

D. 考 察

3E9 固相化は、A-FABP および M-FABP と弱く交差反応性を示した。しかし、実際の髄液検査において、CJD 診断に高い効果が確認された(図 1)ことから、この交差反応性は大きな影響を及ぼすものでないものと思われた。2 回の髄液検査から 3E9-HUFa26 が髄液 H-FABP 検出に有用であると想像された。

E. 結 論

ニワトリモノクローナル抗体とマウスモノクローナル抗体を組み合わせることによる H-FABP 検出は、抗体の交差反応性は認められたものの、髄液中 H-FABP 検出による CJD の診断に威力を発揮する優れた方法であることが立証された。

[参考文献]

1) Guillaume E, Zimmermann C, Burkhard P R, Hochstrasser D F, Sanchez J-C. A potential cerebral spinal fluid and plasmatic marker for the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Proteomics* 3 : 1495-1499, 2003

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表(2010/4/1~2011/3/31 発表)

1. 論文発表

1) Matsui Y, Satoh K, Matsukura K, Watanabe T, Nishida N, Matsuda H, Sugino M, Shirabe S, Eguchi K, Kataoka Y. Development of an ultra-rapid diagnostic method based on heart-type fatty acid binding protein levels in the CSF of CJD patients. *Cell Mol Neurobiol* 30 : 991-999, 2010

2) Tahara H, Ide K, Basnet NB, Tanaka Y, Matsuda H, Takematsu H, Kozutsumi Y, Ohdan H. Immunological property of antibodies against N-glycolylneuraminic acid epitopes in cytidine monophosphate-N-acetylneuraminic acid hydroxylase-deficient mice. *J Immunol* 184 : 3269-3275, 2010

3) Inoue N, Okamura T, Kokubo Y, Fujita Y, Sato Y, Nakanishi M, Yanagida K, Kakino A, Iwamoto S, Watanabe M, Ogura S, Otsui K, Matsuda H, Uchida K, Yoshimoto R, Sawamura T. LOX-1 index, a novel predictive biochemical marker for coronary heart disease and stroke. *Clin Chem* 56 : 550-558, 2010

2. 学会発表

1) Hatada M, Matsui Y, Sato K, Shirabe S, Matsuda H. Development of a sandwich ELISA for detection of FABP in cerebral spinal fluid from CJD patients. *Asia-Oceania Symposium on Prion Diseases*, Sapporo, 2010.7.24

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

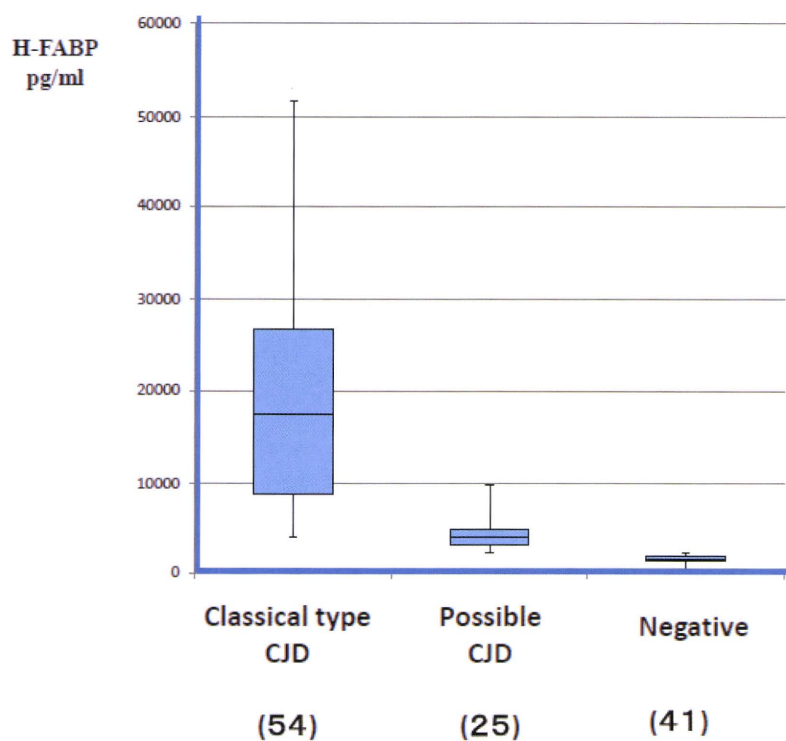


図1 3E9-HUFa26系を活用した髄液検査

Real-time QUIC 法 (QUaking-Induced Conversion) による クロイツフェルトヤコブ病患者由来髄液中の PrP^{Sc} の検出

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
研究分担者：佐藤 克也	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
研究分担者：佐野 和憲	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
研究分担者：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
研究分担者：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
研究分担者：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
研究分担者：松原 岳	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
研究分担者：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
研究分担者：山中 仁木	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
研究分担者：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	
研究分担者：山田 正仁	金沢大学大学院医学系研究科	脳病態医学講座脳老化・神経病態学(神経内科学)	
研究分担者：水澤 英洋	東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科	脳行動病態学	脳神経機能病態学分野
研究分担者：北本 哲之	東北大学大学院 医学系研究科附属創生応用医学研究センター	プリオン蛋白研究部門	
研究分担者：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

我々は、前年度までに確立した試験管内異常型プリオンタンパク (PrP) 増幅法である real-time QUIC 法を用いて、実際のクロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) 患者由来髄液中の異常型 PrP を増幅し検出することを試みた。その結果日本での CJD の definite case 由来髄液 18 例中 15 例で要請である一方、非 CJD 症例由来髄液 35 例すべてが陰性であった。さらに Australian National Creutzfeldt-Jakob Disease Registry との共同研究により提供された 30 例の髄液について Blind test を行ったところ、CJD 髄液、14/16 で陽性、非 CJD 髄液ではすべて陰性であった。これらの結果は real-time QUIC 法により、CJD の生前確定診断が可能であることを示唆していると考えられる。

A. 研究目的

近年、試験管内で異常型プリオンタンパク (PrP^{Sc}) を増幅する方法が開発され、プリオン病の診断法への応用が摸索されている。しかし、いまだクロイツフェルトヤコブ病 (CJD) を始めとするヒトのプリオン病での高感度な PrP^{Sc} 検出の成功例は報告されていない。本研究ではヒトプリオン病に適応可能な試験管内異常型プリオンタンパク増幅法を新規に開

