

指したが、細胞の感受性はプリオン株により異なっていた。感受性細胞でも許容できるプリオン株は一部に限られた。逆に、Chandler非感受性細胞にも伝達可能なプリオンも存在した。

#### E. 結論

細胞のプリオン感受性には、プリオン株と細胞の性状の両者が関与することが示された。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表 (2008/4/1~2009/3/31 発表)

##### 1. 論文発表

- 1) Iwamaru Y, Shimizu Y, Imamura M, Murayama Y, Endo R, Tagawa Y, Ushiki KY, Takenouchi T, Kitani H, Mohri S, Yokoyama T, Okada H. Lactoferrin induces cell surface retention of prion protein and inhibits prion accumulation. *Journal of Neurochemistry* 107 : 636-646, 2008
- 2) Yokoyama T, Masujin K, Iwamaru Y, Imamura M, Mohri S. Alteration of the biological and biochemical characteristics of bovine spongiform encephalopathy prions during interspecies transmission in transgenic mice models. *J. Gen. Virol.* 90 : 261-268, 2009
- 3) Yokoyama T, Mohri S. Prion diseases and emerging prion diseases. *Current Medicinal Chemistry* 15 : 912-916, 2008
- 4) Murakami K, Nishikawa F, Noda K, Yokoyama T, Nishikawa S. Structural analysis of r(GGA)4 found in RNA aptamer for bovine prion protein. *Prion* 2 : 73-80, 2008
- 5) Yamamoto T, Ushiki Y, Hara S, Hall

WW, Tsukagoshi NH, Yokoyama T, Tagawa Y, Sata T, Yamakawa Y, Kinoshita N, Tamura F, Hattori S, Irie S. An advantageous method utilizing new homogenizing device BioMasher and a sensitive ELISA to detect bovine spongiform encephalopathy accurately in brain tissue. *J. Virol. Methods*, 149 : 316-25, 2008

- 6) Takenouchi T, Iwamaru Y, Sato M, Yokoyama T, Kitani H. Establishment of an SV40 large T antigen-immortalized bovine brain cell line and its neuronal differentiation by dibutyryl-cyclic AMP. *Cell biology international*, 33 : 187-191, 2008
- 7) Masujin K, Shu Y, Yamakawa Y, Hagiwara K, Sata T, Matsuura Y, Iwamaru Y, Imamura M, Okada H, Mohri S, Yokoyama T. Biological and biochemical characterization of L-type-like bovine spongiform encephalopathy (BSE) detected in Japanese black beef cattle. *Prion* 2 : 123-128, 2008
- 8) 横山 隆. 牛海綿状脳症(BSE)の生物学. *草食実験動物* 32 : 1-10, 2008

##### 2. 学会発表

- 1) Yokoyama T. Prion diseases and emerging prion diseases. *PepCon 2008. China*, 2008.4
- 2) 長谷川浩司, 横山 隆. 家族性クロイツフェルト・ヤコブ病 E200K 変異がプリオン蛋白質の構造安定性に与える影響. 第35回生体分子科学討論会. 播磨, 2008.5
- 3) Hasegawa K, Yokoyama T. Fragment molecular orbital calculations reveal local structural instability in the human prion protein carrying a E200K

- Variant. Prion 2008. Madrid, 2008.10
- 4) Masujin K, Shu Y, Yamakawa Y, Hagiwara K, Sata T, Matsuura Y, Iwamaru Y, Imamura M, Kurachi M, Shimizu Y, Kasai K, Okada H, Mohri S, Yokoyama T. Biological and biochemical characterization of L-type BSE prions detected in Japanese beef cattle. Prion 2008. Madrid, 2008.10
- 5) 横山 隆, 舩甚賢太郎, 毛利資郎. 種の壁を利用した BSE プリオンの分類. 第 33 回草食実験動物研究会. 伊東, 2008.11
- 6) 横山 隆. BSE の今後の問題 - 非定型

BSE-1. 日本獣医師会学会年次大会. 盛岡, 2009.1

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

## 酵母を用いた異種間プリオン感染の分子機構解明

研究分担者:田中 元雅 独立行政法人理化学研究所 脳科学総合研究センター 田中研究ユニット

### 研究要旨

本研究では、プリオン病の病態解明のためのモデル生物として出芽酵母を使い、出芽酵母で見出されている酵母プリオン[PSI<sup>+</sup>]の系を用いることで、酵母プリオン Sup35 の凝集体の性質、プリオン株、異種間プリオン感染の関係を明らかにすることを目的とする。本年は、Sup35 の異種間プリオン感染能を評価する実験系を構築するとともに、アミロイド生成前に存在する可溶性凝集体オリゴマーの性質とそのプリオン株の表現型への影響を明らかにした。

### A. 研究目的

プリオン病がまれに種間の障壁を越えて感染する時の分子機構には不明な点が多い。酵母では、極めて低効率で起こる異種間プリオン感染実験において膨大なスクリーニングを行うことができるという特徴を利用する。本研究では、酵母プリオン Sup35 の凝集体の性質、種を超えるプリオン感染力、プリオン株の関連を明らかにし、種の障壁を越えて感染する時の分子機構解明を目指す。

### B. 研究方法

酵母プリオン[PSI<sup>+</sup>]の系を用いて、多様な Sup35 アミロイド構造を作り出し、それらを異なる種の酵母に導入して異種間プリオン感染能を調べる実験系および、異種間プリオン感染能をもつ Sup35 変異体を探索するための実験系を構築した。また、Sup35 の可溶性凝集体(オリゴマー)の構造や性質をX線小角散乱法などの分光学的手法で調べた。

### (倫理面への配慮)

特になし。

### C. 研究結果

*S. cerevisiae* の Sup35 は、*C. albicans* など他種の酵母由来の Sup35 とは相互作用しないことを確認した。Sup35 の変異導入や凝集条件を変化させることで、異種間プリオン感染力をもつ Sup35 のアミノ酸配列、また、凝集体構造を調べるための実験系を構築した。一方、Sup35 の可溶性凝集体、オリゴマーが温度に依存して可逆的に生成することを見出した。また、オリゴマーがアミロイド性を有し、最終的に強い白色のプリオン株を導くことを明らかにした。

### D. 考察

今年度に構築した実験系によって、今後、異種間プリオン感染に重要な役割を果たす特異なアミノ酸やアミロイド構造・性質を明らかにすることができると考えられる。また、今年度に明らかにした Sup35 オリゴマーは、今後、異なる種へのプリオン感染に関与するかを調べる予定である。

### E. 結論

酵母を用いた本実験系は、種間障壁を超えるプリオン感染の分子機構解明に重要なツ



ルになると期待できる。また、安定な Sup35 オリゴマーを見出し、その性質を明らかにできたことによって、今後、プリオン株や異種間プリオン感染における Sup35 オリゴマーの関与を詳細に調べることができると考えられる。

