinical phenotypes of Creutzfeldt-Jakob disease with a M232R substitution. *J Neurol* 2007; 254; 1509-1517.
3. 山田正仁. プリオン病の up date. *臨床神*

経.2007: 47; 805-808.

4. 山田正仁. プリオン病. 分子精神医学. 2007: 10; 396-398.
 5. 浜口 毅, 篠原もえ子, 山田正仁. CJD, vCJDの世界的現状と将来.臨床と微生物. 2007: 34; 417-423.
 6. 篠原もえ子, 浜口 毅, 山田正仁. プリオン病. 疫学とサーベイランス体制. 日本臨床 2007: 65; 1379-1383.
 7. 山田正仁. プリオン病の二次感染. Neuroinfection 2007: 12; 74-80.
 8. 篠原もえ子, 浜口 毅, 山田正仁. 五類感染症 (全数把握): クロイツフェルト・ヤコブ病. 日本臨床 (増刊号: 新感染症学・下) 2007: 65 (増刊号 3); 295-298.
 9. 山田正仁. クロイツフェルト・ヤコブ病. 葛原茂樹 (監修) 精神・神経疾患画像アトラス.メディカルレビュー社, 東,2007: 117-121.
 10. 浜口 毅, 野崎一朗, 篠原もえ子, 山田正仁. 医原性プリオン病. 神経内科 (印刷中)
 11. 山田正仁, 篠原もえ子, 浜口 毅, 野崎一朗. 日本におけるヒトプリオン病のサーベイランスと疫学的実態. 水澤英洋 (編) プリオン病と遅発性ウイルス感染症 (印刷中) .
 12. 浜口 毅, 野崎一朗, 篠原もえ子, 山田正仁. 特発性プリオン病 (孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病): MM2 視床型と皮質型.水澤英洋 (編) プリオン病と遅発性ウイルス感染症 (印刷中)
2. 学会発表
 1. Yamada M, Nakamura Y, Akino K. CJD surveillance in Japan. European and Associated Countries Collaborative CJD Surveillance Groups Meeting. Hameln, Germany. 7-9 June, 2007.
 2. Yamada M, Noguchi-Shinohara M, Hamaguchi T, Kitamoto T, Sato T, Nakamura Y, Mizusawa H. CJD Surveillance Committee Japan. Plaque and Non-plaque Types of Dura Mater Graft-associated Creutzfeldt-Jacob Disease; Clinicopathological and Molecular Analysis. Prion 2007. Edinburgh, UK, Sep 26-28, 2007.
 3. Hamaguchi T, Noguchi-Shinohara M, Nakamura Y, Sato T, Kitamoto T, Mizusawa H, Yamada M. Ophthalmic Surgery in Prion Disease. Prion 2007. Edinburgh, Sep 26-28, 2007.
 4. 山田正仁. ヒトプリオン病の最近の動向. 平成 19 年度日本内科学会生涯教育講演会.大阪. 2007.2.4.
 5. 山田正仁. プリオン病の up date. 第 48 回日本神経学会総会, 名古屋, 2007.5.16-18.
 6. 調 漸, 佐藤克也, 江口勝美, 志賀裕正, 浜口 毅, 山田正仁, 三條伸夫, 水澤英洋. 日本のプリオン病患者における脳脊髄液マーカーと画像検査の検討. 第48回日本神経学会総会. 名古屋. 2007.5.16-18.
 7. 篠原もえ子, 浜口 毅, 北本哲之, 佐藤 猛, 水澤英洋, 中村好一, 山田正仁. CJD サーベイランス委員会.わが国における孤発性 CJD (sCJD) の特徴. 第 48 回日本神経学会総会. 名古屋. 2007.5.16-18.
 8. 佐村木美晴, 森永章義, 野崎一朗, 篠原もえ子, 小野賢二郎, 古井英介, 石田千穂, 山田正仁. 非プラーク型硬膜移植後クロイツフェルト・ヤコブ病の 1 剖検. 第 48 回日本神経病理学会総会学術研究会. 東京. 2007.5.30-6.1.
 9. 山田正仁, 篠原もえ子, 野崎一朗, 浜口 毅, 中村好一, 北本哲之, 佐藤 猛, 水澤英洋. CJD サーベイランス委員会. わが国におけるヒトのプリオン病の実態: 最近のサーベイランスデータ. 2007 年プリ

オン研究会, 新潟, 2007.8.25-26.