発し、それを用いて CJD 患者由来髄液中に含まれるごく微量の PrP^{Sc} を増幅することにより、CJD の生前確定診断法を確立することを目的とする。

B. 研究方法

大腸菌からヒト配列の *rPrP-sen* をアフィニティークロマトグラフィーにより精製し、変換反応の基質として用いた。CJD 患者由来

の brain homogenate をシードとして QUIC 反応の条件検討を行った。変性剤(グアニジン塩酸、尿素)の濃度、塩濃度、pH, *rPrP^{sen}* の濃度などを中心として行い、real-time QUIC 法の最適条件を決定した。

その後、実際に日本での CJD の definite case 由来髄液 18 例と非 CJD 症例由来髄液 35 例を用いて real-time QUIC 法を行い、感度、特異度について検証した。さらに Australian National Creutzfeldt-Jakob Disease Registry との共同研究により提供された 30 例の髄液について Blind test を行い、この方法の有用性について検討した。

(倫理面への配慮)

本研究課題ではプリオン感染試料、特に CJD 感染試料を用いるのですべ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。患者検体は長崎大学医学部付属病院その他の共同研究グループにより患者・家族のインフォームドコンセントの下、採取され、供給された。

C. 研究結果(図表を 1~2 点添付)

日本での CJD 髄液、15/18 で陽性であった。一方、陰性コントロールとして用いた CJD 以外の疾患由来の髄液 35 症例はすべて陰性であった。Blind test では CJD 髄液、14/16 で陽性、非 CJD 髄液ではすべて陰性であった。

D. 考 察

日本での症例での感度は 83.3%、特異度は 100%、一方オーストラリア症例での Blind test では感度は 87.5%、特異度は 100%であった。この結果はこれまで CJD の髄液マーカーとして用いられている 14-3-3 タンパクを感度では同等、特異度では上回るものである。また real-time QUIC 法が髄液中の PrP^{Sc} を増幅して検出する方法であることから CJD の診

断的意義は非常に高いと考えられる。

E. 結 論

今回の研究により、real-time QUIC 法は CJD の診断に有用性が高く、特に生前の確定診断が髄液検査により可能となったと考えている。

F. 研究発表(2010/4/1~2011/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Atarashi R, Satoh K, Sano K, Fuse T, Yamaguchi N, Ishibashi D, Matsubara T, Nakagaki T, Yamanaka H, Shirabe S, Yamada M, Mizusawa H, Kitamoto T, Klug G, McGlade A, Collins SJ, Nishida N : Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluid by real-time quaking-induced conversion. *Nature Medicine* 2011, in press
- 2) Wiham JM, Orru CD, Bessen RA, Atarashi R, Sano K, Race B, Meade-White KD, Taubner LM, Timmes A, Caughey B : Rapid end-point quantitation of prion seeding activity with sensitivity comparable to bioassays. *PLoS Pathogens* 6(12) : e1001217, 2010.12.2
- 3) Kim JI, Cali I, Surewicz K, Kong Q, Raymond GJ, Atarashi R, Race B, Qing L, Gambetti P, Caughey B, Surewicz WK : Mammalian prions generated from bacterially expressed prion protein in the absence of any mammalian cofactors. *J Biol Chem* 285(19) : 14083-14087, 2010

2. 学会発表

- 1) 新竜一郎. 招待講演 : シンポジウム I 「プリオン病の疫学から治療まで」, 第 15 回日本神経感染症学会, 福島, 2010.10.8

- 2) 新竜一郎. Diagnosis, therapy and decontamination: Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluids using real-time quaking-induced conversion. Prion2010, オーストリア, ザルツブルグ, 2010.9.9
- 3) 新竜一郎. Hot topics : Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluids using real-time quaking-induced conversion, Asia-Oceania Symposium on Prion diseases 2010, 札幌, 2010.7.25
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

表1 日本の症例(CJD18例、非CJD症例35例)でのRT-QUIC法と髄液マーカー14-3-3タンパクとの感度・特異度の比較

	CSF samples in Japan [Pilot study]	
	RT-QUIC	14-3-3 (γ -isoform)
Sensitivity	83.3% (15/18)	72.2% (13/18)
Specificity	100% (0/35)	85.7% (5/35)

表2 Blind条件により行ったオーストラリアの症例(30例)でのRT-QUIC法と髄液マーカー14-3-3タンパクとの感度・特異度の比較

	CSF samples from Australia [Blind study]	
	RT-QUIC	14-3-3 (all isoforms)
Sensitivity	87.5% (14/16)	87.5% (14/16)
Specificity	100% (0/14)	71.4% (4/14)

クラスリン依存性エンドサイトーシス阻害剤処理による PrP^{Sc} 細胞内局在の変化

研究分担者：堀内 基広 北海道大学大学院獣医学研究科獣医衛生学教室

研究協力者：山崎 剛士 北海道大学大学院獣医学研究科獣医衛生学教室

研究要旨

Chlorpromazine (CPN) はクラスリン依存性エンドサイトーシスを阻害剤であり、プリオン持続感染細胞での PrP^{Sc} の産生を阻害することが知られている。本研究では CPN の PrP^{Sc} 産生阻害機序を調べるために、CPN 処理による PrP^{Sc} の細胞内局在の変化を解析した。その結果、CPN 処理により、PrP^{Sc} は後期エンドソームおよびリソソームに移行して消失する傾向が認められた。同じくクラスリン依存性エンドサイトーシスの阻害剤である monodansylcadaverine (MDC) で処理した場合も、PrP^{Sc} は後期エンドソームおよびリソソームに移行後に消失した。細胞を CPN 処理後に、monensin あるいは bafilomycin A1 存在下で培養した場合、PrP^{Sc} の分解が阻害された。以上の結果から、CPN 処理により、PrP^{Sc} は後期エンドソームおよびリソソームに移行して分解されると考えられた。従って、これらのコンパートメントは PrP^{Sc} の産生あるいは蓄積の場ではなく、分解の場であることが示唆された。

A. 研究目的

プリオンの増殖機構の解明は、プリオン増殖を標的としたプリオン病の予防・治療法を確立するために重要である。プリオンの主要構成要素である PrP^{Sc} の細胞内局在を明らかにすることは、プリオンの増殖機構を解明する一助となる。PrP 分子のアミロイド原性の高い領域の近傍を認識する抗 PrP モノクローナル抗体 (monoclonal antibody, mAb) 132 を用いることで、PrP^{Sc} を再現性良く検出できる¹⁾。

