

性 CJD が 2 例、家族性 CJD (GSS 1 例を含む) が 3 例であった。11 例の治療開始からの経過は平均 31 ヶ月 (4~65 ヶ月) で、治療前の modified Rankin Scale (mRS) は 2-5 で、現在は全例 5-6 となり症状は進行した。治療継続の 2 症例を含め 4 例は治療開始から 3 年以上の生存期間を示し、緩徐進行型孤発性 CJD 2 例と家族性で V180I 遺伝子変異の 2 例であった。副作用に関して、周術期において問題はみられなかったが、手術後 3 ヶ月以降、さまざまな程度の硬膜下水腫が全例に認められた。血液データ上、治療に関連する異常は見られなかった。6 例で剖検が得られ、1 例の詳細な解析において不溶性プリオンタンパク量がコントロールの脳に比べ少ないことが示され、4 例の剖検報告では不溶性プリオン蛋白/全プリオン蛋白比の低い症例があり、異常プリオン蛋白の定量を含め治療による影響の可能性が示唆される。PPS 脳室内持続投与は、安全で長期治療にも耐えうる治療法であると考えられる。

D. 考察

本研究の結果から、プリオン病に対する PPS 脳室内持続投与療法は、機能的な改善は示さないものの、生命予後の改善および病的に修飾する可能性を示唆した。英国で同治療を受けた変異型 CJD の生存期間は、その平均をはるかに上回っているという報告もある。

今後は新たな治療法の確立を模索する上で、基礎と臨床の統合研究で候補薬の新たな割り出しと治療対象の検討を進める必要がある。

E. 結論

プリオン病に対する PPS 脳室内持続投与療法は、生命予後の改善、脳内異常プリオン蛋白の蓄積を抑制する可能性が示唆されたが、治療効果としての機能的改善は示されなかった。今後の治療戦略を再度確立する方向で検討を進めるべきである。

[参考文献]

- 1) Terada T, Tsuboi Y, Obi T, Doh-ura K, Murayama S, Kitamoto T, Yamada T, Mizoguchi K. Less protease-resistant PrP in a patient with sporadic CJD treated with intraventricular pentosan polysulphate. *Acta Neurol Scand* 121:127-130, 2010.
- 2) Tsuboi Y, Doh-Ura K, Yamada T. Continuous intraventricular infusion of pentosan polysulfate: clinical trial against prion diseases. *Neuropathology* 29:632-636, 2009.
- 3) Honda H, Sasaki K, Minaki H, Masui K, Suzuki SO, Doh-Ura K, Iwaki T. Protease-resistant PrP and PrP oligomers in the brain in human prion diseases after intraventricular pentosan polysulfate infusion. *Neuropathology*, in press.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 坪井義夫. 【中枢神経系感染症の Up-To-Date】プリオン病に対する治療法の開発. *最新医学* 66:1025-1031, 2011.

2. 学会発表

なし

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

厚生労働科学研究費補助金（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 分担研究報告書

拡散強調画像によるプリオン病早期病変の診断能向上に関する研究

研究分担者：佐々木真理 岩手医科大学医歯薬総合研究所

研究要旨 我々は拡散強調画像(DWI)の表示条件標準化によってプリオン病の早期病変診断能が向上することを明らかにしてきたが、その診断精度は未だ十分とはいえない。そこで診断能の更なる向上を目的に、合同画像委員会を組織して多施設共同研究体制を構築した。薄切撮像や3 Tesla MRIによって診断能向上が期待できるため、1.5 Tesla と3 Tesla 装置による通常スライス厚と薄いスライス厚のDWIを前向きに集積し、連続確信度法による読影実験とROC解析を行う研究プロトコルを策定した。

A. 研究目的

MRI 拡散強調画像(diffusion weighted image: DWI)はプリオン病の早期診断に広く用いられているが、偽陽性・偽陰性が少なくないことが問題視されていた。我々はASIST-Japanの表示条件標準化法[1]を本症に応用し、1.5 Tesla装置において優れた早期病変診断能が得られることを多施設読影実験によって明らかにした[2]。

しかしながら、本病変はしばしば軽微であり、判定に迷う場合も未だ少なくない。また、近年注目されている3 Tesla MRIにおけるDWIの病変診断能が1.5 Teslaに比し必ずしも良好でない場合があることも報告されている[3]。従って、DWIによるプリオン病早期病変診断能の更なる向上につながる診断法の確立、ならびに3 Tesla MRIの診断能の検証と最適化が必要と考えられる。

一方で、急性期脳梗塞では、3mm厚の薄いスライスによって軽微な虚血病変の診断能が向上することが知られており[4]、3 Teslaにおいても2mm未満のスライスによって大幅な画質向上が得られることが報告されている[5]。

そこで我々は、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とプリオン病のサーベイランスと感染予防に関する調査研究班の合同画像委員会を組織し、前向き多施設研究を企画した。

B. 研究方法

合同画像委員会は以下のメンバーで構成し、多

施設研究の研究プロトコルの策定を進めた。岩崎靖(愛知医科大学加齢医科学研究所), 宇山直人(亀田総合病院放射線科), 佐々木真理(岩手医科大学医歯薬総合研究所), 佐藤克也(長崎大学感染分子解析学), 三條伸夫(東京医科歯科大学脳神経病態学), 高尾昌樹(東京都健康長寿医療センター神経病理学), 浜口毅(金沢大学脳老化・神経病態学), 原田雅史(徳島大学放射線科), 藤田浩司(徳島大学神経内科) (五十音順)。

また、過去の急性期脳梗塞患者で厚いスライスと薄いスライスのDWIを撮像した例、1.5Tと3Tを同時期に撮像した例を検索し、表示条件標準化法を適応後、病変検出能および画質を視覚的に判定した。

(倫理面への配慮)

画像データは匿名化を行った後に判定に供した。

C. 研究結果

急性期脳梗塞のDWIでは1.5T, 3Tとも薄いスライスで病変の検出能が向上し、artifactが軽減する傾向にあり、プリオン病患者を対象とした多施設研究の妥当性を裏付ける結果であった。

そこで、合同画像委員会にて、以下のような研究プロトコルを策定した。「1.5 Tesla および3 Tesla 装置を用いてプリオン病が疑われた患者 50 名を従来のスライス厚(5mm)と薄いスライス厚(3mm)のDWI ($b=1000s/mm^2$)で撮像する。得られた画像

を匿名化 DICOM 形式ファイルで収集し、ASIST-Japan 法で表示条件を正規化する。12 名の判定者による連続確信度法による読影実験を実施し、receiver operating characteristic (ROC)解析によって、曲線下面積(Az)を用いて各画像の診断能を検討する。」

D. 考察

DWIは基本画質が他の画像に比べ不良なため、表示条件を標準化しても、プリオン病早期病変のような淡い病変の診断能には限界がある。また、3 Tesla装置ではS/Nは向上するものの、皮髄コントラストやartifactが増強するため、診断能低下が危惧される。3mm以下の薄切撮像はこれらの問題を解決できる可能性があり、今回策定したプロトコルによる多施設研究を行うことによって撮像条件の最適化と診断能の向上と達成できると考えられます。

今後参加施設を募り、倫理委員会審査を経て、研究を実施する予定である。

E. 結論

DWI によるプリオン病早期病変の診断能の更なる向上には薄切撮像や 3 Tesla 装置が有望だが、その意義を確立するには前向き多施設研究が必要である。

[参考文献]

- 1) Sasaki M, et al. Standardizing display conditions of diffusion-weighted images using concurrent b0 images: a multi-vendor multi-institutional study. *Magn Reson Med Sci* 6:133-137, 2007.
- 2) Fujita K, Harada M, Sasaki M, Yuasa T, Sakai K, Hamaguchi T, Sanjo N, Shiga Y, Satoh K, Atarashi R, Shirabe S, Nagata K, Maeda T, Murayama S, Izumi Y, Kaji R, Yamada M, Mizusawa H. Multicentre, multiobserver study of diffusion-weighted and fluid attenuated inversion recovery MRI for the diagnosis of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: a reliability and agreement study. *BMJ Open*, in press.
- 3) Rosso C, et al. Diffusion-weighted MRI in acute

stroke within the first 6 hours: 1.5 or 3.0 Tesla? *Neurology* 74:1946-1953, 2010.

4) Nakamura H, et al. Effect of thin-section diffusion-weighted MR imaging on stroke diagnosis. *AJNR* 26:560-565, 2005.