10. 浜口 毅, 篠原もえ子, 野崎一朗, 中村好一, 北本哲之, 佐藤 猛, 水澤英洋, 山田正仁. CJD サーベイランス委員会. 孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病における医療行為の実態. 2007 年プリオン研究会, 新潟, 2007.8.25-26.
11. 志賀裕正, 北本哲之, 森若文雄, 佐藤 猛, 三條伸夫, 黒岩義之, 西澤正豊, 武田雅俊, 葛原茂樹, 黒田重利, 村井弘之, 村山繁雄, 立石 潤, 中村好一, 水澤英洋, 山田正仁. 日本の遺伝性プリオン病—欧州症例との相違. 2007 年プリオン研究会, 新潟, 2007.8.25-26.
12. 篠原もえ子, 浜口 毅, 野崎一朗, 北本哲

之, 佐藤 猛, 水澤英洋, 中村好一, 山田正仁. 硬膜移植後 Creutzfeldt-Jakob 病の臨床的特徴および診断. 第12回日本神経感染症学会総会, 福岡, 2007.10.12-13.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

髄液中 14-3-3 タンパク質測定用スタンダード作製

研究協力者：佐多徹太郎 国立感染症研究所感染病理部

研究協力者：飛梅 実 国立感染症研究所感染病理部

研究協力者：佐藤 克也 長崎大学医学部第一内科

研究協力者：山河 芳夫 国立感染症研究所細胞化学部

研究協力者：小野 文子 （社）予防衛生協会

研究要旨

14-3-3 タンパク質は CJD の病態進行に伴い髄液中から検出され、CJD 診断の補助検査として有用である。しかしながら、国内では濃度基準が存在していない。本研究では、国内での髄液中 14-3-3 タンパク質濃度基準を決定するため、標準標品（スタンダード）として 14-3-3 タンパク質を精製し、14-3-3 タンパク質の髄液中濃度測定施設へ供給することを目的とする。

A. 研究目的

14-3-3 タンパク質はプリオンタンパク質の神経細胞での増殖に伴って誘導される、神経細胞の崩壊に伴い髄液中に放出されることが考えられる。このため、WHO による CJD の補助的診断として髄液中 14-3-3 タンパク質濃度測定が示されている。国内では限定された施設により検査されているが、全国の統一濃度基準はない。本研究では CJD 早期診断としての髄液中 14-3-3 濃度測定精度を向上させるため、全国標準としての精製 14-3-3 を作製し、国内統一基準作製に寄与することを目的とする。

B. 研究方法

検査基準濃度を決定するための精製 14-3-3 タンパク質を作製する。髄液中の 14-3-3 タンパク質検出系にはウエスタンブロット法を用いるため、検出抗体の反応性、転写効率への影響を考慮し、His 融合タンパク質としてヒト細胞株を用いて発現させ精製する。また、14-3-3 γ 及び β タンパク質の分

子量はほぼ同じであることから、従来検出に用いていた 14-3-3 γ 及び β タンパク質に対する抗体の特異性について検討する。

（倫理面への配慮）

培養細胞を用いた実験であり倫理的にとくに問題となるものはない。

C. 研究結果

14-3-3 タンパク質発現ベクターとしてインビトロジェン社の pcDNA6 HisMAX ベクターを用いた。cDNA ライブラリーより特異的プライマーで増幅した 14-3-3g タンパク質および 14-3-3b タンパク質 cDNA をクローニングサイトに挿入し His 融合 14-3-3 タンパク質発現ベクターを構築した。発現細胞には 293T 細胞を用い、トランスフェクションにはロッシュ社の fugen6 を用いた。トランスフェクション 72 時間後に細胞を回収し、1%triton を含む細胞破碎液に撹濁後しソニケーションにより細胞を破碎した。破碎液に含まれる His 融合 14-3-3 タンパク質をニ