そこで本研究では、プリオン増殖抑制活性を有する化合物の作用機序を解析する目的で、プリオンの増殖を抑制することが報告されている chlorpromazine (CPN) 処理により PrP^{Sc} の細胞内局在がどのように変化するかを調べた。CPN はクラスリン依存性エンドサイトーシスを阻害することが知られていることから、同じくクラスリン依存性エンドサイトーシス

の阻害剤である monodansylcadaverine (MDC) 処理による PrP^{Sc} の細胞内局在の変化も調べた。

B. 研究方法

- 1) 蛍光抗体法 (IFA) : プリオン 22L 株および Chandler 株が持続感染したマウス神経芽腫細胞サブクローン (ScN2a3-22L および ScN2a3-Ch) を用いた。細胞を 4% sucrose を含む 4% paraformaldehyde-PBS を用いて 37°C で 10 分間固定した。0.1 M glycine-PBS を用いて残存する paraformaldehyde を中和した後、0.1% saponin-PBS を用いて細胞膜の透過処理を行った後、免疫染色を実施した。PrP^{Sc} の特異的検出のために、固定後の細胞を 5M GdnSCN で 10 分間処理した。抗 PrP 抗体として mAb 132 を用いた¹⁾。
- 2) ScN2a3-22L を CPN もしくは MDC 存在

下で 3 日間培養した。培養開始後、経時的に細胞を固定して IFA を行った。また、CPN あるいは MDC 処理開始 24 時間後に、V-ATPase の阻害剤である bafilomycin A1、あるいは bafilomycin A1 とは異なる作用機序でエンドソームの酸性化を阻害する monensin を作用させた。

(倫理面への配慮)

プリオン持続感染細胞を用いた実験計画は、北海道大学病原微生物等安全管理委員会にて承認されている。

C. 研究結果

CPN はプリオン持続感染細胞における PrP^{Sc} の産生を阻害するが、その機構は不明である。CPN 処理した細胞での PrP^{Sc} の細胞内局在を経時的に調べたところ、処理後 2 時間ころから PrP^{Sc} の局在が変化し、1 日後には PrP^{Sc} の顆粒状染色像が減少するとともに、特徴的な所見として Lamp1 陽性の小胞(後期エンドソーム [LE] および多胞体 [MVB]) と PrP^{Sc} の共局在が顕著になった(図 1)。従って、CPN は、PrP^{Sc} の細胞内輸送系路を変えることで、細胞内の PrP^{Sc} 分解を促進させると考えられた。

CPN はクラスリン依存性エンドサイトーシスを阻害することが知られていることから、同じくクラスリン依存性エンドサイトーシスの阻害剤である MDC 処理による PrP^{Sc} の細胞内局在の変化を調べた。CPN 処理の場合と同様に、1 日後には PrP^{Sc} は Lamp1 陽性の顆粒と共局在する像が認められ、2 日後には PrP^{Sc} の顆粒状の染色像は著しく減少した(図 2)。

クラスリン依存性エンドサイトーシスを阻害すると、PrP^{Sc} は Lamp1 陽性の小胞に移行して消失する傾向が認められたことから、エンドソームの酸性化の阻害により、PrP^{Sc} の分解が阻止されるかどうかについて検討した。

ScN2a3-22L を CPN 存在下で 1 日間培養した後、monensin あるいは bafilomycin A1 存在下で 1 日間培養すると、陰性対照の細胞では、PrP^{Sc} の蛍光強度が著しく減弱するのに対し、monensin あるいは bafilomycin A1 処理した細胞では、PrP^{Sc} のシグナルの減弱が軽度であった(図 3)。

D. 考 察

プリオン持続感染細胞を CPN あるいは MDC で処理した場合、早期から PrP^{Sc} の局在が変化して、LE/MVB に移行して消失することを示唆する結果が得られた。従って、クラスリン依存性エンドサイトーシス阻害剤処理により、PrP^{Sc} が LE/MVB に移行し、やがて分解されることが示唆された。CPN 処理開始してから 1 日後に、細胞内小胞の酸性化を阻害する Bafilomycin A1 を作用させたところ、LE/MVB に存在する PrP^{Sc} が消失しない傾向が認められたことから、LE/MVB およびリソソームは PrP^{Sc} 産生や蓄積の場ではなく、分解の場であることが示唆された。

E. 結 論

chlorpromazine のプリオン増殖阻害機序として、chlorpromazine 処理により PrP^{Sc} が後期エンドソーム/多胞体に移行して分解されることを明らかにした。また、後期エンドソーム/多胞体およびリソソームは、PrP^{Sc} 産生や蓄積の場ではなく、分解の場であることが示唆された。

[参考文献]

- 1) Nakamitsu S, Kurokawa A, Yamasaki T, Uryu M, Hasebe R, Horiuchi M. Cell-density dependent increase of the amount of protease-resistant PrP in prion-infected Neuro2a mouse neuroblastoma cells. J Gen Virol 91 : 563-569, 2010

F. 研究発表(2010/4/1~2011/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Sakata H, Horiuchi M, Takahashi I, Kinjo M. Conformational Analysis of Soluble Oligomers of GFP Tagged Prion Protein by Fluorescence Fluctuation Spectroscopy. *Curr. Pharm. Biotechnol* 11 : 87-95, 2010
- 2) Sato Y, Shimonohara N, Hanaki KI, Goto M, Yamakawa Y, Horiuchi M, Takahashi H, Sata T, Nakajima N. ImmunoAT method : an initial assessment for the detection of abnormal isoforms of prion protein in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *J. Virol. Methods* 165 : 261-267, 2010
- 3) Watanabe Y, Hiraoka W, Igarashi M, Ito K, Shimoyama Y, Horiuchi M, Yamamori T, Yasui H, Kuwabara M, Inagaki F, Inanami O. A novel copper(II) coordination at His186 in full-length murine prion protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 394 : 522-528, 2010
- 4) Sassa Y, Yamasaki T, Horiuchi M, Inoshima Y, Ishiguro N. The effects of lysosomal and proteasomal inhibitors on abnormal forms of prion protein degradation in murine macrophages. *Microbiol. Immunol* 54 : 763-768, 2010