5) Fujiwara S, Sasaki M, Kanbara Y, Matsumura Y, Shibata E, Inoue T, Nishimoto H, Ogawa A. Improved geometric distortion in coronal diffusion-weighted and diffusion tensor imaging using a whole-brain isotropic-voxel acquisition technique at 3 Tesla. *Magn Reson Med Sci* 6:127-132, 2007.

F. 健康危険情報

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

1. 論文発表

1) Fujita K, Harada M, Sasaki M, Yuasa T, Sakai K, Hamaguchi T, Sanjo N, Shiga Y, Satoh K, Atarashi R, Shirabe S, Nagata K, Maeda T, Murayama S, Izumi Y, Kaji R, Yamada M, Mizusawa H. Multicentre multiobserver study of diffusion-weighted and fluid-attenuated inversion recovery MRI for the diagnosis of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: a reliability and agreement study. *BMJ Open*, in press.

2. 学会発表

なし

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

厚生労働科学研究費補助金（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 分担研究報告書

孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病の非侵襲的診断マーカーとしての血清総タウ蛋白

研究分担者：山田正仁 金沢大学大学院脳老化・神経病態学（神経内科学）
 研究協力者：篠原もえ子 金沢大学大学院脳老化・神経病態学（神経内科学）
 研究協力者：浜口 毅 金沢大学大学院脳老化・神経病態学（神経内科学）
 研究協力者：野崎一朗 金沢大学大学院脳老化・神経病態学（神経内科学）
 研究協力者：坂井健二 金沢大学大学院脳老化・神経病態学（神経内科学）

研究要旨 Creutzfeldt-Jakob病(CJD)の血清および脳脊髄液(CSF)中の総タウ蛋白濃度を測定し、アルツハイマー病(AD)およびCJDに類似した急速進行性の認知症(RPD)を呈する疾患と比較検討を行った。孤発性CJD (n=12)、AD (n=10)およびCJDに類似したRPDを呈する疾患群として、発症時はRPDを呈し、WHO診断基準でpossible CJDの診断基準を満たすが、のちにCJD以外の疾患と診断された症例(non-CJD-RPD)群(n=9)について血清およびCSF中の総タウ蛋白濃度、アルブミン濃度を測定した。また、健常ボランティア(n=10)について血清総タウ蛋白濃度の測定をおこなった。孤発性CJD群の血清総タウ蛋白濃度は 193 ± 72.6 pg/ml（中央値±標準誤差）で、AD群 0 ± 3.3 pg/ml ($p < 0.001$)、non-CJD-RPD群 22 ± 21.8 pg/ml ($p < 0.01$) および健常ボランティア群 0 ± 9.37 pg/ml ($p = 0.001$) に比較し有意に高値であった。CSF総タウ蛋白濃度は孤発性CJD群で、AD群($p < 0.05$)、non-CJD-RPD群($p < 0.05$)に比較して有意に高値であった。血清総タウ蛋白濃度はCSF総タウ蛋白濃度と有意に相関した($\rho = 0.645$; $p < 0.0005$)。孤発性CJD群では全症例で血清タウ蛋白濃度が測定可能であったのに対し、non-CJD-RPD群では9例中4例で測定感度以下であった。したがって、RPDを呈する症例で血清タウ蛋白濃度が高値の場合、CJDの可能性を考慮して鑑別診断を進める必要がある。血清総タウ蛋白濃度とCSF総タウ蛋白濃度に相関がみられることから、血清総タウ蛋白濃度はCSF総タウ蛋白濃度を反映していると考えられる。血清総タウ蛋白濃度はCSF総タウ蛋白濃度と同様に孤発性CJDで高値となり、孤発性CJDとAD、non-CJD-RPDの鑑別に有用な、非侵襲的かつ簡便なマーカーである可能性がある。

A. 研究目的

Creutzfeldt-Jakob 病(CJD)において脳脊髄液(CSF)中の総タウ蛋白濃度は上昇していることが知られている¹⁾。タウ蛋白は主に中枢神経系で産生されると考えられているが、一部は血中に漏出している可能性がある。CJDを簡便にスクリーニングできる血液マーカーがあれば、手術器具など医療行為を介した感染を未然に防止するのに役立つと思われる。そこで我々はCJDの血清およびCSF中の総タウ蛋白濃度を測定し、CJDとの鑑別が問題になることがある、アルツハイマー病(AD)およびCJDに類似した急速進行性の認知症(RPD)

を呈する疾患と比較検討を行った。

B. 研究方法

孤発性 CJD (n=12; 中央値±標準誤差 73 ± 1.7 歳)、AD (n=10; 71 ± 3.2 歳)およびCJDに類似したRPDを呈する疾患群として、発症時はRPDを呈し、WHO診断基準でpossible CJDの診断基準を満たすが、のちにCJD以外の疾患と診断された症例(non-CJD-RPD)群(n=9; 59 ± 4.2 歳)について血清およびCSF中の総タウ蛋白濃度、アルブミン濃度を測定した。

孤発性CJDは4症例がWHO診断基準で確実例

(病理診断例)、8 症例が臨床的確実例であった。病理診断例は 3 症例が Parchi 分類²⁾で MM2 皮質型、1 症例は MM1 型であった。臨床診断例は 8 例とも古典的 CJD の臨床像を呈し、MM1 型と推定された。AD は全例 NINCDS-ADRDA の診断基準にて臨床的確実例と診断された。non-CJD-RPD 群の最終診断は、ウイルス性脳炎(n=4)、傍腫瘍症候群(n=2)、水頭症(n=1)、結核性髄膜炎(n=1)および多発性脳梗塞(n=1)であった。また、健常ボランティア(n=10)についても血清総タウ蛋白濃度の測定をおこなった。

血清および CSF 総タウ蛋白濃度の測定はサンドウィッチ ELISA (Innotest hTAU-Ag, Innogenetics) を用いた。血清および CSF 総タウ蛋白濃度の定量限界を 18.8pg/mL とし、定量限界未満を 0pg/mL として解析した。

血液脳関門透過性のマーカーであるアルブミン比[CSF アルブミン(mg/L)/血清アルブミン(g/L)]、および CSF 中のタウ蛋白の血中漏出の指標としてタウ比[血清総タウ蛋白(pg/mL)/CSF 総タウ蛋白(pg/mL)]を計算した。

また、CJD4 症例について血液を複数回採取し、血清タウ蛋白値の経時的変化について検討した。

各診断群間の比較には、Kruskal-Wallis 検定を用いた。相関は Spearman の順位相関係数を用いて検定した。

(倫理面への配慮)

対象全例に対して書面での同意を得て研究を行った。

C. 研究結果

孤発性 CJD 群の血清総タウ蛋白濃度は 193 ± 72.6 pg/ml (中央値 ± 標準誤差) で、AD 群 0 ± 3.3 pg/ml ($p < 0.001$)、non-CJD-RPD 群 22 ± 21.8 pg/ml ($p < 0.01$) および健常ボランティア群 0 ± 9.37 pg/ml ($p = 0.001$) に比較し有意に高値であった。MM2 皮質型の 3 症例は他の MM1 型に比して有意に血清総タウ蛋白濃度が低かったが (50 ± 137.4 pg/ml)、AD 群 ($p = 0.0619$)、健常ボランティア群 ($p = 0.0767$) に比較し高値の傾向をみとめた。MM2 皮質型と non-CJD-RPD 群間には血清総タウ蛋白

濃度の有意差は認めなかった。CSF 総タウ蛋白濃度は孤発性 CJD 群 (4538 ± 5599.4 pg/ml) で、AD 群 (790.5 ± 174.1 pg/ml; $p < 0.05$)、non-CJD-RPD 群 (496 ± 250.5 pg/ml; $p < 0.05$) に比較して有意に高値であった。血清総タウ蛋白濃度は CSF 総タウ蛋白濃度と有意に相関した ($\rho = 0.645$; $p < 0.0005$)。アルブミン比およびタウ比は孤発性 CJD 群、AD 群、non-CJD-RPD 群間で有意な差を認めなかった。また、アルブミン比とタウ比の間に有意な相関を認めなかった。