#### [参考文献]

- 1) Tanaka, M Collins S, Toyama B, Jonathan S. Weissman. The physical basis of how prion conformations determine strain phenotypes. Nature 442 : 585-589, 2006

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表 (2008/4/1~2009/3/31 発表)

##### 1. 論文発表

特になし。

##### 2. 学会発表

- 1) Ohhashi Y, Tanaka M. MOLECULAR BASIS OF YEAST PRION [*PSI*<sup>+</sup>] STRAINS. Molecular Chaperones & Stress Responses, Cold Spring Harbor Laboratory. USA, 2008.5.1
- 2) 田中元雅. 酵母プリオンを用いたプリオン株出現の分子機構解明. 第8回日本蛋白質科学会. 東京, 2008.6.11
- 3) Tanaka M, Ohashi Y. Molecular basis of prion strain phenotype in yeast prion. BMB2008. 神戸, 2008.12.10

#### 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。

## プリオン立体構造変換初期過程の解析

研究分担者：桑田 一夫 岐阜大学 人獣感染防御研究センター  
研究協力者：鎌足 雄司 岐阜大学 人獣感染防御研究センター  
研究協力者：山口 圭一 岐阜大学 人獣感染防御研究センター  
研究協力者：武藤 淳二 岐阜大学 人獣感染防御研究センター  
研究協力者：松本 友治 岐阜大学 人獣感染防御研究センター  
研究協力者：山本 典史 岐阜大学 人獣感染防御研究センター  
研究協力者：石倉 孝一 岐阜大学 人獣感染防御研究センター

### 研究要旨

#### A. 研究目的

プリオンタンパク質が細胞型(PrP<sup>C</sup>)からスクレイピー型(PrP<sup>Sc</sup>)に構造変換する過程は未だによく理解されていない。この過程を理解することは、プリオン病の発症機構の解明、及びプリオン病治療薬開発にとって、本質的である。我々はこの反応過程を、原子分解能で観測するため、以下の方法で研究を行う。

#### B. 研究方法

(1) <sup>15</sup>N ラベルされたリコンビナントプリオン(PrP<sup>C</sup>)を脳乳液(正常、及びプリオン感染マウス)と混合し、NMR スペクトルの経時変化を追跡する。(2) レーザー温度ジャンプ法を用い、プリオンタンパク質の巻き戻り初期過程を観測する。(3) 計算機シミュレーションを用い、プリオンタンパク質の立体構造変化を計算する。

#### (倫理面への配慮)

該当なし

#### C. 研究結果

(1) リコンビナント・プリオンは、正常脳乳液と感染脳乳液とで、異なる相互作用(構造

変化)を示す。特に、ヘリックス B の C 末端から BC ループにかけて、顕著な差が観測された。この差は、細胞型(PrP<sup>C</sup>)からスクレイピー型(PrP<sup>Sc</sup>)に構造変換する中間体(PrP<sup>\*</sup>)に由来する、と考えられる。従って、同部位において、プリオン構造変換初期過程が開始されることが示唆された。また同部位は、論理的に開発された抗プリオン物質の結合部位とほぼ一致しており、同部位周辺の立体構造変化を詳細に究明することが、プリオン立体構造変換機構の解明、及び治療薬開発に結び付く、と考えられる。(2) 温度ジャンプ実験により、数マイクロ秒の相が観測された。このことは、プリオンタンパク質が、際立って早い構造形成を行うことを示している。逆にいえば、プリオンは多様な立体構造を示すにも拘わらず、その間の自由エネルギーバリアーは相当低い。このことが、感染性や株の多様性を説明する根拠となるだろう。(3) 分子動力学計算等の結果、ヘリックス B の C 末端、及び BC ループにかけて、ピコからナノ秒のタイムスケールで大きい揺らぎが観測された。しかし、それ以外のループ部分にかけてもこのような揺らぎは存在した。このことから、単にピコからナノ秒で揺らいでいる部分では

なく、タイムスケールの異なるより特異的なダイナミクスが立体構造変換に関与している、と考えられ、治療薬開発に関しても、これらの部位を標的とすることが合理的である、と考えられる。

#### D. 考察

これらの実験結果は、プリオンタンパク質の構造変換初期過程において、特定の部分が特異的な構造変化を引き起こすことを示唆している。我々により開発された抗プリオン物質は、この反応初期過程を止めている可能性が高い。このようなケミカルシャペロンを戦略的に設計することが、今後のプリオン病治療薬開発に有効であろう、と考えられる。

#### E. 結論

細胞型(PrP<sup>C</sup>)からスクレイピー型(PrP<sup>Sc</sup>)に構造変換する過程における中間体(PrP<sup>\*</sup>)に関連する部位が、世界で初めて明らかとなった。このことは、プリオン立体構造変換機構、及び治療薬開発に少なからず寄与するものと考えられる。

#### [参考文献]

- 1) Kuwata K, Li H, Yamada H, Legname G, Prusiner SB, Akasaka K, James TL. Locally disordered conformer of the hamster prion: a crucial intermediate to PrP<sup>Sc</sup>? *Biochemistry* 41: 12277-12283
- 2) Kuwata K, Kamatari YO, Akasaka K, James TL. Slow conformational dynamics in the hamster prion protein. *Biochemistry* 43: 4439-4446, 2004
- 3) 桑田一夫. プリオン病治療薬の論理的開発をめざして. -蛋白質のダイナミクス解析から構造変換制御物質の探索へ-, 蛋白質核酸酵素 53: 727-732, 2008

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表(2008/4/1~2009/3/31 発表)

##### 1. 論文発表

- 1) Kimura K, Nagaki M, Kakimi K, Saio M, Saeki T, Okuda Y, Kuwata K, Moriwaki H. Critical role of CD44 in hepatotoxin-mediated liver injury. *Journal of Hepatology*. 48(6): 952-961, 2008.6
- 2) Yamamoto N, Kuwata K. DFT studies on redox properties of copper-chelating cuprizone: Unusually high-valent copper(III) state. *Journal of Molecular Structure THEOCHEM*. 895: 52-56, 2009
- 3) Yamaguchi K, Matsumoto T, Kuwata K. Critical Region for Amyloid Fibril Formation of Mouse Prion Protein: Unusual Amyloidogenic Properties of Helix 2 Peptide. *Biochemistry*. 47(50): 13242-13251, 2008.12.16
- 4) Kato Z, Stern JNH., Nakamura H, Kuwata K, Kondo N, Strominger JL. Positioning of autoimmune TCR-Ob.2F3 and TCR-Ob.3D1 on the MBP85-99/HLA-DR2 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105(40): 15523-15528, 2008.10.7
- 5) Hosokawa-Muto J, Kamatari YO, Nakamura HK, Kuwata K. A Variety of Anti-Prion Compounds Discovered through an in silico Screen Based on PrP<sup>C</sup> Structure: A Correlation Between Anti-Prion Activity and Binding Affinity: Antimicrobial Agents and Chemotherapy (AAC), 765-771, 2009.2
- 6) 桑田一夫. プリオン 蛋白質・核酸・酵素 2008年6月号増刊「キーワード: 蛋白質