2. 学会発表

- 1) Sakai K, Song C-H, Hasebe R, Horiuchi M. Analysis of pathobiology of prion infection in Cd14 gene deficient mice. *Asia-Oceania Symposium on Prion*

Diseases. Sapporo, Japan, 2010.7.24-25

- 2) Yamasaki, T., Suzuki, A., and Horiuchi, M. Clint-1 mediated clathrin-dependent retrograde transport is involved in PrPSc trafficking in Neuro2a mouse neuroblastoma cells. *Prion2010*, Salzburg, Austria, 2010.9.8-11
- 3) Hasebe, R., Horiuchi, M., and Caughey, B. Reaction of complement factors differs with prion strains in vitro and in vivo. *Prion2010*, Salzburg, Austria, 2010.9.8-11
- 4) Sakaguchi, S., Horiuchi, M., Yamakawa, Y., Sata, T., and Furuoka, H. Temporal kinetics of prion protein accumulation and its effect on neurotransmitters in the cerebellum of guinea pigs infected with BSE prion. *Prion2010*, Salzburg, Austria, 2010.9.8-11
- 5) Horiuchi, M. Application of anti-PrP antibody recognizing the most amyloidogenic region for the detection of PrPSc in immunocyto- and immunohistochemistry. *Prion Japan & Canada*, Tokyo, Japan, 2010.11.11-12

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

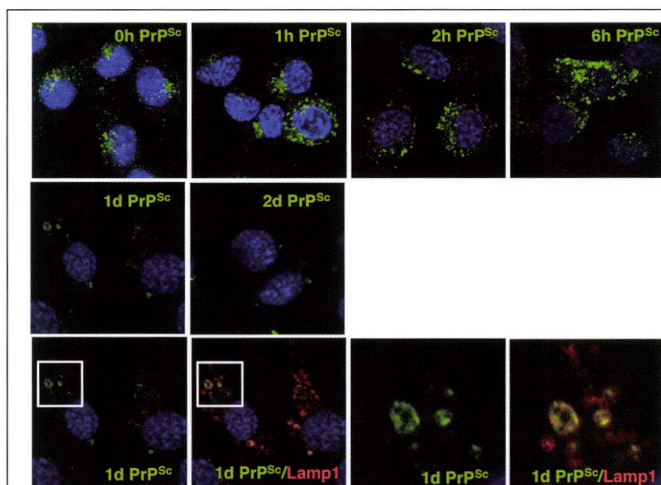


図1 chlorpromazine (CPN)処理によるPrP^{Sc}細胞内局在の変化
 処理後0時間から2日までの変化を示した。1日後は、PrP^{Sc}とLamp1の二重染色像も示した(下段)。下段左2枚の拡大像を右側に示した。

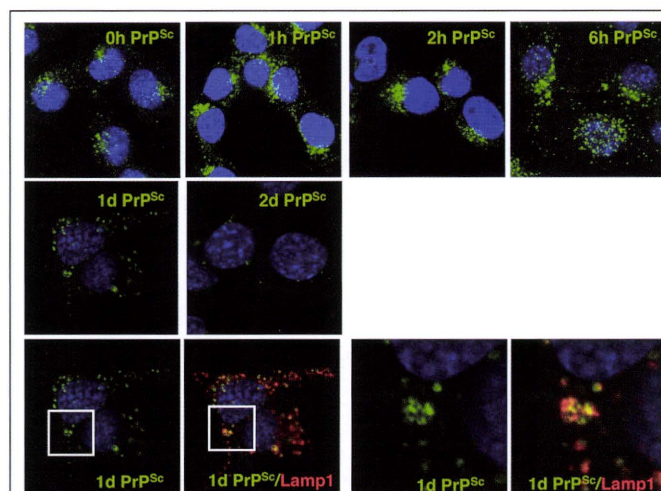
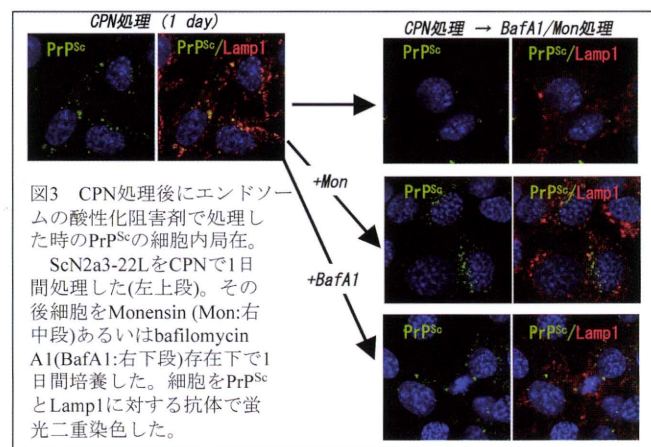


図2 Monodansylcadaverine(MDC)処理によるPrP^{Sc}細胞内局在の変化
 処理後0時間から2日までの変化を示した。1日後は、PrP^{Sc}とLamp1の二重染色像も示した(下段)。下段左2枚の拡大像を右側に示した。



プリオン病の治療予防開発に関する基礎研究

研究分担者：堂浦 克美 東北大学大学院医学系研究科
研究協力者：照屋 健太 東北大学大学院医学系研究科
研究協力者：逆瀬川裕二 東北大学大学院医学系研究科
研究協力者：濱中 大一 東北大学大学院医学系研究科
研究協力者：木村 朋寛 東北大学大学院医学系研究科
研究協力者：小熊 歩 東北大学大学院医学系研究科
研究協力者：西澤 桂子 東北大学大学院医学系研究科
研究協力者：河田 真樹 東北大学大学院医学系研究科

研究要旨

臨床で使われている既製薬の中で、免疫賦活剤として抗ガン療法と併用して使われるクレスチンは、プリオン感染細胞においてプリオンの増殖を抑えた。プリオン感染動物でも潜伏期間を延長させる効果が見られたが、その効果は低かった。免疫賦活作用には直接関連しない高分子タンパク質性成分が抗プリオン活性を持つこと、他の同様な既製薬に抗プリオン活性が見られないこと、クレスチン投与動物ではクレスチンの抗プリオン活性を中和する自己抗体が産生されることより、免疫賦活作用が抗プリオン活性に結びついているとは考え難い。新たなタイプの抗プリオン活性物質として、プリオン増殖機序解明のツールとして期待できる。