血清タウ蛋白値の経時的変化を検討し得た 4 症例のうち、1 症例は C 型肝炎の臨床試験に参加していたため、CJD 発症前から定期的に血清保存が行われていた。発症 12, 3, 2, 1 カ月前の血清では血清総タウ蛋白濃度は定量限界未満であった。発症後 1, 9 カ月、3, 15 カ月、9, 12, 15 カ月で経時的に血清総タウ蛋白濃度を検討した症例では、発症 9, 15 カ月後も血清総タウ蛋白濃度は高値が持続するか、発症 15 カ月後に定量限界未満まで低下していた。

D. 考察

孤発性 CJD 群では全症例で血清タウ蛋白濃度が測定可能であったのに対し、non-CJD-RPD 群では 9 例中 4 例で測定感度以下であった。したがって、RPD を呈する症例で血清タウ蛋白濃度が高値の場合、CJD の可能性を考慮して鑑別診断を進める必要があると思われる。比較的緩徐に進行する MM2 皮質型 CJD における血清総タウ蛋白濃度は、AD および健常ボランティアに比して高い傾向にあった。血清総タウ蛋白濃度と CSF 総タウ蛋白濃度に相関がみられることから、血清総タウ蛋白濃度は CSF 総タウ蛋白濃度を反映していると考えられる。一方、アルブミン比とタウ比に有意な相関がみられないことから、CSF 中から血中へのタウ蛋白漏出はアルブミンを指標とする血液脳関門の透過性の変化とは直接的には関連しないと考えられた。

CJD の診断前に施行される脳神経外科手術、眼科手術は手術器具など医療行為を介した感染が問題となる。浜口ら³⁾によると、0.8% の CJD 患者が発症後 ~ CJD 診断前に脳神経外科手術を受け、1.8% の CJD 患者が発症後 ~ CJD 診断前に眼科手

術を受けている。脳神経外科または眼科手術前に血清総タウ蛋白濃度を測定することは、CJD 疑い例を抽出するのに有用と思われる。

E. 結論

血清総タウ蛋白濃度は CSF 総タウ蛋白濃度と同様に孤発性 CJD で高値となり、孤発性 CJD と AD、non-CJD-RPD の鑑別に有用な、非侵襲的かつ簡便なマーカーである可能性がある。

[参考文献]

- 1) Kapaki E, Kilidireas K, Paraskevas GP et al. Highly increased CSF tau protein and decreased β -amyloid(1-42) in sporadic CJD: a discrimination from Alzheimer's disease? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 71:401-403, 2001.
- 2) Parchi P, Giese A, Capellari S et al. Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann Neurol* 46:224-233, 1999.
- 3) Hamaguchi T, Noguchi-Shinohara M, Nozaki I, et al. Medical procedures and risk for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease, Japan, 1999-2008. *Emerg Infect Dis* 15:265-271, 2009.
- 4) Noguchi-Shinohara M, Hamaguchi T, Nozaki I, et al. Serum tau protein as a marker for the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol* 258:1464-1468, 2011.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fujita K, Harada M, Sasaki M, Yuasa T, Sakai K, Hamaguchi T, Sanjo N, Shiga Y, Satoh K, Atarashi R, Shirabe S, Nagata K, Maeda T, Murayama S, Izumi Y, Kaji R, Yamada M, Mizusawa H. Multicentre, multiobserver study of diffusion-weighted and fluid-attenuated inversion recovery MRI for the

diagnosis of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: a reliability and agreement study. *BMJ Open*, in press.

2) Nagoshi K, Sadakane Y, Nakamura Y, Yamada M, Mizusawa H. Illness duration of prion diseases in Japan is longer than that in other countries. *J Epidemiol* 21:255-262, 2011.

3) Noguchi-Shinohara M, Hamaguchi T, Nozaki I, Sakai K, Yamada M. Serum tau protein as a marker for the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol* 258:1464-1468, 2011.

4) Nozaki I, Sakai K, Kitamoto T, Yamada M. Prion protein gene M232R mutation as a cause of genetic prion disease. (Reply to the Letter to the Editor: Beck et al. Prion protein gene M232R variation is probably uncommon polymorphism rather than a cause of inherited prion disease.) *Brain* 135:e210, 2011.

5) Yoshikawa Y, Horiuchi M, Ishiguro N, Kadohira M, Kai S, Mizusawa H, Nagata C, Onodera T, Sata T, Tsutsui T, Yamada M, Yamamoto S. Alternative BSE risk assessment methodology of imported beef and beef offal to Japan. *J Vet Med Sci*, in press.

6) 坂井健二, 山田正仁. プリオン病のサーベイランス. *最新医学* 66:1032-1038, 2011.

7) 坂井健二, 山田正仁. プリオン病のサーベイランスと疫学. *Neuroinfection* 16:50-56, 2011.

8) 野崎一朗, 山田正仁. 認知症学 (下): 致死性家族性不眠症. *日本臨床* 69:438-441, 2011.

9) 山田正仁: ヒトのプリオン病の実態: 獲得性プリオン病を中心に. *医学のあゆみ* 236:868-876, 2011.

10) 濱口 毅, 山田正仁. プリオン病以外のアミロイドーシスは伝播するか? (2) 脳アミロイドーシス. 山田正仁 (編): アミロイドーシス—診療のすべて: ガイドライン完全解説, 医歯薬出版, 東京, pp205-211, 2011.

11) 野崎一朗, 山田正仁. CASE 21. 書字障害を初発として、のちに記憶障害などが出現した症例. 小阪憲司 (編) プライマリーケア医の認知症診療入門セミナー, 新興医学出版社、東京、pp196-206, 2011.

12) 山田正仁. プリオン病. 日本感染症学会 (編)

感染症専門医テキスト 第I部解説編, 南江堂, 東京, pp1146-1154, 2011.

13) 山田正仁. ヒトのプリオン病の実態. 佐藤真澄, 堤 寛 (編) 知っておきたい動物の感染症 (別冊: 医学のあゆみ), 医歯薬出版, 東京, pp147-155, 2011.

2. 学会発表

1) Sakai K, Nozaki I, Hamaguchi T, Noguchi-Shinohara M, Nakamura Y, Kitamoto T, Mizusawa H, Sanjo N, Moriwaka F, Shiga Y, Kuroiwa Y, Nishizawa M, Inuzuka T, Takeda M, Abe K, Murai H, Murayama S, Tateishi J, Shirabe S, Takumi I, Harada M, Yamada M. Human prion diseases in Japan: a prospective surveillance from 1999. Asian Pacific prion Symposium 2011, Karuizawa, July 10-11, 2011.

2) Yamada M, Sakai K, Nozaki I, Hamaguchi T, Noguchi-Shinohara M, Nakamura Y, Kitamoto T, Sanjo N, Moriwaka F, Shiga Y, Kuroiwa Y, Nishizawa M, Inuzuka T, Takeda M, Abe K, Murai H, Murayama S, Tateishi J, Shirabe S, Takumi I, Harada M, Mizusawa H. Prion disease in Japan. Asian Pacific Prion Symposium 2011, Karuizawa, July 10-11, 2011.

3) Yamada M, Sanjo N, Murayama S, Takeda M, Kuzuhara S, Abe K, Noguchi-Shinohara M, Sakai K, Nozaki I, Mizusawa H, Hamaguchi T, Sadakane A, Nakamura Y, Sato T, Kitamoto T, Moriwaka F, Shiga Y, Kuroiwa Y, Nishizawa M, Inuzuka T, Kuroda S, Murai H, Tateishi J, Takumi I, Shirabe S,

Harada M. Human Prion Disease in Japan: Analysis of 1552 Patients in a Prospective 11-Year Surveillance. Alzheimer's Association International Conference 2011, Paris, July 16-21, 2011.

4) 山田正仁, 中村好一, 北本哲之, 水澤英洋. プリオン病の最近の発症動向. 第 28 回日本医学会総会 2011, 東京, 4.8-10, 2011

5) 小松潤史, 坂井健二, 岩佐和夫, 杉山 有, 山田正仁. プリオン蛋白遺伝子 V203I ホモ変異を認めた家族性 CJD の 1 例. 第 16 回日本神経感染症学会学術集会, 東京, 11.4-5, 2011.

6) 坂井健二, 野崎一朗, 濱口 毅, 篠原もえ子, 中村好一, 北本哲之, 水澤英洋, 森若文雄, 志賀裕正, 三條伸夫, 黒岩義之, 西澤正豊, 武田雅俊, 犬塚 貴, 阿部康二, 村井弘之, 村山繁雄, 太組一朗, 調 漸, 立石 潤, 原田雅史, 山田正仁. CJD サーベイランスにおけるプリオン病発症と加齢の関連についての検討. 第 52 回日本神経学会学術大会, 名古屋, 5.18-20, 2011.