ッケルビーズを用いたバッチ法により回収した。透析により PBS に置換後、SDS-Page により純度の確認を行った。BCA 法及び吸光度測定により濃度を算出し、精製タンパク質濃度を 200ug/ml に調整した。精製タンパク質の抗体との反応性を検討するため、ウエスタンブロット法を用いて検討した。

D. 考察

His 融合 14-3-3 γ タンパク質は、従来検出に用いている抗体との反応性は同等で、段階希釈においても直線性は良好であった。しかしながら、14-3-3 β タンパク質検出に用いていた抗体は 14-3-3 γ タンパク質に対しても反応性を有することが精製タンパク質を用いた解析より明らかとなった。

E. 結論

今回作製した His 融合 14-3-3 γ タンパク質は、抗体との反応性、段階希釈における反応の直線性および再現性等良好であった。現在髄液中 14-3-3 タンパク質濃度測定を行っている各施設に於いて同一の標準品を用いることで、国内での検査基準値を設定できると考える。また、14-3-3 β タンパク質に対する特異的抗体の検索及び作製を行い、14-3-3 タンパク質の各アイソフォームの髄液中濃度と病態との関連性について検討を行う予定である。

[参考文献]

1. Takahashi H, et al. Increased levels of epsilon and gamma isoforms of 14-3-3

proteins in cerebrospinal fluid in patients with Creutzfeldt-Jakob disease. Clin Diagn Lab Immunol 1999; 6 (6) : 983-985.

F. 健康危険情報

培養細胞を用いた実験であり倫理的にとくに問題となるものはない。

G. 研究発表 (2007/4/1~2008/3/31 発表)

1. 論文発表

1. Hagiwara K, Yamakawa Y, Sato Y, Nakamura Y, Tobiume M, Shinagawa M, Sata T. Accumulation of mono-glycosylated form-rich, plaque-forming PrPSc in the second atypical bovine spongiform encephalopathy case in Japan. Jpn J Infect Dis 2007 Sep; 60 (5) : 305-308.

2. 学会発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

本邦のプリオン病患者の脳脊髄液の診断マーカーと画像検査の検討

分担研究者：調 漸 長崎大学医学部・歯学部附属病院へき地病院再生支援・教育機構
研究協力者：佐藤 克也 長崎大学医学部・歯学部附属病院へき地病院再生支援・教育機構
主任研究者：水澤 英洋 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科脳神経病態学

研究要旨

CJD 患者における脳脊髄液を用いた生化学的補助診断法として 14-3-3 蛋白などの幾つかのマーカーの意義が報告されている。これまでに我々は CJD 患者脳脊髄液中の 14-3-3 蛋白、総 tau 蛋白（定量）とリン酸化 Tau 蛋白（定量）の診断的意義を検討し、総 tau 蛋白、次いで 14-3-3 蛋白の検出が診断的に有用であること、総 tau 蛋白（定量）とリン酸化 Tau 蛋白（定量）の比はアルツハイマー型痴呆患者で脳脊髄液中 Tau 蛋白高値の症例との鑑別診断に有用であることを報告してきた。

現在まで 14-3-3 蛋白の報告は数多くあるものの、14-3-3 蛋白の判定基準は明確でないことから本年度はこの問題点をできるだけ明確にすることを目標とし、14-3-3 蛋白の判定基準を明確にすることが可能にできたので報告した。

CJD 患者 112 症例での脳脊髄液（総 tau 蛋白、14-3-3 蛋白）、MRI 拡散強調画像でのデータを示し、孤発例では総 tau 蛋白測定の有用性が示し、総タウ蛋白>14-3-3 蛋白>NSE>S-100 蛋白の順に感度・陽性率が高いことを証明したので報告する。