A. 目的

臨床で使われている既製薬の中で、抗プリオン活性を発揮するものがあれば、疾患モデル動物での効果を検証した後は早期にプリオン病患者に臨床応用することが可能であり、これまでもその探索は行われてきた。しかし、未だに疾患モデル動物において十分な効果を期待できるものは見つかっていない。我々も、可能性のある既製品をプリオン持続感染細胞での解析やプリオン蛋白との相互作用解析で探索してきた。その中で、日本で免疫賦活剤として抗ガン療法と併用されて使われる既製薬に抗プリオン活性を発見したので、その作用機序と効果について解析し、プリオン病治療への応用が可能かどうかを調べた。

B. 材料と方法

- 材料:わが国の臨床で使用されている免疫賦活剤であるクレスチン(以下 PSK)、ソニフィラン、レンチナン、ピシパニール、ベスタチンを製薬企業より原末を入手して用いた。
- 持続感染細胞での効果:各種プリオン株(RML、福岡 1、22L)が持続感染したマウス神経芽細胞種細胞の培養液中に化合物を添加し、3日間培養を行い持続感染細胞中の異常型プリオン蛋白量への効果を調べた。また、正常型プリオン蛋白への影響をウエスタンブロット、フローサイトメトリーやフローテーションアッセイなどで解析した。さらに、異常型プリオン蛋白分解とオートファジーの関連が指摘されて

いるため、オートファジーの促進があるかどうかをオートファゴソーム関連蛋白の発現変化で検討した。

- ・有効成分の同定: プリオン活性を発揮する有効成分を同定するため、ゲル濾過による分画、等電点電気泳動による分画などによる絞込みを行うとともに、構成成分の分析を行った。
- ・ *in vivo* 実験: RML プリオンの 1% ホモジネート液 100 μ l を Tga20 マウスの腹腔内に接種して感染させた。感染させる直前に化合物(100mg までの耐用量)をマウスの背部皮下に単回投与した。各マウスについて感染から発症末期までの日数を計測し、発症遅延効果の有無を統計的に解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験は東北大学の許可を受け、東北大学動物実験指針を遵守して行った。

C. 研究結果

細胞での評価: わが国で免疫賦活剤として臨床で使われている PSK に抗プリオン活性が認められた。いずれのプリオン持続感染細胞においても 10 μ g/mL 前後で異常型プリオン蛋白量を半減させた。正常型プリオン蛋白の総量や細胞膜上の正常型プリオン蛋白発現量やラフトマイクロドメイン中の正常型プリオン蛋白量に、PSK による影響は観察されなかった。また、異常型プリオン蛋白を含む細胞溶解液を PSK と反応させても異常型プリオン蛋白量やプロテアーゼに対する抵抗性は変わらなかった。一方、PSK 以外の他の免疫賦活剤には、細胞毒性がない範囲内の濃度では異常型プリオン蛋白量を減少させる効果は観察されなかった。

有効成分の評価: Protein-bound polysaccharide K の名称が示す通り、PSK はカワラタケ菌糸体から熱水抽出された蛋白多糖体であることより、抗プリオン活性が PSK のどのような構造に存在するか分析を進めた。PSK をゲル濾過で分画したところ 200kDa 以上の画分に

活性成分の濃度が高いことがわかった。次に、この画分を緩い条件で加水分解を行い、その産物をゲル濾過で分画したものを検討したが、小さい分子量画分には活性はほとんど検出されなかった。さらに等電点電気泳動による分画等を行ない、有効成分を含む画分の絞込みを行ったところ、活性を持つ成分が弱酸性画分に高濃度に含まれることが判明した。さらに、PSK に蛋白質変性分解処理を施すと抗プリオン活性が減弱することより、PSK を蛋白質成分と糖質成分に分離し、それぞれの抗プリオン活性を調べた。その結果、PSK のタンパク質性成分に抗プリオン活性があることが判明した。さらに、PSK 蛋白質成分をゲル濾過で分画したところ、200kDa 以上の高分子画分に活性成分の濃度が高いことがわかった。
In vivo での治療効果: PSK の効果を早発系マウス Tga20 を用いて検討した。皮下に 100mg 単回投与を行い、プリオンを脳内感染させた際には潜伏期間を延長させる効果は観察されなかったが、プリオンを腹腔内感染させた際には有意な潜伏期間の延長が観察された。しかし、その効果の程度は、限られていた。また、腹腔感染させた場合でも混餌して耐用量を経口で連日摂取させても、潜伏期間の延長は観察されなかった。PSK 以外の他の免疫賦活剤についても同様に耐用量あるいは投与可能量を皮下に単回投与を行い、腹腔内感染での効果を検討したが、有意な潜伏期間の延長は観察されなかった。さらに、PSK 投与マウスの血清中の IgG を調べたところ、PSK の抗プリオン活性を中和する自己抗体の存在が確認された。

D. 考察

PSK は様々な免疫賦活作用により抗ガン活性や抗ウイルス活性、抗真菌活性を持っていることが報告されている。しかし、これまでに抗プリオン活性の報告はない。今回の研究から、PSK の抗プリオン活性が本来 PSK が有している免疫賦活作用とはまったく異なることが明らかとなった。すなわち、PSK の免疫賦活作用は糖質成分に存在しているが、抗プリオン活性は PSK の蛋白質成分に存在

した。また、PSK のビボでの活性も免疫賦活作用に依らないことは、他の免疫賦活剤に効果が認められなかったことや、臨床で使われている経口投与では効果がなく皮下への投与で効果があった点や、ビボで抗プリオン活性に対する自己抗体が産生される点とも矛盾しない。今回の結果の中で、ビボでの効果が低かったのが、自己抗体の産生に依る可能性が十分に考えられることなどを考えると、PSK のプリオン病患者治療への応用は現実的ではないことは明らかである。しかし、これまでにこのような高分子蛋白質が抗プリオン活性を発揮する報告例はなく、プリオン病克服のための新たなシーズであり、その構造の解明や抗プリオン活性のメカニズム解明がプリオン病治療開発に新たな展開をもたらす可能性がある。

E. 結 論

これまでには報告がない新たな抗プリオン活性を持つ既製薬品としてクレスチンを発見した。抗プリオン活性は高分子タンパク質性成分に存在し、本来のクレスチンの免疫賦活作用成分とは異なっていた。

[参考文献]

なし

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表(2010/4/1～2011/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Hamanaka T, Sakasegawa Y, Omoto A, Kimura T, Ando T, Doh-ura K. Anti-prion activity of protein-bound polysaccharide K in prion-infected cells and animals. *Biochem Biophys Res Commun* 2011, in press
- 2) Teruya K, Nishizawa K, Doh-ura K.