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

厚生労働科学研究費補助金（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 分担研究報告書

H-FABP の髄液検査系—他のマーカーとの比較—

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
 研究協力者：佐藤克也 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・感染分子解析学分野
 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・感染分子解析学分野

研究要旨 プリオン病の髄液検査において、14-3-3 蛋白測定やタウ蛋白測定は標準化されている。一方、H-FABP 測定については、データの蓄積に伴ってその重要性が明らかになりつつある。今年度の研究においては、これまでの H-FABP の検査での使用抗体や検査系を精査するとともに、同一髄液について 14-3-3 とタウの両蛋白測定と H-FABP 測定を比較した。

サンドイッチ ELISA での固相化抗体はマウスモノクローナル抗体 3E9 に一定とし、HRP 標識する組換えニワトリモノクローナル抗体（3 種：HUFa10、HUFa15、HUFa26）についてはその生産系を確立した。供試髄液 73 検体（内訳：CJD 患者髄液 47 検体、非 CJD 患者髄液 26 検体）について、14-3-3 とタウの蛋白測定を標準化法で、また H-FABP 測定は構築した手法で実施した。総じて、14-3-3、タウの高値 CJD 検体においては、H-FABP 値も高かったが、14-3-3 とタウの低値 CJD 検体での H-FABP 値には幅があった。14-3-3、タウそして H-FABP の 3 髄液マーカーの測定は CJD の信頼度を上げる傾向にあると考えられた。

A. 研究目的

我が国における CJD ことに医原性 CJD の発生頻度は世界で最も高く、その治療法の確立は医療現場から強く求められていると同時に、CJD 診断法としての髄液検査法の充実も望まれている現状にある。

これまで、CJD の髄液マーカーとなることが予想される H-FABP（1、2）の検出系を構築してきた。その検出系は、マウスモノクローナル抗体と組換えニワトリモノクローナル抗体の組み合わせによるサンドイッチ ELISA である。この検出系を活用した昨年度までの髄液検査において、CJD 診断の検出率は 100%でありその精度の高さを示していた。

一方、同様に CJD の有用な髄液マーカー検査として 14-3-3 やタウ蛋白の測定には経験的に高い評価が示されている。事実、CJD の病態と 14-3-3 やタウ蛋白の測定値に相関関係のあることが示されている。そこで、本研究では、上記の H-FABP 測定と 14-3-3 やタウの測定を同一髄液検体を用

いて行い、CJD の髄液診断における H-FABP、14-3-3、タウの相互関係を明らかにすることとした。同時に、将来的に H-FABP の測定系の広範な活用を視野に入れて、マウスおよび組換えニワトリ抗体の安定生産につとめた。

B. 研究方法

1. 供試抗体

H-FABP 特異的マウスモノクローナル抗体（3E9）、3 種の組換えニワトリモノクローナル抗体（HUFa10、HUFa15、HUFa26）を用いた。3E9 はマウス腹水抗体からアフィニティー精製して用いた。組換えニワトリ抗体は、CHO 細胞や HEK293 細胞に発現させた後、アフィニティー精製して用いた。

2. 髄液バイオマーカーの測定

供試髄液は以下のとおりである。すなわち、CJD 患者髄液 47 検体と非 CJD 患者髄液 26 検体である。なお、非 CJD 患者髄液 26 検体の内訳は、FTA、

腫瘍、DAT、iNPH、統合失調症、アルコール障害が各 1 例ずつ、FTLD が 4 例、AD が 3 例、各種脳炎が 5 例、CBD が 2 例、痙攣症候群が 2 例、SSPE が 2 例、および診断不明と原因不明が 2 例であった。

14-3-3 とタウ蛋白測定は、標準化法により測定を行い、H-FABP の測定はマウス抗体 3E9 を固相化抗体、HRP 標識抗体には組換えニワトリ抗体を用いたサンドイッチ ELISA で測定した。

(倫理面への配慮)

ヒトプリオン病他の脳脊髄液を用いたバイオマーカー測定は長崎大学で実施した。実験に当たっては、長崎大学倫理委員会の規定に従った。

C. 研究結果

1. 組換えニワトリ抗体の安定生産

3 種の抗 H-FABP 抗体の H 鎖と L 鎖を組み込んだプラスミドベクターを HEK293 細胞株および CHO 細胞株にコトランスフェクトし、薬剤選択の後に抗体タンパク質発現細胞の状態を調べた。理由は不明だが、CHO 細胞では抗体安定発現系が今のところ取れてきていない。一方、293 細胞系を用いた場合、一過性発現で、3 種の抗体産生系でいずれも 30 ml 培養で 1 mg 以上の収量があり、また、293 細胞系から抗体安定発現系が約 20 µg/ml の濃度で抗体を生産できた。安定発現系の抗体の組換え H-FABP に対する反応性は HUFa26 > HUFa10 > HUFa15 であった。これらから HUFa26 を選抜し、HRP 標識キットを用いて標識した。

2. 髄液検査による 3 種バイオマーカーの測定
 供試した計 73 検体の髄液について、3 種髄液バイオマーカーの測定を行った。成績を整理するため、CJD 患者髄液中で 14-3-3 蛋白測定値とタウ蛋白測定値が高値を示した 24 例と低値を示した 22 例について H-FABP の測定値を比較した。その結果、高値を示した 24 例は H-FABP についても高値(測定中央値：24825.99 pg/ml)であったが、低値であった 22 例 [14-3-3：9/22(40.9%)、タウ：2/22(9.1%)]では、H-FABP は 15/22(68.2%) (中央値：5428.50 pg/ml) であった (図 1)。

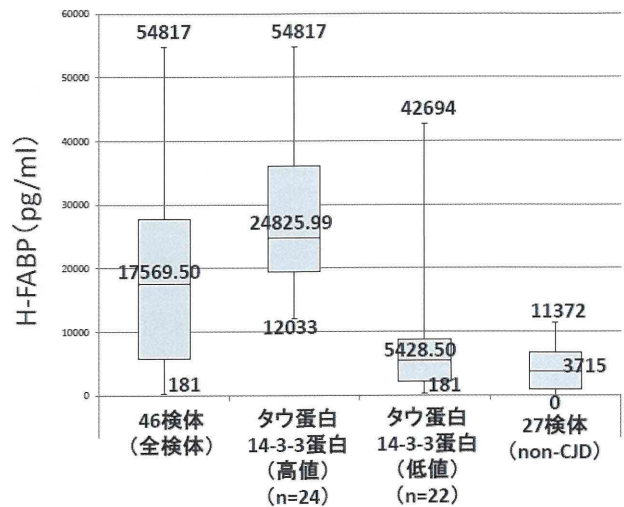


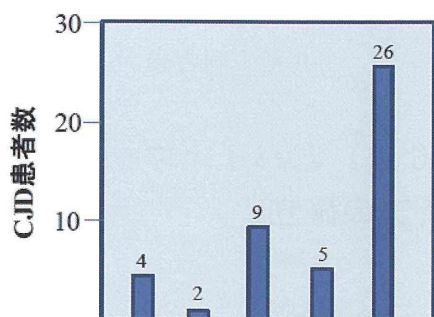
図 1. CJD 患者髄液を用いた H-FABP の測定

なお、非 CJD の各種疾患の髄液バイオマーカーの測定値を個々の疾患について調べたが、疾患による値の傾向というものはない。

D. 考察

本研究での髄液検査において、14-3-3、タウ、H-FABP の測定結果で、いずれも測定値が高値であった 24 例についてはいずれも CJD であり、非 CJD との比較においてその違いは有意であった。一方、14-3-3、タウの測定値が低値であった CJD 検体 22 例では、非 CJD との比較においてその違いに有意差はなかった。

CJD 患者髄液 46 検体の 3 種バイオマーカーの検出頻度を図 2 にまとめた。すなわち、46 検体中 26 検体は 3 種マーカーがいずれも陽性であった。また、14-3-3 と H-FABP 陽性検体は 5 例、H-FABP のみ陽性であった件数が 9 例、14-3-3 のみ陽性が 2 例、いずれも陰性が 4 例であった。この結果を総合判断すると、CJD と H-FABP が最も関連性があることが示唆されることと、同時に、CJD の髄液診断においては本研究で実施したように 3 種マーカーを同時に検査することが望まれることが明らかとなった。



検出蛋白						
タウ	-	-	-	-	+	26(56.5%)
14-3-3	-	+	-	+	+	33(71.7%)
H-FABP	-	-	+	+	+	40(87.0%)

図 2. 髄液での 3 種バイオマーカーの検出頻度

E. 結論

CJD と H-FABP が最も関連性があることが示唆されることと、同時に、CJD の髄液診断においては 3 種マーカーを同時に検査することが最も望ましいと思われる。

[参考文献]

1) Guillaume E, Zimmermann C, Burkhard PR, Hochstrasser DF, 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, Kretschmar 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.