の一生」 53(8), 2008.6.10

- 7) 桑田一夫. プリオン病治療薬の論理的開発をめざして—蛋白質のダイナミクス解析から構造変換制御物質の探索へ Rational drug discovery for prion diseases— 蛋白質 核酸 酵素 53(6) : 727-732, 2008
- 8) 桑田一夫. ダイナミクスと安定性が交差する領域の熱力学—量子暗号熱力学とプリオン— 熱測定 35(3) : 140-147, 2008.6.15
- 9) 桑田一夫. プリオン ウイルスハンドブック No.16 中枢神経系ウイルス ウイルスハンドブック株式会社日本医学館 44-45, 2008.6.28 ISBN978-4-89044-660-5 C3047

## 2. 学会発表

- 1) 鎌足雄司, 桑田一夫. The low-lying excited states : from identification to drug discovery. 22nd Annual Symposium of The Protein Society. Manchestr Grand Hyatt San Diego, 2008.7.19-23
- 2) 中村寛則, 武藤淳二, 鎌足雄司, 桑田一夫. A novel evaluation scheme for anti-prion activity : Application to *in silico* screening. 22nd Annual Symposium of The Protein Society. Manchestr Grand Hyatt San Diego, 2008.7.19-23
- 3) 石川岳志, 石倉孝一, 桑田一夫. Theoretical study of molecular interaction in prion protein based on fragment molecular orbital method. CBI2008. National Center of Sciences Building, Hitotsubashi Memorial Hall, Tokyo, 2008.10.22-24
- 4) Nakamura HK, Kanamoto T, Terakubo S, Kodama KB, Nakashima H, Kuwata Kazuo. Small anti-HIV compounds found with *in silico* screening and MTT assay. CBI2008. National Center of Sciences Building, Hitotsubashi Memorial Hall, Tokyo, 2008.10.22-24
- 5) 桑田一夫, 松本友治, 鎌足雄司, 武藤淳二, 中村寛則. Dynamics based drug design (DBDD) to regulate the prion's pathogenic conversion process. Prion2008. Auditorium Hotel Madrid, 2008.10.8-10
- 6) 武藤淳二, 鎌足雄司, 中村寛則, 桑田一夫. A variety of anti-prion compounds discovered by an *in silico* screening based on PrPc structure : a correlation between anti-prion activity and binding affinity. Prion2008. Auditorium Hotel Madrid, 2008.10.8-10
- 7) 石倉孝一, 桑田一夫. Molecular dynamics simulation of the interaction between an anti-prion compound GN8 and cellular prion protein. Prion2008. Auditorium Hotel Madrid, 2008.10.8-10
- 8) 桑田一夫. Dynamics Based Design of Anti-Prion Compounds Uncovered the Hot Spots for Prion's Pathogenic Conversion Reaction. EHRlich II 2nd WORLD CONFERENCE ON MAGIC BULLETS Celebrating the 100th Anniversary of the Nobel Prize Awarded to Paul Ehrlich. Germany, 2008.10.3-5
- 9) 山口圭一. 部分ペプチドを用いたプリオンのアミロイド線維形成部位の系統的スクリーニング 第72回日本生化学会中部支部 例会・シンポジウム. 岐阜大学医学部記念会館, 2008.5.24
- 10) 武藤淳二. アミノ酸部位をピンポイント蛍光標識したプリオン蛋白質の作製 第72回日本生化学会中部支部 例会・シンポジウム. 岐阜大学医学部記念会館,

2008.5.24

- 11) 鎌足雄司. 創薬のための構造生物学的基盤の構築と抗プリオン病化合物開発への応用. 第 72 回日本生化学会中部支部 例会・シンポジウム, 岐阜大学医学部記念会館, 2008.5.24
- 12) 桑田一夫. Thermodynamics of quantum cryptography for representation of prion. 2008 年プリオン研究会 Prion Symposium 2008. 北海道上川郡新得町サホロリゾート, 2008.8.29-30
- 13) 武藤淳二. in silico スクリーニングによる多様な抗プリオン病リード化合物の同定. 2008 年プリオン研究会 Prion Symposium 2008. 北海道上川郡新得町サホロリゾート, 2008.8.29-30
- 14) 武藤淳二. 大規模な化合物データベースを用いたプリオン病治療薬リード化合物の探索～抗プリオン活性を示す多様な低分子化合物の発見. 第 146 回日本獣医学会学術集会. ワールドコンベンションセンターサミット(シーガイア), 2008.9.24-26
- 15) 武藤淳二, 山口圭一, 松本友治, 鎌足雄司, 桑田一夫. 4 塩基コドン法によるピンポイント蛍光標識プリオン蛋白質の作製. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会. 岡山コンベンションセンター, 2008.10.26-28
- 16) 上田敦史, 萩原恭二, 中村寛則, 渡邊俊樹, 桑田一夫, 間 陽子. 抗インフルエンザ薬の開発を目指した Nucleoprotein 結合化合物のスクリーニング. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会. 岡山コンベンションセンター, 2008.10.26-28
- 17) 石倉孝一, 桑田一夫. GN8-プリオン蛋白質間相互作用の分子動力学シミュレーションによる解析. 第 46 回日本生物物理学会年会. 福岡国際会議場, 2008.12.3-5
- 18) 早野陽介, 鎌足雄司, 桑田一夫. 抗プリオン化合物の作用機構による分類. 第 46 回日本生物物理学会年会. 福岡国際会議場, 2008.12.3-5
- 19) 山口圭一, 松本友治, 武藤淳二, 桑田一夫. シーディングによるマウス PrP アミロイド線維の伝播. 第 46 回日本生物物理学会年会. 福岡国際会議場, 2008.12.3-5
- 20) 鎌足雄司, 武藤淳二, 中村寛則, 早野陽介, 桑田一夫. ケミカルシャペロンとして働く抗プリオン化合物群の同定. 第 46 回日本生物物理学会年会. 福岡国際会議場, 2008.12.3-5
- 21) 山本典史, 桑田一夫. プリオン病における毒性作用の発現機構: 遷移金属イオンの生体作用を軸とした分子論的解析. 第 46 回日本生物物理学会年会. 福岡国際会議場, 2008.12.3-5
- 22) Yoshimura Y, Sakurai K, Chatani E, Kameda A, Sakai M, Yamaguchi K, Naiki H, Goto Y.  $\beta$  2 ミクログロブリンのフラグメントが形成するアミロイド線維構造の構造解析. 第 46 回日本生物物理学会年会. 福岡国際会議場, 2008.12.3-5