Semisynthesis of a protein with cholesterol at the C-terminal, targeted to the cell membrane of live cells. *Protein J.* 29(7) : 493-500, 2010.10

- 3) Okamura N, Shiga Y, Furumoto S, Tashiro M, Tsuboi Y, Furukawa K, Yanai K, Iwata R, Arai H, Kudo Y, Itoyama Y, Doh-ura K. In vivo detection of prion amyloid plaques using [(11)C]BF-227 PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 37(5) : 934-941, 2010.5

2. 学会発表

国際学会

- 1) Sakasegawa Y, Nakabayashi S, Nishizawa K, Oguma A, Doh-ura K. CC chemokines are upregulated in prion-infected neuroblastoma cells. *Asia-Oceania Symposium on Prion Diseases, Sapporo, 2010.7.24-25*
- 2) Kimura T, Nishizawa K, Doh-ura K. Search for endogenous factors involved in the abnormal PrP formation in prion-infected cells. *Asia-Oceania Symposium on Prion Diseases, Sapporo, 2010.7.24-25*
- 3) Teruya K, Doh-ura K. A thioflavin derivative facilitates cross-linking of abnormal PrP but not normal PrP. *Asia-Oceania Symposium on Prion Diseases, Sapporo, 2010.7.24-25*
- 4) Hamanaka T, Sakasegawa Y, Oguma A, Nishizawa K, Doh-ura K. Anti-prion activities of PSK in vitro and in vivo -further evaluation of its function-. *Asia-Oceania Symposium on Prion Diseases, Sapporo, 2010.7.24-25*

国内学会

- 1) 堂浦克美. ヤコブ病の克服研究. 第4回ブ

リオン病の市民講座 食と医療の安全,
東京, 2010.11.23

- 2) 逆瀬川裕二, 堂浦克美. 熱ショック蛋白質 Hsp90 のリコンビナントプリオン蛋白質に対する部分変性活性は低濃度 Cu(II) イオンによって可逆的に制御される. 第 33 回日本分子生物学会・第 83 回日本生化学会合同大会, 神戸, 2010.12.7-10

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

CJD 早期診断における拡散強調画像の機種間差異：ADC 値の検討

分担協力者：佐々木真理 岩手医科大学先端医療研究センター

研究要旨

拡散強調画像の機種間差異は大きく、その定量値である apparent diffusion coefficient (ADC) 値も装置に依存した種々の要因の影響を受けている。そこで、同一対象を種々の装置で撮像し、ADC 値の装置間差異について検討した。ADC 値は機種間で最大 9%・企業間で最大 18%・磁場強度で最大 30%異なっており、被験者内差異 5%、計測者内差異 2%より有意に大きかった。CJD の早期診断における ADC 値の使用は低磁場装置や絶対値では問題があり、1.5T 以上の装置で相対値を用いるのが望ましいと考えられた。

A. 研究目的

拡散強調画像 (DWI) は CJD の早期診断に有効と考えられているが、不安定な表示条件や大きな機種間差異などの問題を有しており、正確な判定の妨げになっていた。我々は ASIST-Japan 法を用いて DWI の表示条件を標準化することで診断精度が向上することを明らかにし、また、磁場強度・ハードウェア・ソフトウェアによる画像特性の差異を明らかにすることで、CJD 早期診断における pitfall を明らかにしてきた。

今回我々は、DWI の定量的指標である apparent diffusion coefficient (ADC) 値の相互比較を行い、機種や磁場強度による差異を明らかにすることで、ADC 値が CJD 早期診断の客観的指標となりうるか否かについて検討した。

B. 研究方法

12 人の健常ボランティア (27-44 歳、男性 7 名・女性 5 名) を対象に、5 社 12 機種の MRI (1.5T, 4 社 x2 ; 3.0T, 1 社 x2 ; 0.4T, 1 社 x2) を用い、AC-PC 線に平行な水平断 DWI (single-shot EPI, 6mm 厚, 128x80-128,

b=1000 s/mm²) を撮像した。得られたデータから同一ソフトウエアを用いて ADC マップを作成し、視床、前頭葉白質の ADC 値を円形 ROI (100 mm²) を用いて計測した。得られた値を機種間、企業間、磁場強度間、コイルシステム間で比較検討した。

(倫理面への配慮)

倫理委員会の承認を得、書面によるインフォームドコンセントを取得した。画像データの匿名化を行った後に解析した。

C. 研究結果

健常者の ADC 値は視床 $755 \pm 29 \times 10^{-6}$ mm²/s、白質 $763 \pm 29 \times 10^{-6}$ mm²/s であった。

ADC 値の同一企業装置における機種間差異は $29-56 \times 10^{-6}$ mm²/s (3.8-8.8%)、企業間差異は $2-143 \times 10^{-6}$ mm²/s (0.3-18.4%)、コイルシステム間差異は $44-56 \times 10^{-6}$ mm²/s (5.7-7.0%) であり、被験者内差異 ($19-43 \times 10^{-6}$ mm²/s (2.5-5.4%))、計測者内差異 ($11-16 \times 10^{-6}$ mm²/s (1.4-2.2%)) に比し有意に大きかった。

磁場強度間差異は 1.5T に対し 3.0T では 32

$\times 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$ (4.2%) だったが、0.4T では $316 \times 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$ (29.5%) であった。

D. 考 察

早期 CJD における DWI の異常信号はしばしば淡く、視覚的判定に難渋する 경우가少なくない。より客観的な判定には ADC 値の計測が有望と考えられるが、その信頼性は十分検証されていなかった。今回の我々の検討で、ADC 値の機種間差異は、たとえ同一企業内でも無視できないほど大きいことが明らかとなり、CJD 診断での使用には慎重を期す必要があると考えられた。中でも、企業によっては他と 20%近い差が認められ、撮像シークエンス自体に問題がある可能性が示唆された。低磁場装置では他と 30%近い差が認められ、低磁場特有の強いアーティファクトによる影響を排除することが困難なためと考えられた。また、同一装置でもコイルシステムによる差異が認められ、感度補正技術のさらなる向上が必要と考えられた。