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

なし

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

厚生労働科学研究費補助金（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 分担研究報告書

異常型プリオンタンパク試験管内増幅法（RT-QUIC 法）とバイオマーカーを用いたヒトプリオン病の髄液診断法の確立

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
 研究協力者：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
 研究協力者：高月英恵 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：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
 研究協力者：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

研究要旨 我々は新規異常プリオン蛋白増幅検出法 RT-QUIC 法を確立し、ヒトプリオン病の髄液診断への応用を行ってきた。遺伝性を含む様々な病型ごとの検討、検査時期による検出力の比較検討など多くの検討課題が残されている。今回孤発性プリオン病確定例における検出感度を再検討し、遺伝性プリオン病における病型ごとの検出感度を検討した。確定例は新規症例を加え延べ 58 症例について検討を行った。病型ごとの髄液中の 14-3-3 蛋白およびタウ蛋白定量と RT-QUIC を行った。遺伝性プリオン病 99 症例について同様に髄液検査解析を行った。CJD の確定例におけるレトロスペクティブな検討から、14-3-3 γ ELISA が最も検出感度に優れるが、14-3-3、タウ蛋白ともに陰性で RT-QUIC 法陽性を示す例が 1 例存在し、またタウ蛋白のみ陽性を示した例が 2 例見つかった。3 つの検査のいずれかが陽性である症例は 58 例中 56 例であることから、2 つのバイオマーカー検査と RT-QUIC 法を併用する必要があると言える。遺伝性 CJD V180I の髄液のバイオマーカーの検討では 30-40%と陽性率は有意に低く、病理像が非典型的で組織破壊が軽度であることを反映していると思われた。また P102L ではバイオマーカーの陽性率が低いものの、RT-QUIC では陽性になることから、非組織障害性の異常 PrP 産生があることが推察された。

A. 研究目的

我々は新規異常プリオン蛋白検出法 RT-QUIC 法を確立し、ヒトプリオン病の髄液診断への応用を行ってきた。CJD 確定例（合計 34 例）では髄液中の 14-3-3 蛋白およびタウ蛋白と RT-QUIC の併用にて高い精度での診断が可能であったが、多くの検討課題が残されている。多くの検討課題を明らかにし、髄液検査を確立することが本研究の課題である。

B. 研究方法

1999 年-2009 年の 10 年間でサーベイランス委員会に登録された症例は 1222 症例である。（孤発性プリオン病 922 症例、家族性（遺伝性）プリオン病 216 症例、医原性プリオン病 81 症例）。遺伝

性プリオン病は 2004 年-2009 年のサーベイランス委員会に登録された症例 154 症例中、髄液採取されたのが 99 症例であった。今回この遺伝性プリオン 99 症例について髄液のバイオマーカー（14-3-3 蛋白、総タウ蛋白、RT-QUIC 法）についてそれぞれ検討を行った。海外からの検査依頼はドイツ 40 症例、オーストラリア 31 例、韓国 114 例であった。これらのうち、確定例に限って検査結果をまとめ髄液診断法の感度特異度を再検討した。確定例は新規症例を加え延べ国内 22 症例、ドイツ 40 症例、オーストラリア 17 症例、韓国 4 症例となった。14-3-3 蛋白は γ アイソフォーム特異的ウェスタンブロット法、および ELISA 法、タウ蛋白は total tau protein ELISA キットを用いて定量した。異常プリオン蛋白の有無はヒトリコン

ビナントプリオン蛋白を基質に用いた RT-QUIC 法にて検出した。

(倫理面への配慮)

長崎大学倫理委員会に審査承認されており、問題はない。

C. 研究結果

1. CJD の確定例における検討結果、14-3-3 蛋白 ELISA では陽性率 94.8%、総タウ蛋白と RT-QUIC 法ではともに 84.5%であった。type2 のMMタイプでは陽性率が低い傾向があった。尚、非プリオン病患者髄液を検討した結果、韓国の神経梅毒患者髄液が RT-QUIC 偽陽性を示した。さらにリコンビナントヒト PrP-129V を基質に用いた場合、けいれんの症例で偽陽性を示すことが分かった。

2. 遺伝性プリオン病における髄液検査の結果 GSS は 7 症例、FFI では 1 症例、CJD では V180I は 60 症例、M232R は 13 症例、E200K は 13 症例、V203I は 2 症例であった。GSS と FFI と CJD (M23R,E200K,V203I) ではバイオマーカーの陽性率は 60-80%であった。特に GSS と FFI では既存のバイオマーカー(14-3-3 蛋白と総タウ蛋白)では 10-20%程度であった。RT-QUIC 法では 60-80%で陽性を示した。一方 V180I ではバイオマーカー、RT-QUIC ともに陽性率は 30-40%と低いことがわかった。

D. 考察

1. CJD におけるレトロスペクティブな検討から、14-3-3 γ ELISA が最も検出感度に優れることがわかった。しかし 14-3-3、タウ蛋白ともに陰性で RT-QUIC 法陽性を示す例が 1 例存在し、またタウ蛋白のみ陽性を示した例が 2 例見つかった。3 つの検査のいずれかが陽性である症例は 58 例中 56 例であることから、2 つのバイオマーカー検査と RT-QUIC 法を併用する必要があると言える。

2. 遺伝性プリオン病における V180I の髄液のバイオマーカーの検討では 30-40%と有意に低く、病理像が非典型的で組織破壊が軽度であることを反映していると思われた。また P102L ではバイオマーカーの陽性率が低いものの、RT-QUIC で

は陽性になることから、非組織障害性の異常 PrP 産生があることが推察された。

E. 結論

プリオン病における髄液のバイオマーカーの 14-3-3 蛋白 ELISA と総タウ蛋白と RT-QUIC 法の組み合わせを実施することの有用性があきらかになった。各病型、遺伝型ごとの詳細な検討をさらに症例を増やし検討する必要がある。また引き続き RT-QUIC 偽陽性例について注意深く検討する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Atarashi R, Sano K, Satoh K, Nishida N. Real-time quaking-induced conversion: A highly sensitive assay for prion detection. *Prion* 5:150-153, 2011.
- 2) Ishibashi D, Yamanaka H, Mori T, Yamaguchi N, Yamaguchi Y, Nishida N, Sakaguchi S. Antigenic mimicry-mediated anti-prion effects induced by bacterial enzyme succinylarginine dihydrolase in mice. *Vaccine* 29:9321-9328, 2011.
- 3) Matsui Y, Satoh K, Miyazaki T, Shirabe S, Atarashi R, Mutsukura K, Sato A, Kataoka Y, Nishida N. High sensitivity of an ELISA kit for detection of the gamma-isoform of 14-3-3 proteins: usefulness in laboratory diagnosis of human prion disease. *BMC Neurol* 11:120, 2011.
- 4) Takakura I, Miyazawa K, Kanaya T, Itani W, Watanabe K, Ohwada S, Watanabe H, Hondo T, Rose MT, Mori T, Sakaguchi S, Nishida N, Katamine S, Yamaguchi T, Aso H. Orally administered prion protein is incorporated by m cells and spreads into lymphoid tissues with macrophages in prion protein knockout mice. *Am J Pathol* 179:1301-1309, 2011.