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

該当なし

##### 2. 実用新案登録

該当なし

##### 3. その他

該当なし



## プリオン病診断における、機能画像の意義

研究分担者：村山 繁雄 東京都老人総合研究所高齢者ブレインバンク  
研究協力者：齊藤 祐子 東京都老人医療センター剖検病理科  
研究協力者：石井 賢二 東京都老人総合研究所附属診療所(ボジトロン研究施設)  
研究協力者：徳丸 阿耶 東京都老人医療センター放射線科  
研究協力者：江口 桂 東京都老人医療センター神経内科  
研究協力者：金丸 和富 東京都老人医療センター神経内科

### 研究要旨

プリオン病においては、MRI 拡散強調画像での皮質のリボン状高輝度が診断上有用とされているが、磁場不均衡を基盤とする機種間のばらつき、読影能力の問題、MRI 異常を示さない症例がある点が問題である。発症早期で、 $^{18}\text{F}$ -FDG PET による糖代謝機能画像 SUV(standard uptake value)が著しく低下した、クロイツフェルトヤコブ病(CJD)確定例の経験を踏まえ、脳血流シンチグラフィ、ECD-SPECT に Patlak 法を用いることが、CJD 診断に有用である可能性を指摘した。

### A. 研究目的

プリオン病診断においては、MRI 拡散強調画像における大脳皮質ないし基底核の高信号強度の診断的価値が強調されている。ただ、画像診断上の読影能力、MRI の磁場不均衡、痙攣後脳症等の鑑別を要する疾患の存在等からは、実地医療においてアクセスしやすい補助診断がさらに存在すると、助けになる可能性がある。

我々は発症初期で、認知機能低下も軽く、脳波上も軽度の徐波化を認めるのみであった段階で、 $^{18}\text{F}$ -fluorodeoxyglucose (FDG)-PET の standardized uptake value (SUV) が極めて低下した一例を経験したので報告する。

### B. 研究方法

**症例：**80歳女性、家族歴に特記すべきことなし。既往歴で、夫の国外勤務で転勤が多く、イギリス滞在歴があり、アルゼンチン在住時、牛の脳を食べた既往がある。独居であった。現病歴では、入院2ヶ月前のX年4月よりも

のがみえにくく、話をされていて少しおかしいと、息子が感じるようになった。5月頃から幻視を訴えるようになり、近医でMRI検査を受けるも異常なしと言われた。5月下旬頃より歩行が不安定となってきた。6月になり、家の中が整理されず、息子の顔もびんとこない症状より近医受診。歩行障害、失見当識より脳血管障害を疑われ、当施設救急外来受診。神経所見では、名前・生年月日・年齢は正答。眼球運動に異常なし。口頭命令には応じ、筋力低下なし。腱反射正常、病的反射なし。指鼻試験問題ないが、企図振戦あり。小刻みでよるけるが、手引き歩行可能。驚愕反応陽性。緊急頭部MRIで、右頭頂後頭葉皮質に拡散強調画像でリボン上の高信号強度を認め、クロイツフェルトヤコブ病(CJD)を疑われ緊急入院となった。入院後、Mini-Mental State Examination 9/30、長谷川式簡易知能スケール 8/30、Frontal Assessment Battery 4/18、Rivermead 行動記憶検査 Standard Profile 0点。であった。髄液一般検査所見は正常、タ

ウ蛋白陽性。プリオン遺伝子は 129M/M 多型で変異なし。脳波では  $\alpha$  波は保たれており、PSD はなかった。この時点で、一ヶ月前の幻視の症状、海外滞在時の状況の聴取は可能だった。

この時点で脳のシナプス活動を代表するとされる糖代謝 PET (18F-Deoxy Glucose : FDG)、神経細胞数を反映するとされる、 $^{11}\text{C}$ -flumazenil (FMZ)-PET scan を施行した。

#### (倫理面への配慮)

PET 検査は、当施設の倫理委員会承認済みであり、かつ検査時に被験者あるいは代諾者のインフォームドコンセントを文書でとっている。

### C. 研究結果

検査時の絶食条件、血糖値もコントロールされていたにもかかわらず FDG-PET では SUV の全脳における激減(患者の脳灰白質平均 1.41 に対し健常対照群 50 例では  $7.99 \pm 1.33$  (平均  $\pm$  SD)) を認めた。神経細胞数を反映するとされる、FMZ-PET scan では、全脳への取り込みに著変はないが、頭頂後頭葉の MRI の異常部位にはほぼ一致して局所的取り込み低下を認めた。

検査後の臨床経過として、症状は速やかに進行し、安静時ミオクローヌスが出現、発症後 4 ヶ月の段階で無言無動となり、脳波上も PSD が出現、probable CJD の診断基準を満たした。

発症後 6 ヶ月で死亡、病理学的には典型的な CJD の病理を示し、Western blot の解析結果では type I であった。

### D. 考察

本例は臨床早期に、FDG-PET の SUV が極めて低値を示した点が、特徴的であった。FMZ-PET の取り込みと解離がみられることから、構造的な破壊が生じる以前に強い機能

的抑制が起こる可能性が示唆される。当施設で FDG-PET 検査を行った症例では V180I 例が最も多く、初期に CT と臨床症状から、Alzheimer 病 (AD) ないしレビー小体型認知症 (DLB) と診断され、進行が速いということで紹介されてくる。これらの症例も、FDG-PET の SUV は同様に極めて低値を示す。また type II MM 剖検確定診断例も同様である。FDG-PET はてんかんと脳腫瘍のみに保険適応が通っているが、プリオン病に適応を拡大すれば、非定型的な症例の診断に貢献する可能性がある。脳血流 SPECT においても、全脳の著明な血流低下が診断上有用である可能性が示唆されており<sup>1)</sup>、プリオン病診断で、MRI DWI に脳血流 SPECT を加えることの有用性の検討が、今後必要と思われる。

### E. 結論

プリオン病診断における、FDG-PET 画像の有用性について述べた。脳血流 SPECT 画像においても、同様の有用性を得られる可能性があり、今後の検討が必要である。

#### [参考文献]

- 1) Shiga Y. Imaging. In Handbook of Prion Disease. ed. by P. Gambetti et al, in press

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表 (2008/4/1 ~ 2009/3/31 発表)