E. 結 論

DWI における ADC 値は、機種・企業・磁場・コイルシステムによって少なからず異なっていた。ADC 値を CJD 早期診断の客観的指標として使用するには、1) 1.5T 以上の装置を用いること、2) 絶対値ではなく対側比などの半定量値を用いることが必要と考えられた。

[参考文献]

- 1) Hirai T, Sasaki M, Maeda M, et al. Diffusion-weighted imaging of ischemic stroke : effect of display method on observers' diagnostic performance. Acad

Radiol 16 : 305-312, 2009

- 2) Sasaki M, Yamada K, Watanabe Y, et al. Variability in apparent diffusion coefficient absolute values across different platforms may be substantial : a multi-vendor, multi-institutional comparison study. Radiology 249 : 624-630, 2008

F. 健康危険情報

MRI 撮像は体内・体外金属が無いことを確認の上、1.5T 以下は通常操作モード、3T は第一水準管理操作モードで行われており、安全性に問題はない。

G. 研究発表 (2010/4/1~2011/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Fujita K, Harada M, Yuasa T, Sasaki M, Izumi Y, Kaji R. Temporal evolution of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease monitored by 3-Tesla MR spectroscopy. J Neurol (in press)

2. 学会発表

なし

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

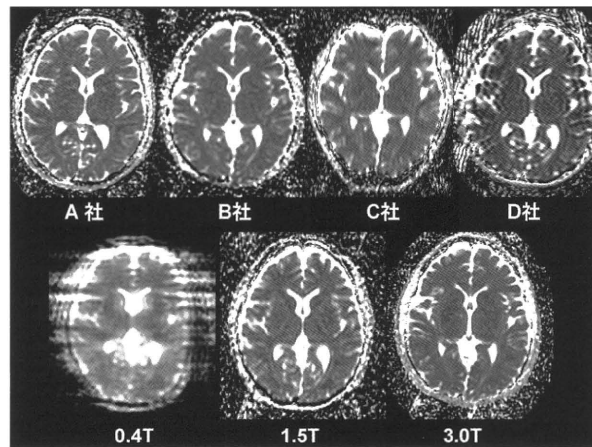


図1 同一健康者の各種MRI機種によるADCマップ

V180I 変異遺伝性クロイツフェルト・ヤコブ病患者での FDG-PET の検討

研究分担者：黒岩 義之 横浜市立大学大学院医学研究科神経内科

研究協力者：岸田 日帯 横浜市立大学大学院医学研究科神経内科

研究協力者：児矢 野繁 横浜市立大学大学院医学研究科神経内科

研究要旨

V180I 変異を有する遺伝性クロイツフェルト・ヤコブ病(fCJD-V180I)患者 3 例で FDG-PET 検査を施行した。fCJD-V180I では初期には、脳 MRI 拡散強調画像でも両側後頭葉内側面の大脳皮質に高信号域を認めないという報告がなされている。FDG-PET 検査でも孤発性 CJD や他の遺伝性 CJD と比べ、fCJD-V180I は両側後頭葉内側面の脳代謝が保持されていた。

A. 研究目的

我が国で最も多い遺伝性(家族性)クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)は、V180I 変異である。その特徴は Jin らによって報告されたとおりで¹⁾、脳 MRI 検査の拡散強調画像(MRI-DWI)検査では、初期には CJD に特徴的なリボン状高信号域が両側後頭葉内側面の皮質に出現しない点が特徴的とされる。今回、FDG-PET 検査で V180I 変異遺伝性 CJD(fCJD-V180I)患者についての検討を行ったので報告する。

B. 研究方法(倫理面への配慮)

2009 年 4 月～2010 年 9 月までに診療した 3 例の fCJD-V180I 患者を対象としている。当研究は当院倫理委員会の承認を得ており、患者またはその家族に対して研究について説明をおこない、全例で同意が得られている。

C. 研究結果

症例は 71 歳男性、81 歳女性、69 歳女性の 3 例で、それぞれ典型的な臨床経過だった。既知の報告にあるとおり、全 3 例とも脳 MRI-DWI 検査で両側後頭葉内側面に異常信

号域を認めなかった。同時期に施行した FDG-PET 検査から、全 3 例で同部位への核種の集積はそのほかの皮質に比べて保たれており、機能的にも保持されていることが判明した。

D. 考察

私達の FDG-PET による検討の結果、fCJD-V180I 患者では両側後頭葉内側面は機能的に保たれやすいことが判明した。このことから同部位の神経細胞の変性が起こりにくいと考えられる。一方、fCJD-V180I 患者で後頭葉内側面をのぞく皮質の脳 MRI-DWI 高信号域は、病理学的に海綿状変化であると推測されており²⁾、本研究の結果と矛盾しない。

PET 検査で fCJD-V180I 患者の両側後頭葉内側面での脳代謝保持についての報告は他に例を見ない。

E. 結論

fCJD-V180I 患者の FDG-PET 検査では、脳 MRI-DWI 検査結果と同様に両側後頭葉内側面の代謝が保たれやすい。

[参考文献]

- 1) Jin K, Shiga Y, Shibuya S, et al. Clinical features of Creutzfeldt-Jakob disease with V180I mutation. *Neurology* 62 : 502-505, 2004
- 2) Mutsukura K, Satoh K, Shirabe S, et al, *Dement Geriatr Cogn Disord* 28 : 550-557, 2009

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表(2010/4/1～2011/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) 岸田日帯, 黒岩義之. 感染予防. In : 厚生労働省科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業「プリオン病及び遅発性ウイルス感染症に関する調査研究班」・編. プリ

オン病と遅発性ウイルス感染症, 東京, 金原出版, 200-212, 2010

2. 学会発表

- 1) 岸田日帯, 黒岩義之. プリオン病の感染予防. 第 15 回日本神経感染症学会, 福島, 2010.10.8

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

プリオン蛋白遺伝子コドン 180 変異を伴うクロイツフェルト・ヤコブ病の 臨床病理学的特徴

研究分担者：岩崎 靖 小山田記念温泉病院 神経内科
研究協力者：三室 マヤ 愛知医科大学 加齢医科学研究所
研究協力者：吉田 眞理 愛知医科大学 加齢医科学研究所
研究協力者：橋詰 良夫 福祉村病院 神経病理研究所