A. 研究目的

プリオン病の治療法の新規薬剤の開発および臨床治験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。

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、更に近年 Otto らは 14-3-3 protein 陰性の CJD 患者における脳脊髄液中の総 tau 蛋白の意義を報告した。平成 15 年度に本研究班で我々は CJD 患者髄液中の 14-3-3 蛋白、総 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報告した。

本年度は 14-3-3 蛋白の検出は Western blot 法による定性的な検査であることから判

定基準は明確ではない。その客観化のためには「同じサンプルを被験者の違う 2 人で行う、又は判定に利用した 2 人の研究者による 2 重判定する」など、効率が悪く、手間がかかる。この問題点をできるだけ明確に施行できるように改良することを目的とした。その結果、本年度の研究にて 14-3-3 蛋白の判定基準を明確化することが可能になり得た。

B. 研究結果

1. 脳脊髄液中の 14-3-3 蛋白 β 及び γ アイソフォームでの判定基準の明確化

本研究班研究協力者の飛梅実研究協力者より提供された既知濃度の 14-3-3 蛋白 β 及び γ アイソフォームのリコンビナント蛋白を基準として CJD 患者での脳脊髄液サンプルを用いて、Western blot 法にて検出し、半定量

化を試みた。CJD 患者（112 例）とその他の認知症患者（93 例）の検体を用いて 14-3-3 蛋白 β 及び γ アイソフォームの半定量化を行い、cut-off 値を決定した。

2. 多数例における脳脊髄液中の生化学マーカー、画像、脳波の検討

2-1. 対象

対象は CJD 患者（112 例）と対照群として認知症患者（93 例）とした。（表 1）

2-2. 方法

a. 対照群（N=93）と CJD 患者（N=112）の脳脊髄液 14-3-3 蛋白（14-3-3- β 及び γ アイソフォーム定性）（IBL）抗体を用いて検討を行った。

b. 対照群（N=93）と CJD 患者（N=112）において脳脊髄液中の Tau 蛋白定量（Innogenetics 社）による比較検討を行った。

c. 対照群（N=93）と CJD 患者（N=112）において脳脊髄液中の S-100b 蛋白、NSE 蛋白は SRL に委託した。

d. 対照群（N=93）と CJD 患者（N=112）において画像検査（拡散強調画像）による比較検討を行った。

C. 研究結果

1. Western blot 法の統一プロトコールを作成した。（表 2）

1-a. 14-3-3 蛋白の β アイソフォームのリコンビナント蛋白にてスタンダードサンプルを Western blot 法にアッセイし、ECL 処理後 Las mini system を利用し、検出限界を検定した。 β アイソフォームについては 1 回ごとの結果が異なるために Western blot 法を行うたびにスタンダードサンプルを置き、半定量化を行った（図 1, 2）。CJD 患者（112 例）と認知症患者（93 例）において半定量化し、cut-off 値を決定した。

1-b. 14-3-3 蛋白 γ アイソフォームのリコンビナント蛋白を用いてスタンダードサンプルとし Western blot 法にてアッセイし、

ECL 処理後 Las mini system を利用し、検出限界を検定した。 β アイソフォームについては 1 回ごとの結果が大きく異なるために Western blot 法を行うたびにスタンダードサンプルを置き、半定量化を行った（図 3, 4）。CJD 患者（112 例）と認知症患者（93 例）において半定量化し、cut-off 値を決定した。

2. 総タウ蛋白、NSE 及び S-100b 蛋白の測定・における cut off 値の結果

a. 総タウ蛋白

Inogenetics 社製総タウ蛋白（ELISA キット）。cut off 値は ROCcurve にて決定した。cut-off 値は 1260pg/ml とした。（ヨーロッパ基準では 1300pg/m）

b. NSE

栄研 NSE キット。（SRL に委託）。cut off 値は ROCcurve にて決定した。cut-off 値は 35ng/ml とした。（ヨーロッパ基準では 25pg/m）

c. S-100b 蛋白

SRL に委託。cut off 値は ROCcurve にて決定した。cut-off 値は 2.2 ng/ml とした。（ヨーロッパ基準 4.2pg/m としている。）