#### 1. 論文発表

- 1) Yokota O, Tsuchiya K, Terada S, Ishizu H, Uchikado H, Ikeda M, Oyanagi K, Nakano I, Murayama S, Kuroda S, Akiyama H. Basophilic inclusion body disease and neuronal intermediate filament inclusion disease : a comparative clinicopathological study. Acta Neuropath 115: 561-575, 2008



- 2) Hashimoto M, Kawasaki K, Suzuki M, Mitani K, Murayama S, Mishina M, Oda K, Kimura Y, Ishiwata K, Ishii K, Inoue K. Presynaptic and postsynaptic nigrostriatal dopaminergic functions in multiple system atrophy. *Neuroreport* 19 : 145-150, 2008
- 3) Tokumaru AM, Kakamura K, Terada H, Kobayashi O, Kanemaru K, Kato T, Murayama S, Yamakawa M, Mizuo M. Asymptomatic self-limiting diffuse white matter lesions in subacute to chronic stage of herpes simplex encephalitis. *The Neurology Journal* 21 : 316-322, 2008
- 4) Ikemura M, Saito Y, Sengoku R, Sakiyama Y, Hatsuta H, Kanemaru K, Sawabe M, Arai T, Ito G, Iwatsubo T, Fukayama M, Murayama S. Lewy body pathology involves cutaneous nerves. *J Neuropath Exp Neurol* 67 : 945-953, 2008
- 5) Takahashi Y, Seki N, Ishiura H, Mitsui J, Matsukawa T, Kishino A, Onodera O, Aoki M, Shimozawa N, Murayama S, Itoyama Y, Suzuki Y, Sobue G, Nishizawa M, Goto, J, Tsuji S. Development of a high-throughput microarray-based resequencing system for neurological disorders and its application to molecular genetics of amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 65 : 1326-1332, 2008
- 6) Sengoku R, Saito Y, Ikemura M, Sakiyama Y, Hatsuta H, Kanemaru K, Sawabe M, Arai T, Mochizuki H, Inoue K, Murayama S. The incidence and extent of Lewy-body related alpha-synucleinopathy in human aging olfactory bulb. *J Neuropath Exp Neurol* 67 : 1072-1083, 2008
2. 学会発表
- 1) Sengoku R, Saito Y, Ikemura M, Sakiyama Y, Hatsuta H, Kanemaru K, Sawabe M, Arai T, Mochizuki H, Inoue K, Murayama S. The incidence and extent of Lewy-body related alpha-synucleinopathy in human aging olfactory bulb. 2008 Annual Meeting of the American Association for Neuropathologists. *JNEN* 67 : 443, SanDiego, U.S.A, 2008.4. 8
- 2) Hatsuta H, Saito Y, Adachi T, Arai T, Sawabe M, Kuwano R, Mori H, Murayama S. Staging for Amyloid Angiopathy in Human Aging. 2008 Annual Meeting of the Society for Neuroscience. Washington D.C., U.S.A., 2008.11.15
- 3) Ishibashi K, Murayama S, Ishii K, Mizusawa H. Correlative study of MIBG cardiac scintigraphy and Dopamin pet scan in diagnosis of Parkinson disease. 2008 Annual Meeting of the Society for Neuroscience. Washington D.C., U.S.A., 2008.11.17,
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし



## プリオン病診断のためのモノクローナル抗体の応用 ヒト H-FABP 特異的モノクローナル抗体の作製と検出系の構築

研究分担者：松田 治男 広島大学大学院生物圏科学研究科免疫生物学

### 研究要旨

本研究では、CJD の髄液診断に活用できるバイオマーカーとして H-FABP(心臓型脂肪酸結合タンパク)に焦点を当て、新規な免疫学的 H-FABP 検出の開発を試みている。H-FABP 特異的モノクローナル抗体の作製は昨年度に続けて実施した。H-FABP の検出のために、本年度の研究において、新たに H-FABP 特異的マウスモノクローナル抗体(5種)およびニワトリモノクローナル抗体(25種)を作製した。これらの抗体のうち、マウスとニワトリ抗体の組み合わせによって、H-FABP を高感度に検出できる系を構築した。この検出系を用いてヒトプリオン病患者の脳脊髄液中の H-FABP 検出を試み、既知の H-FABP 検出用キットを用いた場合よりも高感度に検出できることを確認した。

### A. 研究目的

CJD の有用な髄液マーカーとなることが予想される H-FABP<sup>1,2)</sup>の検出の現状は、急性心筋梗塞診断用の市販 H-FABP 検出キットを活用することのみである。そこで本研究では、ヒトプリオン病診断用の H-FABPP 検出系を構築し、これを用いて髄液サンプルで H-FABP の検出を試みた。

### B. 研究方法

#### 1. 抗体作製

大腸菌で作製した組換えヒト H-FABP を高度免疫した BALB/C 純系マウス及び HB-15 純系ニワトリの脾細胞を出発材料として、抗 H-FABP モノクローナル抗体を作製した。マウス抗体は細胞融合法により、ニワトリ抗体はファージディスプレイ法で作製した。なお、ニワトリ抗体は最終的に真核系細胞で発現させた二価抗体(IgY 型抗体)を構築した。

#### 2. サンドイッチ ELISA

作製した抗体群から最適な 2 種の抗体を選

抜し、H-FABP 検出のサンドイッチ ELISA 系を構築した。H-FABP の検出では、急性心筋梗塞の検査法としてサンドイッチ ELISA およびイムノクロマトキットも活用して H-FABP の検出も実施した。

### (倫理面での配慮)

研究に使用する実験動物は、広島大学実験動物取扱規定に遵守して取り扱った。ヒトプリオン病他の脳脊髄液を用いた H-FABP の検出は長崎大学で実施した。実施に当たって、長崎大学倫理委員会の規定に従った。

### C. 研究結果

#### 1. H-FABP 特異的マウス型抗体の作製

H-FABP 特異的マウス抗体は、最終的に 5 種樹立でき、その内の 1 種のみが H-FABP 特異的で、残る 4 種は H-FABP に高い親和性を示しつつも、H-FABP のアイソタイプである B-FABP に若干の交差反応性を示した。

## 2. 候補抗体の選抜と調整

昨年度の研究で、H-FABP 特異的ニワトリモノクローナル抗体を多数作製したことを報告した。これらのクローンに、今回新たに作製したモノクローナル抗体を加え、様々な組み合わせでの ELISA や BIACORE による親和性解析によりサンドイッチ ELISA 系への活用の可能性を精査し、最終的にマウス抗体 3E9(H-FABP 特異的)とニワトリ抗体 HUFa10(H-FABP/B-FABP 交差反応抗体)の組み合わせが最も適していると判断した。HUFa10については、アフィニティー精製後、HRPO 標識した。