2. 学会発表

- 1) Fuse T, Nishida N. The Strain Specific Cell Tropism of Prion Is Correlated with the Binding of PrPSc on Cell Surface Protein. PRION 2011, Montreal, May 16-19, 2011.
- 2) Ishibashi D, Nishida N. Protective Role of Interferon Regulatory Factor 3-Dependent Signaling Against Prion Infection, PRION 2011, Montreal, May 16-19, 2011.
- 3) Sano K, Atarashi R, Nishida N. Reconstruction of Infectious Prion Protein in vitro. PRION 2011, Montreal, May 16-19, 2011.
- 4) 佐藤克也, 新竜一郎, 西田教行. 日本におけるプリオン病の髄液中のバイオマーカーの検討. 第52回日本神経学会総会, 名古屋, 5.18-20, 2011.
- 5) Nishida N. Importance of CSF for the diagnosis of Prion disease. Asian Pacific Prion Symposium 2011, Karuizawa, July 10-11, 2011.
- 6) Satoh K, Atarashi R, Sano K, Shirabe S, Fuse T, Matsubara T, Ishibashi D, Nishida N. Analysis of biochemical markers and the method of the detection of abnormal prion protein (RT-QUIC method) in cerebrospinal fluid in human prion diseases, 15th European Federation of Neurological Societies, Budapest, September 11-13, 2011.

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

図1. プリオン蛋白遺伝子における遺伝子変異

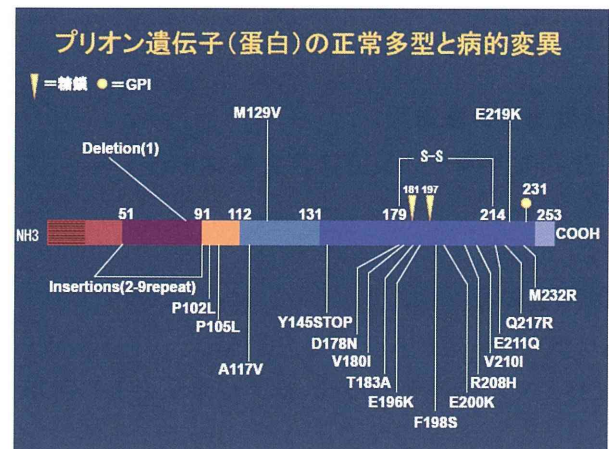


図2. 遺伝性プリオン病における髄液検査のバイオマーカーの検討結果

	GSS	FFI	g CJD			
	P102L	D178N	V180I	M232R	E200K	V203I
Number	7	1	60	14	13	2
Age	55.4 ±10.9	64	76.6±8.4	69.4±7.8	60.3±7.1	73
total tau	1/7	0/1	27/60	9/14	9/13	1/2
protein	14.30%	0%	45%	64.30%	69.20%	50%
14-3-3	1/7	0/1	20/60	9/14	9/13	1/2
protein	14.30%	0%	33.30%	64.30%	69.20%	50%
RT-QUIC	6/7	1/1	22/60	9/14	11/13	2/2
	85.70%	100%	36.70%	64.30%	84.60%	100%

図 3.日本のプリオン病患者における髄液検査のバイオマーカーの検討結果 (definite cases)

No.	Age (yr)	Sex	CJD typing	PrP ^{Sc} type	14-3-3 γ ELISA	t-tau	RT-QUIC
C1	68	Male	sporadic	MM 1	+	+	+(3/4)
C2	66	Female	sporadic	MM 1	+	+	+(2/4)
C3	71	female	sporadic	MM 1	+	+	+(1/4)
C4	57	female	sporadic	MM 2	+	+	+(2/4)
C5	70	male	sporadic	MM 2	+	+	+(2/4)
C6	66	male	sporadic	MM 2	+	+	+(2/4)
C7	60	female	sporadic	MM 2-T	-	-	negative (0/4)
C8	73	female	sporadic	MM 2	+	+	1
C9	74	male	sporadic	MM 2	+	-	negative (0/4)
C10	79	female	sporadic	MM 2	+	+	+(2/4)
C11	65	female	sporadic	MM 2	+	+	1
C12	69	male	sporadic	MM 2	+	-	negative (0/4)
C13	69	female	sporadic	MM 2	+	+	+(3/4)
C14	54	female	sporadic	MM 2	+	+	+(3/4)
C15	76	female	sporadic	MM 2	+	+	+(2/4)
C16	68	male	sporadic	MM 2	+	+	+(4/4)
C17	58	female	dura	MM 1	+	+	+(3/4)
C18	79	female	dura	MM 1	+	+	+(3/4)

図 4.プリオン病患者における髄液検査のバイオマーカーの検討結果 (definite cases) (CJD(type1)での検討結果)

No.	Age(yr)	Sex	129	CJD typing	14-3-3 γ ELISA	t-tau	RT-QUIC
C19	72	female	MM	type 1	+	-	+
C21	56	female	MM	type 1	+	+	+
C22	66	female	MM	type 1	+	+	+
C23	74	female	MM	type 1	+	+	+
C24	62	male	MM	type 1	+	+	+
C25	67	male	MM	type 1	+	+	+
C26	77	male	MM	type 1	+	+	+
C27	83	female	MM	type 1	+	+	+
C28	78	male	MM	type 1	+	+	+
C29	79	male	MM	type 1	+	+	+
C30 (korea)	56	female	MM	type 1	+	-	+
C31 (korea)	46	male	MM	type 1	+	+	-
C32 (korea)	50	male	MM	type 1	+	+	+

図 5.プリオン病患者における髄液検査のバイオマーカーの検討結果 (definite cases)
(CJD(type2)での検討結果)

No.	Age(yr)	Sex	I29	CJD typing	14-3-3 γ ELISA	t-tau	RT- QUIC
C20	62	female	MM	type 2	+	+	+
C33 (Korea)	46	male	MM	type 2	-	-	+
C34 (Germany)	60	male	MV	type 2	+	+	-
C35 (Germany)	78	female	MV	type 2	+	+	+
C36 (Germany)	65	female	MV	type 2	+	+	+
C37 (Germany)	63	male	MV	type 2	+	+	+
C38 (Germany)	63	male	MV	type 2	+	+	+
C39 (Germany)	76	male	VV	type 2	+	+	+
C40 (Germany)	67	male	VV	type 2	+	+	+
C41 (Germany)	78	male	VV	type 2	+	+	+
C42 (Germany)	73	female	VV	type 2	+	+	+
C43 (Germany)	72	male	VV	type 2	+	+	+

図 6.プリオン病患者における髄液検査のバイオマーカーの検討結果 (definite cases) のまとめ

陽性率	14-3-3γ ELISA	t-tau	RT-QUIC
	94.80%	84.50%	84.50%

図 7.プリオン病患者における髄液検査のバイオマーカーの検討結果 (definite cases)

症例数	14-3-3γ	T-tau	RT-QUIC
44	+	+	+
4	+	-	+
0	-	+	+
3	+	+	-
2	-	+	-
2	+	-	-
1	-	-	+
2	-	-	-

厚生労働科学研究費補助金（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 分担研究報告書

手術器具を模したワイヤーを用いた CJD プリオンの不活化法の評価

研究分担者：毛利資郎 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所

研究協力者：松浦裕一 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所

研究協力者：北本哲之 東北大学大学院医学系研究科 病態神経学講座

研究要旨 われわれは医療現場におけるプリオン病の二次感染を防ぐことを目的に、応用可能なプリオン滅菌を模したプリオンの不活化処理を行い、処理後の感染性について、遺伝子改変マウスを用いたバイオアッセイで調べた。その結果、熱、アルカリ、界面活性剤それぞれ単独では不活化効果が不十分であるが、組み合わせることによって、高い不活化効果が認められた。また、アルカリ性洗剤については、濃度と熱の条件次第で、単独でも高い不活化効果が得られることが明らかになった。

A. 研究目的

クロイツフェルト・ヤコブ病（CJD）等ヒトのプリオン病は、異常なプリオン蛋白が病原因子となっておこる致死性の神経変性病である。このうち医原性 CJD は、角膜移植や硬膜移植といった医療行為により感染が引き起こされる。実際、国内の医療機関で脳外科手術を受けた患者が、手術後に CJD と診断された事例があり、その後の調査によって外科手術器具等のプリオン汚染に対して有効な滅菌法がなされないまま、同一の器具を別の患者に使用したことで、感染の危険性のあるリスク保有者の存在が報告されている。プリオンは熱や消毒液に対して極めて強い抵抗性を持つため、通常の滅菌及び消毒法ではプリオンの感染性を除去することができず、プリオン病の二次感染予防には、手術器具等の有効な滅菌法が必要である。