3. プリオン病患者 112 例中の病型別分類のプロファイリングは表で示す。又 CJD 患者（N=112）における画像検査（MRI 拡散強調画像）、脳脊髄液（t-tau 蛋白、14-3-3 蛋白（14-3-3- β 定性）による比較検討の結果では古典型 CJD（94 例）において MRI 拡散強調画像 95.70% 脳脊髄液（総 tau 蛋白 96.80%、14-3-3 蛋白（14-3-3- β 定性 95.70%、14-3-3- γ 定性 96.8%））であった。MM2 皮質型 4 例において MRI 拡散強調画像 100%、脳脊髄液（総 tau 蛋白 100.00%、14-3-3 蛋白（14-3-3- β 定性）50%、14-3-3- γ 定性 75%）であった。112 例画像検査（MRI 拡散強調画像）92.30%、脳脊髄液（総 tau 蛋白 95.50%、14-3-3 蛋白（14-3-3- β 定性 86.60%、14-3-3- γ 定性 88.3%））であった。

D. 考察

1. 脳脊髄液中の 14-3-3 蛋白の陽性・陰性における判定基準が明確化された。

2. 112 症例における病型分類での脳脊髄液（総 tau 蛋白、14-3-3 蛋白、NSE、S-100b 蛋白）、MRI 拡散強調画像でのデータを示した。脳脊髄液中での総タウ蛋白は 14-3-3 蛋白より検出率感度が高い。（総タウ蛋白 > 14-3-3 蛋白 > NSE > S-100b 蛋白）

3. 拡散強調画像での検出率は 92.3%であった。

E. 結果

脳脊髄液中の生化学的マーカーとして 14-3-3 蛋白検出が半定量的に可能となり、検出限界の設定も行えたが、このデータとの比較においても総タウ蛋白最も陽性率が最も高かった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Shiga Y, Satoh K, Kitamoto T, Kanno S, Nakashima I, Sato S, Fujihara K, Takata H, Nobukuni K, Kuroda S, Takano H, Umeda Y, Konno H, Nagasato K, Satoh A, Matsuda Y, Hidaka M, Takahashi H, Sano Y, Kim K, Konishi T, Doh-Ura K, Sato T, Sasaki K, Nakamura Y, Yamada M, Mizusawa H, Itoyama Y. Two different clinical phenotypes of Creutzfeldt-Jakob disease with a M232R substitution. *J Neurol* 2007; Nov 2: 1509-1517.
2. Satoh K, Shirabe S, Tsujino A, Eguchi H, Motomura M, Honda H, Tomita I, Satoh A, Tsujihata M, Matsuo H,

Nakagawa M, Eguchi K. Total tau protein in cerebrospinal fluid and diffusion-weighted MRI as an early diagnostic marker for

Creutzfeldt-Jakob disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2007; 24: 207-212.

3. Kuwata K, Nishida N, Matsumoto T, Kamatari O.Y, Muto H.J, Kodama K, Nakamura KH, Kimura K, Kawasaki M, Takakura Y, Shirabe S, Takata J, Kataoka Y, Katamine S. Hot spots in prion protein for pathogenic conversion. *PNAS* 2007; 104 (29) : 11921-11926.
4. Satoh K, Shirabe S, Eguchi H, Tsujino A, Motomura M, Satoh A, Tsujihata M, Eguchi K. Chronological Changes in MRI and CSF Biochemical Markers in Creutzfeldt-jakob Disease Patients. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2007; 23: 372-381.
5. 佐藤克也, 調 漸, 江口勝美. 孤独性プリオン病（孤発性古典型 CJD, 視床型 CJD, MM2 皮質型 CJD）. *日本臨床* 2007; 65 (8) : 1423-1432.