## 3. サンドイッチ ELISA の構築

サンドイッチ ELISA における固相化抗体濃度及び検出用抗体濃度を検討した。その最適の条件は、抗体固相化濃度が  $7.5 \mu\text{g/ml}$ 、検出用抗体濃度が  $10 \mu\text{g/ml}$  であった。また、一次反応の温度・時間は  $37^\circ\text{C} \cdot 30$  分、二次反応の温度及び時間は室温 30 分がそれぞれ最適であった。これらの最適化条件で組換え H-FABP を定量したところ、検出限界は約  $750\text{pg/ml}$  であった。市販の H-FABP 検出用 ELISA キットとの比較結果を図 1 に示した。

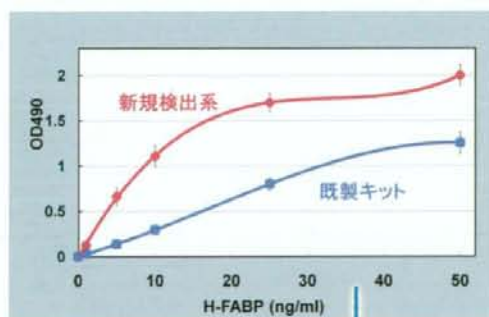


図 1 H-FABP 検出用新規サンドイッチ ELISA と既知アッセイ系との検出感度比較

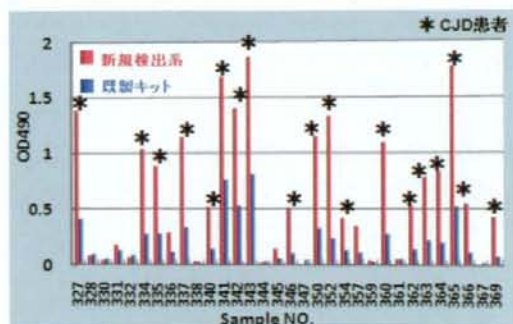


図 2 sCJD を含む脳疾患患者髄液からの H-FABP の検出

\* : CJD 患者試料を示す

## 4. プリオン病患者及び他の神経疾患患者、健康人の脳脊髄液中の H-FABP の検出

プリオン病患者及び他の神経疾患患者、健康人の脳脊髄液を H-FABP 検査試料として、設定条件でサンドイッチ ELISA を実施した。その結果、既存の H-FABP 検出用キットよりも高感度に H-FABP を検出でき、更に偽陽性も見られなかった(図 2)。

## D. 考 察

近年 CJD の診断法は急速な進展を見せ、特に髄液中のタウタンパク質や 14-3-3 タンパク質の検出は sCJD を高い精度で診断できるとされている。一方、新たなプリオン病診断マーカーとしてその有用性が示唆されている H-FABP について、新規な検出系の構築を本研究において実施した。

本研究でのサンドイッチ ELISA での H-FABP 検出限界は約  $750\text{pg/ml}$  であった。Steinacker ら<sup>2)</sup>は、CJD 患者 14 名(平均 73 歳)の血清 H-FABP レベルが約  $4\text{ng/ml}$ 、髄液の H-FABP レベルが約  $7.3\text{ng/ml}$  と算出している。このことから、CJD 患者髄液から H-FABP を検出する上で、本研究で開発した H-FABP サンドイッチ ELISA は十分に使用に耐えうる精度を備えていると考える。

事実、本研究で構築した H-FABP 検出サンドイッチ ELISA 法は、既知のアッセイキット

(急性心筋梗塞診断用)と比較して CJD 患者髄液中の H-FABP を高感度に検出した。図 2 に示したように、19 例の CJD 患者髄液中の H-FABP を 100% の高精度で検出できた。今後、本検出システムを活用して、より多数の検体から H-FABP の検出を試みる予定である。

#### E. 結 論

H-FABP に特異的なマウスおよびニトリモノクローナル抗体を用いて、CJD 患者髄液中の H-FABP を高感度で検出することに成功した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

- 1) 畠田昌至, 松田治男, 松井佑貴, 佐藤 克也, プリオン病診断のためのモノクローナ

ル抗体の応用—ヒト H-FABP 特異的モノクローナル抗体の作製と検出系の構築—, プリオン研究会, 新得町, 2008.8.29

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

#### 文 献

- 1) Guillaume E, Zimmermann C, Burkhard P R, Hochstrasser D F, Sanchez J-C. A potential cerebrospinal fluid and plasmatic marker for the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Proteomics*. 3 : 1495-1499, 2003
- 2) Steinacker P, Mollenhauer B, Bibl M, Cepek L, Esselmann H, Brechlin P, Lewezuk P, Poser S, Kretzschmar H A, Wiltfang J, Trenkwalder C, Otto M. Heart fatty acid binding protein as a potential diagnostic marker for neurodegenerative diseases. *Neurosci Lett*. 370 : 36-39, 2004



## PMCA 法によるマウス順応 BSE 株とスクレイピー由来株の高効率な増幅

研究分担者: 新 竜一郎	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科	感染免疫学講座	感染分子解析学分野
研究協力者: 藤原 愛子	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科	感染免疫学講座	感染分子解析学分野
研究協力者: 布施 隆行	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科	感染免疫学講座	感染分子解析学分野
研究協力者: 祖母井香織	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科	感染免疫学講座	感染分子解析学分野
研究協力者: 中垣 岳大	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科	感染免疫学講座	感染分子解析学分野
研究協力者: 石橋 大輔	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科	感染免疫学講座	感染分子解析学分野
研究協力者: 山口 尚宏	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科	感染免疫学講座	感染分子解析学分野
研究協力者: 片峰 茂	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科	感染免疫学講座	感染分子解析学分野
研究協力者: 西田 教行	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科	感染免疫学講座	感染分子解析学分野

### 研究要旨

PMCA 法 (Protein Misfolding Cyclic Amplification) は異常型プリオンタンパク (PrP<sup>Sc</sup>) を *in vitro* で増幅する方法であるが、これまでハムスタープリオン 263K 株を用いた場合以外、効率の高い増幅は報告されていない。我々はプリオン病疾患モデル動物として最も有用性の高いマウスを用いて PMCA により高効率の増幅が可能かどうか、種々の条件で検討を行った。使用したマウスプリオン株はマウス順応 BSE 株 (mBSE)、マウス順応スクレイピー株 (Chandler) である。超音波の条件を変えることにより、増幅効率が劇的に上昇し、1round (48 時間) の反応により PrP<sup>Sc</sup> の検出感度は 1-10ag に達した。さらに mBSE 感染マウス由来の血漿中の PrP<sup>Sc</sup> を増幅することにも成功した。