本研究では、プリオンの消毒方法として推奨されている方法に加えて、市販のアルカリ性洗剤を用いる方法について、感染性を指標に、CJD プリオンの不活化効果について再検証した。

B. 研究方法

1) 感染性材料とモデルマウス

孤発性 CJD プリオン（MM1 型）を材料（H3）として、ヒトプリオンに対して最も感受性の高い、ヒト/マウスキメラ型プリオン蛋白質遺伝子導入の

KiChM マウスを用いて処理後のステンレスワイヤーの CJD プリオンの感染性の減衰について半定量的に調べた。

2) ステンレスワイヤーへの材料接着

手術器具を模したステンレス製ワイヤー（SUS316、長さ 3mm、線径 0.3mm）を 2% Triton-X-100 溶液中で超音波処理し、蒸留水で洗浄後、乾燥させ（37°C、60 分）、一晚乾燥させた。

3) 滅菌処理

CJD ヒト脳乳剤を接着させたワイヤーについて以下の滅菌処理を施した。

①水洗

②オートクレーブ（121°C、20 分、134°C、20 分）

③3% SDS 煮沸（10 分）

④1M, 2M NaOH 水溶液処理（室温、1 時間）

⑤3% SDS 中でオートクレーブ（134°C、20 分）

⑥3% SDS 煮沸（10 分）後オートクレーブ（134°C、20 分）

⑦1M, 2M NaOH 水溶液処理（室温、1 時間）後オートクレーブ（134°C、20 分）

⑧アルカリ性洗剤

・強アルカリ性タイプ

・弱アルカリタイプ

濃度：0.3%（標準使用濃度）、2%、温度：50°C、90°C、時間：5 分、20 分

4) マウス脳内へのワイヤー埋め込み

マウスをネンブタール麻酔の後、特注の押し出し式ルンバール針 (0.7×13mm) を使用して、左脳に不活化処理後のワイヤーを埋め込み、発症の有無を観察した。

5) 感染性の有無の評価

マウスがプリオンに感染し、発病しているか否かの診断は、症状の観察、免疫組織化学染色による異常プリオン蛋白の検出、ウェスタンブロット法による脳組織からの異常プリオン蛋白の検出を併用することによりおこなった。

マウスがワイヤーを埋め込まれた後、発症するまでの日数を潜伏期間とした。ワイヤーに段階希釈した CJD プリオンを接着させ、潜伏期間を測定し、それを基に CJD プリオンの感染価を求めた (エンドポイントタイトレーションアッセイ)。滅菌処理後のワイヤーによるマウスの潜伏期間から感染価を求め、それぞれの感染性の減衰を算出した。

(倫理面への配慮)

「農林水産省の所管する研究機関等における動物実験指針」にもとづき、(独) 農業・食品産業技術総合研究機構の動物実験規程に従い、この動物実験計画書は動物衛生研究所の審査を受け、承認されている。

C. 研究結果

各滅菌処理を施したワイヤーの感染試験の結果を表 1 に示した。オートクレーブ、3%SDS 煮沸、NaOH の単独処理では 1M、2M 共にヒトプリオンに対してそれぞれ 1.39 log, 1.53 log の減衰効果しか得られず、マウスの発病も防げなかった。しかし、3%SDS 煮沸+オートクレーブ、1M NaOH+オートクレーブなど処理を組み合わせることによって、3.34 log 以上の感染性減衰が認められ、遺伝子改変マウスによる感染性検出限界レベル以下となった。アルカリ性洗浄剤については、単独使用でも高温度かつ高濃度 (高いアルカリ領域) のもとで一定時間以上処理することで、感染性が検出限界以下になることが判明した。

D. 考察

これまでにスクレイピープリオンを使用したワイヤーの感染試験において、1M NaOH 処理により、

マウスの発病は認められず、不活化効果が十分であったとする報告 (Fichet *et al.*, 2004, Lemmer *et al.*, 2008) がある。これに対して、CJD プリオンを用いた本条件では、全てのマウスは発病し、十分な不活化効果は得られなかった。しかしながら、医療現場で通常におこなわれている消毒処理を組み合わせることにより、マウスの発病は認められず、二次感染の防止可能と考えられるレベル以下に CJD プリオンの感染性が減衰することが明らかになった。アルカリ性洗浄剤では濃度、温度、処理時間を一定以上に保持すれば、単独の薬剤処理でも CJD プリオンの感染性を検出限界以下に減衰することが可能であった。これらのことから、温度、濃度 (pH)、時間の要素がアルカリ性洗浄剤を用いた CJD プリオンの感染性減衰には重要であると考えられた。

E. 結論

CJD プリオンを用いたバイオアッセイの結果から、病院等医療の現場におけるプリオンによる二次感染を防ぐためには、不活化処理方法等により注意を払うことの重要性が示された。

[参考文献]

- 1) Fichet G, Comoy E, Duval C, et al. Novel methods for disinfection of prion-contaminated medical devices. *Lancet* 364:521-526, 2004.
- 2) Lemmer K, Mielke M, Kratzel C, Joncic M, Oezel M, Pauli P, Beekes M. Decontamination of surgical instruments from prions. II. *In vivo* findings with a model system for testing the removal of scrapie infectivity from steel surfaces. *J Gen Virol* 89:348-358, 2008.

F. 健康危険情報

医療現場におけるプリオンの不活化においては有効とされている消毒法が CJD プリオンに対して不完全な場合がある。プリオン防除に効果のあるとされている市販の洗浄剤についても、CJD プリオンの処理条件には十分な注意が必要である。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

表1. 一般的な処理とアルカリ性洗剤による処理

処理条件	発症マウス (発症数/接種数)	潜伏期間から算出され た感染性の減衰 (log)
オートクレーブ処理のみ		
121°C, 20分	6/6	1.38
134°C, 20分	6/6	1.37
3%SDS 溶液にて煮沸 10分	6/6	1.46
1M-NaOH 室温 60分	6/6	1.39
2M-NaOH 室温 60分	2/6	1.53
3%SDS 溶液中にてオートクレーブ 134°C,20分	0/5	>3.34
3%SDS 溶液にて煮沸の後、オートクレーブ 134°C,20分	0/6	>3.34
1M-NaOH 室温 60分の後、オートクレーブ 134°C,20分	0/6	>3.34
2M-NaOH 室温 60分の後、オートクレーブ 134°C,20分	0/5	>3.34
アルカリ性洗剤(強アルカリ性タイプ)		
(0.3%, 50°C, 20min) pH11.8	5/6	0
(0.3%, 90°C, 5min) pH11.8	0/6	>3.34
(0.3%, 90°C, 20min) pH11.8	0/5	>3.34
(2.0%, 50°C, 20min) pH12.5	4/6	1.93
(2.0%, 90°C, 5min) pH12.5	0/5	>3.34
(2.0%, 90°C, 20min) pH12.5	0/6	>3.34
アルカリ性洗剤(弱アルカリ性タイプ)		
(0.3%, 50°C, 20min) pH10.7	5/5	0
(0.3%, 90°C, 5min) pH10.7	6/6	1.61
(0.3%, 90°C, 20min) pH10.7	4/6	1.62
(2.0%, 50°C, 20min) pH11.0	6/6	1.34
(2.0%, 90°C, 5min) pH11.0	1/6	2.37
(2.0%, 90°C, 20min) pH11.0	0/6	>3.34

厚生労働科学研究費補助金（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 分担研究報告書

定量的 PMCA 法を用いた医療器材消毒法の定量的評価

研究分担者：竹内敦子 東北大学大学院医学系研究科 病態神経学分野
研究協力者：北本哲之 東北大学大学院医学系研究科 病態神経学分野

研究要旨 医療器具を介したクロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD)の二次感染防止を目的とした確実かつ簡便な滅菌法確立のため、定量的 Protein Misfolding Cyclic Amplification (PMCA)法を用いて、様々な滅菌法によるプリオン不活化効果を比較した。その結果、市販の消毒液または洗浄剤であるフタラールやアルカリ洗剤に浸漬した状態で通常のオートクレーブ処理 (121 °C, 15 min) を行うことで、大幅にプリオン不活化効果を高められることが明らかとなった。

A. 研究目的

これまでプリオン不活化効率の比較は動物実験による評価が中心であったが、結果を得るまでに非常に長い期間を必要とすること、また費用の面からも多くの種類の不活化法を網羅的に試験することが困難であった。しかしながら、PMCA法は不活化処理後の残存プリオン量を迅速に増幅し、定量することが可能であるため、網羅的な解析に適している。