2. 学会発表

1. 佐藤克也 他. プリオン感染腎特異的遺伝子発現とヒトプリオン病での意義. 第 48 回日本神経学会総会, 愛知, 2007.05.16-18.
2. 調 漸, 佐藤克也, 江口勝美, 志賀裕正, 浜口 毅, 山田正仁, 三條伸夫, 水澤英洋. 日本のプリオン病患者における脳脊髄液マーカーと画像検査の検討. 第 48 回日本神経学会総会, 愛知, 2007.05.16-18.
3. 佐藤克也, 中桶了太, 西浦義博, 辻野 彰, 福田 卓, 江口博人, 福島直美, 本村政勝, 調 漸, 江口勝美, 吉村俊朗. 脳ドッグにて発見されたクロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) 患者に対する quinacrine 投与

経験、第 25 回日本神経治療学会総会，宮城，2007.6.21-22.

4. 佐藤克也，調 漸，江口勝美. 日本におけるプリオン病患者の脳脊髄液の診断マーカーと画像検査の検討. 第 12 回 日本神経感染症学会総会，福岡，2007.10.12-13.

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

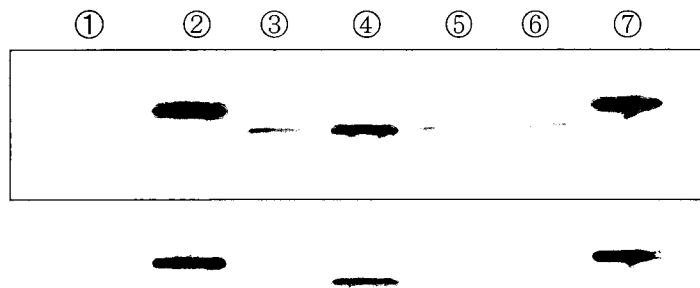
表 1. 対象 112 例の内訳

古典型 CJD	94	例
MV 非典型例	1	例
MM2 皮質型	4	例
家族性		
V180I	6	例
144 塩基対挿入	2	例
硬膜移植後 CJD	4	例
GSS 102	3	例

表 2. 脳脊髄液中の 14-3-3 蛋白の検出方法 Western blot 法の統一プロトコール (12%ゲル)

80VX10min→100VX10min→120V (70min)

- トランスファー 15% MeOH X 30mA overnight
- ブロッキング 5% スキムミルク室温 60min
- 1次抗体 (IBL社 β isoform) (1:1000) 4°C overnight
- 室温で 3×10min with TTBS wash
- 2次抗体 (1:5000) 室温で 1時間
- 室温で 3×10min with TTBS wash
- ECL 処理



①CVD1.07 µg/lane ②standard6.25 µg ③ATD3.17 µg/lane
 ④CJD 11.88µg/lane ⑤ATD 2.39µg/lane ⑥CJD2.76µg/lane ⑦standard 12.5µg