### A. 研究目的

PMCA 法 (Protein Misfolding Cyclic Amplification) は異常型プリオンタンパク (PrP<sup>Sc</sup>) を *in vitro* で増幅する方法で、プリオンの基礎研究だけでなく、実際の診断への応用も摸索されている。しかし、これまでのところ、ハムスタープリオン 263K 株を用いてでは、効率の高い増幅は報告されていない。そこで我々は、プリオン病疾患モデル動物として最も有用性の高いマウスを用いて PMCA の高効率の増幅が可能かどうか、種々の条件で検討を行った。

感染マウス脳ホモジネートも作成した。用いたマウスプリオン株は Chandler、マウス順応 BSE (mBSE) の 2 株である。PMCA 反応の溶液条件は 150mM NaCl, 50mM Hepes (pH 7.0)、protease inhibitor cocktail, 1mM EDTA, 0.05% Digitonin であり、正常脳ホモジネートは total protein 7mg/ml で、またシードとして少量 (PrP<sup>Sc</sup> 換算で 1ng~1ag) のプリオン感染マウス脳ホモジネートを加えた。プリオン感染マウス脳ホモジネート中の PrP<sup>Sc</sup> 量は、マウスリコンビナント PrP をスタンダードとして、Dot Blot により測定した。超音波装置は Misonix 製の Model3000 を使用した。

### B. 研究方法

8週齢の正常マウス (ddY) より脳組織を摘出し、脳ホモジネートを作成した。同様にプリオ

(倫理面への配慮)

本研究ではプリオン感染試料を用いるので、

全ての実験はバイオハザード実験室にて執り行い、感染性物質の外部への搬出等のない様、細心の注意を払って行った。全ての実験動物は当大学の動物実験指針に従い、かつ動物実験委員会の審査を受けると共に、実験動物は苦痛軽減に配慮し、エーテル麻酔下にて安楽死させた。

### C. 研究結果

PMCA での超音波の条件を(5秒から60秒/30分ごと)変えることにより、増幅効率が劇的に変化した。mBSE、Chandler 株での最適条件はそれぞれ10秒/30分、20秒/30分であった。最適条件下で1fgのPrP<sup>Sc</sup>を48時間の反応により検出することが可能であった(図1参照)。さらにその最適条件下でmBSE、Chandler 株感染 brain homogenate を1-10agにまで薄めて、PMCA 反応を行ったところ、mBSEでは1ag、Chandlerでは10agのPrP<sup>Sc</sup>を1-2 round 以内に検出可能であった。さらにmBSE感染マウス由来の血漿中のPrP<sup>Sc</sup>を増幅することも可能であった。

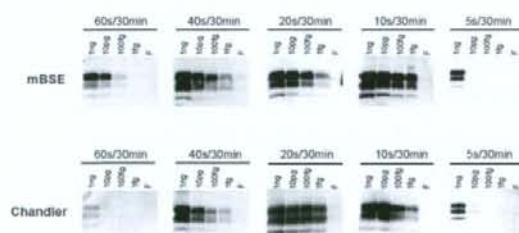


図1 超音波条件の変化によるPrP<sup>Sc</sup>増幅効率に与える影響

### D. 考察

PMCA 法は、間欠的な超音波処理をすることでPrP<sup>Sc</sup>凝集体を断片化し、結果的にPrP<sup>Sc</sup>凝集体の数が増加し、正常型プリオンタンパク(PrP<sup>C</sup>)からPrP<sup>Sc</sup>への変換反応が促進される。しかし同時にPrP<sup>Sc</sup>凝集体の一部は超音波により壊され、その分だけ増幅効率が低下

すること事態も想定される。実際、我々の結果から超音波処理の時間は長すぎても短すぎても増幅効率の低下をもたらすことが判明した。すなわち、超音波処理は、増幅効率の増加につながる、PrP<sup>Sc</sup>凝集体の断片化と増幅効率の低下につながる、PrP<sup>Sc</sup>凝集体の破壊の両者をもたらすが、その両者の最適なポイントを探索することにより、非常に高い増幅効率を得ることが可能であることが今回の研究により明らかとなった。

### E. 結論

マウスプリオン株(mBSE、Chandler)を用いたPMCA法の条件検討を行い、超音波条件を最適化することにより、1round(48時間)の反応でほぼ最大の検出感度に達するレベルまで増幅効率が劇的に上昇した。さらにmBSE感染マウス由来の血漿中のPrP<sup>Sc</sup>を増幅することにも成功した。これらの結果はPMCA法による実用的なプリオン病の診断法の開発に大きく貢献するものであると考えられる。

### [参考文献]

- 1) Saborio GP, Permanne B, Soto C. Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* 411 : 810-813, 2001
- 2) Castilla J, Saa P, Soto C : Detection of prions in blood. *Nat. Med.* 11 : 982-985, 2005
- 3) Murayama Y, Yoshioka M, Yokoyama T, Iwamaru Y, Imamura M, Masujin K, Yoshida S, Mohri S. Efficient in vitro amplification of a mouse-adapted scrapie prion protein. *Neurosci. Lett.* 413 : 270-273, 2007
- 4) Saa P, Castilla J, Soto C. Ultra-efficient replication of infectious prions by automated protein misfolding cyclic

amplification. J. Biol. Chem. 281 :  
35245-35252, 2006

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表(2008/4/1~2009/3/31 発表)

##### 1. 論文発表

- 1) Atarashi R, Wilham JM, Christensen L, Hughson AG, Moore RA, Johnson LM, Onwubiko HA, Priola SA, Caughey B. Simplified ultrasensitive prion detection by recombinant PrP conversion with shaking. Nature Methods. 5(3) : 211-212, 2008.3

##### 2. 学会発表

- 1) PMCA法によるマウスプリオン株の高効率の増幅. 第56回日本ウイルス学会学術集会一般公演. 岡山, 2008.10.28

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし。

##### 2. 実用新案登録

なし。

##### 3. その他

なし。



## プリオン病患者 MRI 画像スコア化の試みと脳脊髄液の診断マーカー比較検討

研究分担者：調 漸 保健・医療推進センター  
研究協力者：佐藤 克也 長崎大学医歯薬学総合研究科(第一内科)  
研究協力者：山田 正仁 クロイツフェルト・ヤコブ病サーベイランス委員会

### 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これまでには 14-3-3 蛋白などの幾つかのマーカーの診断的意義が知られていた。我々は 14-3-3 蛋白陰性例での総 tau 蛋白の定量的診断的意義、CJD 患者での特異性・感度を報告し、平成 19 年度の本研究班にて 14-3-3 蛋白の判定基準の明確化について報告した。さらにこれまでにサーベイランス委員会のもとで集積できた 193 症例について総タウ蛋白、14-3-3 蛋白、NSE、S-100 蛋白について検討を行い、診断精度を高める目的で拡散強調画像の陽性所見をスコア化した画像データ(DWI-CJD-POINT)と生化学マーカーの比較検討で診断精度を高めることを試みた。これまでに検討できたプリオン病患者での総計 193 症例(14-3-3 蛋白：86.5%、総 tau 蛋白：95.5%、S-100 蛋白：40.5%)との結果を得た。