従来プリオン不活化に効果があるとされる高濃度の NaOH や、SDS を用いる煩雑な処理はルーチンの滅菌作業としては普及しにくい。そこで、本研究ではより確実かつ簡便で、医療器具に可能な限りダメージを与えないプリオン不活化法を迅速に、また網羅的に検索するために、PMCA法を用いて、プリオン不活化効果を比較することを目的とする。

B. 研究方法

感染材料にはハムスタースクレイパー263K 株感染脳ホモジネートを用い、最終濃度 1%(w/v)で種々異なる処理によってプリオンを不活化した。不活化処理後、Proteinase K (PK) 処理 (50 µg/ml, 37 °C, 30 min) により、残存する異常プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) 量をウェスタンブロット法により確認し、PrP^{Sc} が検出されなかったサンプルを 10% (w/v) ハムスター正常脳で 100 倍希釈し PMCA に

供した。48 サイクルの反応後、正常脳ホモジネートで 10 倍希釈し PrP^{Sc} の増幅を繰り返した (マルチラウンド PMCA)。PMCA 反応終了後、Proteinase K 処理 (50 µg/ml, 37 °C, 60 min) を行い、ウェスタンブロット法により残存 PrP^{Sc} 量を定量し、不活化効率を比較した。

(倫理面への配慮)

特になし

C. 研究結果

未処理の 263K 感染脳ホモジネートの希釈系列を調製し、マルチラウンド PMCA 法により PrP^{Sc} を増幅すると、産生された PK 抵抗性 PrP (PrP^{res}) が検出されるまでにかかるラウンド数から感染脳ホモジネート中の PrP^{Sc} 量を定量するための検量線を作成することができる。この解析により、定量的 PMCA 法による 263K 株の PrP^{Sc} 量の検出限界はおおよそ 10⁻⁹ から 10⁻¹² 希釈であることがわかった。

図 1 に実施した滅菌法の一覧を示す。市販の洗浄剤や消毒、滅菌用の薬品を用い、室温及び通常のオートクレーブ処理 (121 °C, 15 min) を組み合わせた条件によるプリオン不活化効果を比較した。表 1 には、プリオン不活化法として従来から推奨されている条件による不活化効果 (log reduction) を示した。従来から効果が認められて

いるプリオン不活化法に関して、PMCA 法によっても十分な感染価の低下が算出できることを確認したため (表 1)、次に我々は市販の洗浄剤や消毒液を用いた不活化法による感染価の低下を比較した (表 2)。室温での処理では市販の洗浄剤、消毒薬により十分な不活化効果は認められなかった。しかしながら、これらの薬品類に浸漬した状態で 121 °C、15 min のオートクレーブ処理を行うと、過酢酸、グルタラールを除いてどの洗浄剤、消毒液を用いても、水に浸漬した状態と比較して 2 から 5 log 不活化効果が向上した。また、室温での処理と比較して、フタラールでは約 5 log、クレゾールでも 6 log 以上、アルカリ洗剤を用いた場合では約 2 log 感染価を低下させることが分かった。NaOH を用いた処理では、室温で静置する方法で十分と思われる効果が得られるのは 0.5 M 以上の濃度が必要であり、0.2 M 以下の処理では 121 °C、15 min のオートクレーブ処理が必須となることが分かった。

D. 考察

室温でプリオンを安全なレベルにまで不活化するには、1 M 以上の NaOH や、20,000 ppm の次亜塩素酸による処理が必要であること、また NaOH や次亜塩素酸といった医療器具にダメージの大きい試薬を用いない場合では、134 °C でのオートクレーブ処理が必要となることが PMCA 法によっても確認された。一方で、室温ではほぼ効果のないフタラール、クレゾールや、中性洗剤でも、121 °C での加熱を加えることで、プリオンの変性効果は飛躍的に向上することが明らかとなった。

E. 結論

クレゾール、アルカリ洗剤と通常のオートクレーブ処理を組み合わせる方法により PMCA 法で検出できる PrP^{Sc} 量は検出限界以下となり、プリオン不活化に有効な方法であること示された。またこれらの結果から、定量的 PMCA 法が迅速かつ高感度なプリオン不活化効果比較のためのツールとして利用可能であることが確認された。

高水準	過酢酸	6%アセサイド [®]	室温(25°C)	オートクレーブ 121°C, 15分
	グルタラール	3.5%サイデックスプラス [®]		
中水準	フタラール	0.55%アイズオーバ [®]	室温(25°C)	オートクレーブ 121°C, 15分
	クレゾール	x50 クレゾール石ケン液		
低水準	フェノール	5%液状フェノール	室温(25°C)	オートクレーブ 121°C, 15分
	次亜塩素酸ナトリウム	ツルクロ [®]		
NaOH	塩化ベンザルコニウム	x100 10%オスバ [®] 5	100°C, 3分煮沸	オートクレーブ 121°C, 15分
	ドデシル硫酸ナトリウム	3% 水溶液		
NaOH	① 0.1M NaOH ② 0.2M NaOH ③ 0.5M NaOH ④ 0.8M NaOH		室温(25°C)	加熱 70°C, 30分
洗浄剤系	アルカリ及び中性洗剤	① mip-PCM [®] (アルカリ洗剤) 0.125N NaOH相当 ② Cica Clean [®] L2 (アルカリ洗剤) x5 ③ Cica Clean [®] L3 (中性洗剤) x5 ④ Noniprosoft [®] (酵素配合中性洗剤) x1000	室温(25°C)	オートクレーブ 121°C, 15分
プリオン滅菌法	① 134°C 1時間オートクレーブ10分、18分、60分 ② 1N水酸化ナトリウム液あるいは20,000ppmの次亜塩素酸ナトリウム液に1時間浸漬後、(水に浸漬し)121°C 1時間または134°C 1時間オートクレーブ。 ③ 1N NaOHに2時間浸漬、あるいは2N NaOHに1時間浸漬			

図1 今回検討した滅菌法一覧

不活化の種類	不活化の効果
滅菌水	A.C. 134°C, 10 min >6.61
滅菌水	A.C. 134°C, 18 min >6.61
滅菌水	A.C. 134°C, 60 min >6.57
3%(v/v)ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)	100°C, 3 min >7.3
1 M NaOH	25°C, 120 min 6.05 (±0.56)
2 M NaOH	25°C, 60 min 5.78 (±0.56)
1 M NaOH	25°C, 10分+A.C. 134°C, 60分 >6.57
20000ppm相当次亜塩素酸溶液	>6.57
0.1 M NaOH	A.C. 121°C, 15 min >6.57
0.2%(v/v) sodium hypochlorite	6.57, 6.57, >6.57

表1 プリオン不活化に有効とされる処理の不活化効果

	室温	不活化効果	+加熱	不活化効果
滅菌水		0		2.35
過酢酸	25°C, 10 min	2.77 (±0)		1.33 (±0.35)
グルタラール		1.76 (±0.58)		2.63 (±0.35)
フタラール	25°C, 60 min	1.76 (±0.58)	A.C. 121°C, 15 min	>6.50
クレゾール		0		>6.50
塩化ベンザルコニウム	25°C, 10 min	0		3.93 (±2.31)
液状フェノール		0		3.50 (±0)
①アルカリ洗剤	25°C, 24hr	4.76	A.C. 121°C, 15 min	6.57, >6.57, >6.57
②アルカリ洗剤 (0.125M NaOH含)	-	-	70°C, 30 min	>7.30
①中性洗剤	25°C, 24hr	0	A.C. 121°C, 15 min	5.38 (±0.47)
②中性洗剤 (酵素配合)		0		4.56 (±0)
0.1M NaOH		4.27 (±1.08)	70°C, 30 min	4.33, >5.67, >5.67
			A.C. 121°C, 15 min	>6.57
0.2M NaOH	25°C, 30分	3.64 (±0)		5.67, >5.67, >5.67
0.5M NaOH		>7.39	70°C, 30 min	2.19, >5.67, >5.67
0.8M NaOH		>7.39		>5.67

表2 オートクレーブ処理を組み合わせた場合の不活化効果

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yokoyama T, Takeuchi A, Yamamoto M, Kitamoto T, Ironside JW, Morita M. Heparin enhances the cell-protein misfolding cyclic amplification efficiency of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci Lett* 498:119-123, 2011.