図 1. 脳脊髄液中の 14-3-3 蛋白の β アイソフォーム半定量の実例

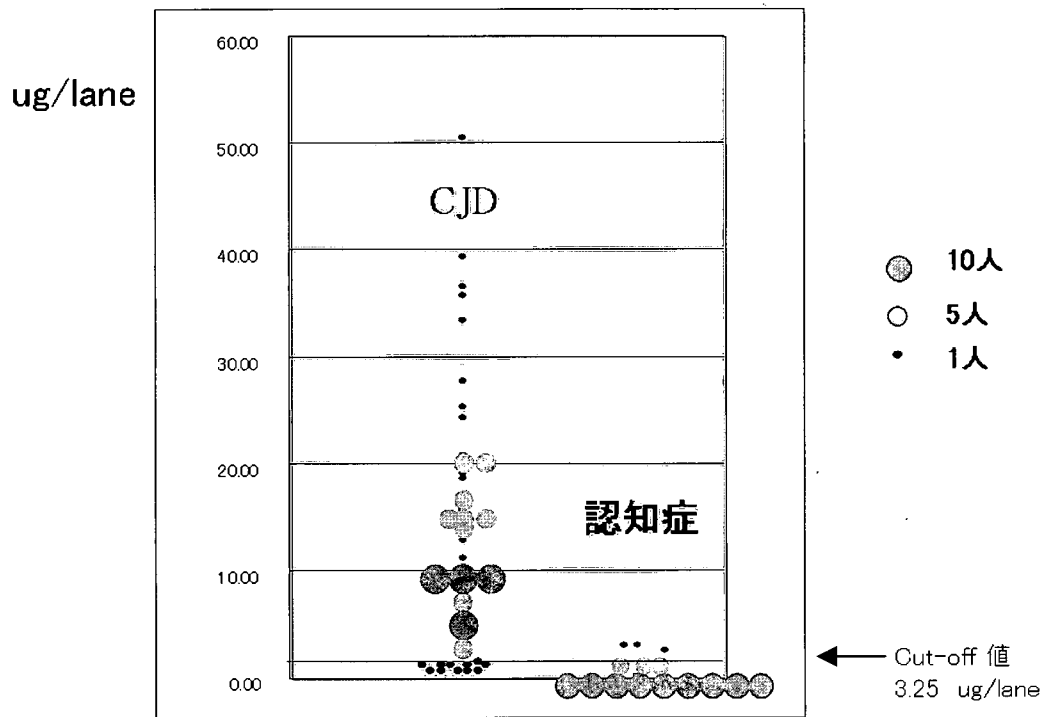


図 2. CJD 患者とアルツハイマー型認知症 (ATD) 患者での脳脊髄液中の 14-3-3 蛋白の β アイソフォーム半定量の結果 CJD 患者 112 症例 VS 認知症患者 93 症例



- ①No.148 18.33 mg/lane ②standard 25 mg/lane ③standard 12.5 mg/lane
 ④No.15030.78 mg/lane ⑤No.152 5.02 mg/lane ⑥No.154 17.11 mg/lane
 ⑦No.156 32.26 mg/lane ⑨No.159 21.50 mg/lane ⑩No.163 17.76 mg/lane
 ⑪No.164 6.74mg/lane ⑫No.168 3.74 mg/lane

図 3. 脳脊髄液中の 14-3-3 蛋白の γ アイソフォーム半定量の実例

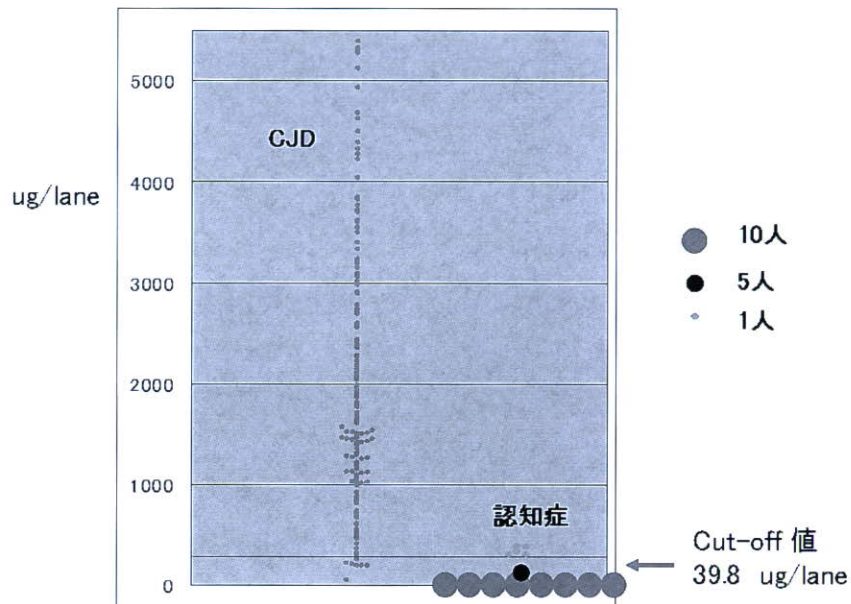


図 4. CJD 患者とアルツハイマー型認知症 (ATD) 患者での脳脊髄液中の 14-3-3 蛋白 γ アイソフォームの半定量の結果 CJD 患者 112 症例 VS 認知症患者 93 症例