研究要旨

V180I CJD の臨床病理学的特徴としては、高齢発症、家族歴がない、緩徐進行性、MRI・T2 強調像で大脳皮質腫脹像や拡散強調像で大脳皮質高信号が認められる、脳波上の周期性同期性放電は認めない、PrP 型解析で特徴的な所見がみられる、長期経過に比して神経細胞脱落や PrP 沈着が軽い等が認められた。

A. 研究目的

剖検例を用いたクロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)の臨床病理学的検討を行い、平成 20 年度は、大多数の CJD 例は典型的な臨床所見を呈し臨床診断は比較的容易であるが、非典型例では臨床診断が困難で、病理学的検索が必須であることを示した¹⁾。平成 21 年度は本邦 CJD 例の臨床経過が長いのは無動性無言状態に至ってからの長期延命によることを示した²⁾。今年度は、本邦の遺伝性 CJD で最も頻度の高い、プリオン蛋白(PrP)遺伝子コドン 180 に点変異を伴う CJD(V180I CJD) 例の臨床病理所見について検討した。

B. 研究方法

(倫理面への配慮)

愛知医科大学加齢医科学研究所において神経病理学的検索が行われた V180I CJD2 剖検例の所見を retrospective に検討した。また文献報告例の検討を加えて V180I CJD の臨床病理学的特徴を検討した。

C. 研究結果

症例 1³⁾：死亡時 82 歳男性。MRI・T2 強調像で大脳皮質腫脹像を認め、髄液 NSE 高値だった。無動性無言状態に至る前に肺炎で死亡(全経過 21 ヶ月)。臨床診断は非典型的 CJD だったが、凍結脳から施行した PrP 遺伝子解析にて V180I 変異が判明(codon129 Met/Val)。脳重 1060g、大脳皮質・基底核に広範な海綿状変化を認めるものの神経細胞は比較的保たれ、PrP 沈着は極めて軽度だった。
症例 2：死亡時 83 歳女性。初期には皮質基底核変性症と診断されたが、末梢血から施行した PrP 遺伝子解析にて V180I 変異が判明(codon129 Met/Met)。MRI・T2 強調像で大脳皮質腫脹像、拡散強調像で大脳皮質高信号を認め、髄液 NSE、14-3-3 蛋白および総タウ蛋白陽性だった。無動性無言状態で長期間安定し、呼吸不全のため死亡(全経過 102 ヶ月)。脳重 720g、大脳皮質・基底核の海綿状変化を認めるものの、大脳皮質の神経細胞は長期経過に比し比較的保たれ、PrP 沈着は軽度で、一部斑状沈着がみられた。

2 例とも家族歴はなく、失語と右上肢の失

行症状で発症、パーキンソニズムを呈した。ミオクロヌスを認めるものの周期性同期性放電(PSD)は認めなかった。凍結脳を用いたプロテアーゼ抵抗性 PrP の Western blot 解析では diglycoform band が存在しなかった。

D. 考 察

本検討例および文献的考察から V180I CJD の臨床的特徴は、1) 高齢発症、2) 家族歴がない、3) 緩徐進行性で全経過が長い、4) ミオクロヌスを認める、5) パーキンソニズムを呈する例が多い、6) 視覚症状や小脳症状はみられない、等があげられる。検査所見の特徴は 1) MRI・T2 強調像で大脳皮質腫脹像、拡散強調像で大脳皮質高信号がみられる、2) 髄液の NSE、14-3-3 蛋白および総タウ蛋白が陽性の例が多い、3) PSD は認めない例が多い、4) PrP 遺伝子 codon129 は Met/Val 多型を呈する例が多い、5) PrP の Western blot 解析で特徴的なバンドがみられる、等があげられる。病理的特徴は 1) 大脳皮質・基底核の海綿状変化、2) 長期経過に比して神経細胞脱落やグリオシスが軽い、3) 小脳、脳幹病変は認めないか軽度である、4) 免疫染色では非常に弱いシナプス型 PrP 沈着を認め、一部に斑状沈着を認める、等があげられる。

E. 結 論

V180I CJD は臨床病理学的所見が特徴的であるだけでなく、遺伝子的、蛋白解析結果も興味ある所見を呈する。V180I CJD には病態の進展に対してむしろ protective に作用する factor が存在するのではないかと推定される。V180I CJD は欧米では極めてまれであり、本邦でのさらなる検討・蓄積が必要である。

[参考文献]

1) Iwasaki Y, Mimuro M, Yoshida M, et al. Clinical diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease : accuracy based on analysis of

autopsy-confirmed cases. J Neurol Sci 277 : 119-123, 2009

- 2) Iwasaki Y, Mimuro M, Yoshida M, et al : Survival to akinetic mutism state in Japanese cases of MM1-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease is similar to Caucasians. Eur J Neurol 2010, (in press)
- 3) 岩崎 靖, 曾根美恵, 加藤武志, ら : プリオン蛋白遺伝子 codon 180 の点変異とことなるアシル上に codon 129 の多型を伴った Creutzfeldt-Jakob 病の臨床病理学的特徴. 臨床神経 39 : 800-806, 1999

F. 健康危険情報

本研究は剖検記録を元におこなった検討であり、健康危険に関する情報はない。

G. 研究発表(2010/4/1~2011/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Iwasaki Y, Mori K, Ito M, Nagaoka M, Ieda T, Kitamoto T, Yoshida M, Hashizume Y. An autopsied case of V180I Creutzfeldt-Jakob disease presenting with panencephalopathic-type pathology and a characteristic prion protein type. Neuropathology. 2010 (in press).
- 2) Kobayashi A, Mizukoshi K, Iwasaki Y, Miyata H, Yoshida Y, Kitamoto T. Co-occurrence of types 1 and 2 PrP^{res} in sCJD-MM1. Am J Pathol. 2010 (in press).
- 3) Saito Y, Iwasaki Y, Aiba I, Kitamoto T, Yoshida M, Hashizume Y. An autopsy case of MM2-cortical + thalamic-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. Neuropathology. 2010 (in press).
- 4) Iwasaki Y, Mimuro M, Yoshida M, Kitamoto T, Hashizume Y. Survival to akinetic mutism state in Japanese cases of MM1-type sporadic