MRI 拡散強調画像データのスコア化はサーベイランスにかけられた症例のうち 100 症例を検討したが DWI-CJD-POINT スコア 6 点を超えるケースで CJD の可能性が極めて高いことが明らかになった。

### A. 研究目的

MRI 拡散強調画像の検討から CJD における診断精度を高める目的でスコア化(DWI-CJD-POINT)を試みた。さらにこれまでにサーベイランス委員会のもとで集積できた 193 症例以上について総タウ蛋白、14-3-3 蛋白、NSE、S-100 蛋白について検討を行い、スコア化した画像データと生化学マーカーの検討で診断精度を高める試みを行う。

### B. 研究方法

#### (倫理面への配慮)

1. スコア化画像の検討(DWI-CJD-POINT)  
はサーベイランス委員会の調査に寄せられた画像スケッチを用いて、異常高信号の存在部位ごとにスコア化した。(図 1)

### 2. 脳脊髄液中の 14-3-3 蛋白 $\beta$ 及び $\gamma$ 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  $\gamma$  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(193 例)とその他の認知症患者(93 例)検体を用いて 14-3-3 蛋白  $\gamma$  アイソフォームの半定量化を行い、cut-off 値を決定した。

### 3-1. 対象

対象は CJD 患者(193 例)と対照群として認知症患者(93 例)とした。(表 1)

### 3-2. 方法

- a. 対照群(N=93)と CJD 患者(N=193)の脳脊髄液 14-3-3 蛋白(14-3-3- $\gamma$  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=193)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=193)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=193)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。CJD における MRI 拡散強調画像の診断精度を高める目的でスコア化(DWI-CJD-POINT)の関心領域を 18 か所として加点方式にて検討を行った。

### C. 研究結果

1. Western blot 法の統一プロトコールを作成した。
  - a. 14-3-3 蛋白の  $\beta$  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。 $\beta$  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。CJD 患者(193 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。
  - b. 14-3-3 蛋白  $\gamma$  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。CJD 患者(193 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 1,260pg/ml とした。(ヨーロッパ基準では 1,300pg/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  
cut off 値は ROCcurve にて決定した。cut-off 値は 2.2ng/ml とした。(ヨーロッパ基準 4.2pg/m としている。)

### 3-1. プリオン病患者の脳脊髄液の生化学的マーカーの検討

プリオン病患者 193 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=193)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- $\gamma$  定性)による比較検討の結果では古典型 CJD(157 例)において MRI 拡散強調画像 95.50%脳脊髄液(総 tau 蛋白 95.9% 14-3-3 蛋白(14-3-3- $\gamma$  定性)88.7%)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- $\gamma$  定性)50%)であった。193 例画像検査(MRI 拡散強調画像)92.80%、脳脊髄液(総 tau 蛋白 95.50%、14-3-3 蛋白(14-3-3- $\gamma$  定性)86.5%)であった。(表 1)

### 3-2. DWI-CJD-POINT の検討

193 症例の検討では DWI にて異常信号を認めない症例は 14 症例存在していた。しかしながら DWI において 1-5 点のみケース 65 例ある。しかしながら大脳皮質のみ局限しているのか基底核領域のみ局限している症例が 36 例存在している。つまり CJD と考えられ



た症例は大脳皮質と基底核に高信号領域を示す症例 29 例は DWI-CJD-POINT が 5 点以上を示していた。(図 2)

一方ほぼ ADL と DWI-CJD-POINT との相関関係は認めなかった。(図 3)

以上の結果より DWI-CJD-POINT は 5 点以上、大脳皮質と大脳基底核領域に高信号領域を示す症例(70%)は CJD の確率が高いと考えられた。

#### D. 考 察

ヨーロッパのプリオン病の髄液の検討結果とほぼ同じレベルで髄液の生化学的なマーカーを検討する事が可能となっている。14-3-3 蛋白及び総タウ蛋白にて 85%の精度で診断することができるようになった。

一方、DWI については高信号領域を示す症例が 92.8% と高率であるが、DWI-CJD-POINT は 5 点以上大脳皮質と大脳基底核領域に高信号領域を示す典型的な症例は 70%以上であることが示された。

#### E. 結 論

プリオン病患者において髄液の生化学的な検討と MRI 拡散画像データ解析にて 80%以上に判定できる程度まで達したと考えられる。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表(2008/4/1~2009/3/31 発表)

##### 1. 原著論文による発表

- 1) Takakura Y, Yamaguchi N, Nakagaki T et al. Bone marrow stroma cells are susceptible to prion infection. Biochemical and biophysical research communications. 377 : 957-961, 2008
- 2) 佐藤克也, 本村政勝. 【透析患者診療のための診断基準・重症度スコア 適切な病態評価のために】 臨床所見・徴候からのアプローチ 麻痺. 24 : 814-816, 2008

#### 2. 学会発表

##### 1) 国内

###### 口頭発表

- 1) 吉村俊朗, 福田 卓, 徳田昌紘, 佐藤克也, 辻野 彰, 調 漸, 竹尾 剛, 中村龍文. 本村政勝長崎県下地区別における筋萎縮性側索硬化症の発生率. 日本神経学会総会. 横浜, 2008.5.15-17
- 2) 佐藤克也, 調 漸, 江口勝美. プリオン病患者脳脊髄液中診断マーカーの比較検討. 日本神経学会総会. 横浜, 2008.5.15-17
- 3) 六倉和生, 佐藤克也, 辻野 彰, 本村政勝, 調 漸, 江口勝美. クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)患者における簡易診断キットの有効性. 日本神経学会総会. 横浜, 2008.5.15-17, 2008.10.31-11.1

##### 2) 海外

###### 口頭発表

なし

###### ポスター発表

- 1) Satoh K (First Department of Internal Medicine, Nagasaki University). Establishment of Standardization of 14-3-3 protein assay as a Diagnostic Tool in Creutzfeldt-Jakob disease patients' CSF NeuroPrion Spain, 2008.10.8-10
- 2) Matsui Y (Department of Pharmaceutical Care and Health Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University), Satoh K (First Department of Internal Medicine, Graduate School of Biomedical Science, Nagasaki University), Shirabe S (Nagasaki University) The useful application of rapid diagnostic screening system of heart-type fatty acid binding protein in CSF of CJD patients as a quick bed-side diagnostic tool NeuroPrion Spain, 2008.10.8-10