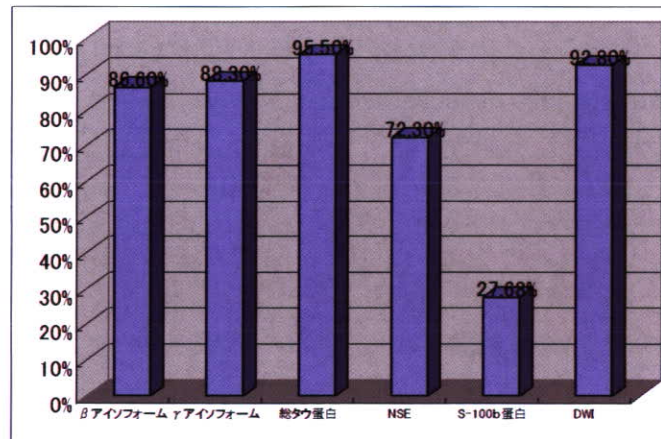


図 5. 112 例の結果

血液中の分子を指標としたプリオン病の生前診断に関する研究

分担研究者：横山 隆 動物衛生研究所プリオン病研究センター

研究協力者：Seong Soo A. An PeopleBio, Inc.

研究要旨

スクレイピーの血液中から Multimer Detection System (MDS) 法で検出される多量体 PrP (PrP^d) はプロテイナーゼ K 感受性で、グアニジンによる免疫反応性の増強は認められなかった。

A. 研究目的

変異型ヤコブ病 (vCJD) 患者の疫学調査および牛海綿状脳症 (BSE) 実験感染羊を用いた研究から、輸血によるプリオン病の伝達の危険性が示唆された。プリオンの血液中での動態を明らかにすることは、輸血に伴うプリオン感染の問題解決のために重要である。プリオン感染動物の血液から多量体プリオン蛋白質 (PrP^d) の検出を試みる。

B. 研究方法

現行の PrP^{Sc} の検出法は PrP^C と PrP^{Sc} のプロテイナーゼ K (PK) 抵抗性の差異を利用している。すなわち、試料に PK 処理を行い、残存する PrP を PrP^{Sc} として抗体により検出している。一方、PrP^{Sc} は不溶化し、凝集体を形成することが知られている。この凝集体を特異的に検出する multimer detection system (MDS) 法は、PK 処理を省略した、簡便な疾病由来の PrP^d の検出法として期待される。本年度は MDS 法による未発症期の羊の血漿中からの PrP^d の検出ならびに MDS で検出される PrP^d の性状について検討した。

(倫理面への配慮)

プリオン感染動物および材料の取り扱いには動物衛生研究所内のバイオセーフティレベル

(BSL)3 実験施設にて行い、汚染物は 135℃、30 分間のオートクレーブ処理等により不活化した。すべての実験は動物衛生研究所バイオセーフティ委員会、実験動物委員会の許可を受けて実施している。

C. 研究発表

MDS 法による PrP^d の出現とウエスタンブロット (WB) による PrP^{Sc} 検出法との関係について調べた。PrP のアミノ酸配列 136,171 が AAQ, AVQQ の遺伝子型のスクレイピー発症羊 14 頭では、PrP^d の出現と WB による脳、リンパ節からの PrP^{Sc} の検出結果は一致していた。

PrP^d の性状を明らかにするために羊のプラズマから PrP を濃縮し、ELISA 法により PK 感受性およびグアニジン添加の有無に伴う反応性の変化 (conformation dependent immune assay : CDI) を調べた。プラズマ中の PrP^d は、PK 感受性であり、グアニジンによる反応性の増強は認められなかった。

D. 考察

スクレイピー羊の血漿から PrP^d のシグナルが検出された。供試した羊はいずれも臨床症状期の個体であり、PrP^d の出現時期やその動態の解明が必要である。検出された PrP^d