

表. dCJD 症例の臨床症状

	全例 (n = 53)	テント上群 (n = 20)	テント下群 (n = 28)	p value
Pathologically confirmed cases (%)	18 (34)	9 (45)	7 (25)	ns
Initial manifestations (%)	(n = 39)	(n = 16)	(n = 19)	
Unsteady gait	12 (31)	4 (25)	7 (37)	ns
Dementia	11 (28)	6 (38)	5 (26)	ns
Vertigo	6 (15)	0 (0)	6 (32)	p < 0.05
Behavioral abnormality	6 (15)	4 (25)	2 (11)	ns
Ataxia	6 (15)	3 (19)	1 (5)	ns
Diplopia	5 (13)	0 (0)	4 (21)	p = 0.07
Sensory disturbance	2 (5)	1 (6)	1 (5)	ns
Extrapyramidal signs	1 (3)	1 (6)	0 (0)	ns
Visual disturbance	1 (3)	0 (0)	1 (5)	ns
Others	3 (8)	3 (19)	0 (0)	
Manifestations (%)				
Cerebellar signs	35/51 (69)	10/20 (50)	22/26 (85)	p < 0.05
Psychiatric feature	32/50 (64)	11/17 (65)	19/28 (68)	ns
Dementia	51/53 (96)	19/20 (95)	28/28 (96)	ns
Visual disturbance	21/51 (41)	8/19 (42)	12/27 (44)	ns
Myoclonus	50/52 (96)	20/20 (100)	25/26 (96)	ns
Extrapyramidal signs	30/51 (59)	12/20 (60)	17/26 (65)	ns
Pyramidal signs	40/51 (78)	18/20 (90)	19/26 (73)	ns

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業（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

硬膜移植後 Creutzfeldt-Jakob 病症例の脳へのアミロイドβ蛋白沈着

研究分担者：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：佐村木美晴	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：森永章義	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：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：石田千穂	独立行政法人国立病院機構医王病院神経内科
研究代表者：山田正仁	金沢大学大学院脳老化・神経病態学(神経内科学)

研究要旨 19歳時に頭部外傷に対して脳外科手術を受け、右前頭蓋窩にヒト屍体由来硬膜(Lyodura[®])が移植された男性が、37歳時に硬膜移植後 Creutzfeldt-Jakob 病 (Creutzfeldt-Jakob disease: CJD) を発症し、39歳時に死亡した。剖検にて非プラーク型 CJD と確定診断した。Aβ に対する免疫染色にて、右前頭葉皮質に Aβ 沈着を認め、右頭頂葉にも少量ながら Aβ 沈着を認めた。30歳代での脳への Aβ 沈着は極めて稀である。本例の脳への Aβ 沈着は硬膜移植による伝播の可能性を否定出来ない。今後多数例での検討が必要である。

A. 研究目的

プリオン病は同種間あるいは異種間で伝播するという特徴を有し、変異型 Creutzfeldt-Jakob 病 (Creutzfeldt-Jakob disease: CJD) や医原性 CJD といった症例の出現は、しばしば大きな社会問題となっている。近年、Alzheimer 病 (Alzheimer's disease: AD) の代表的な病理学的所見の1つである脳へのアミロイドβ蛋白 (Aβ) の沈着(脳βアミロイドーシス)も、異常プリオン蛋白と同様に個体間を伝播するという動物実験が報告されている^{1,2}。現時点では、ヒトにおいて脳βアミロイドーシスが伝播したという報告はないが、硬膜移植 21年後に硬膜移植後 CJD を発症した死亡時 28歳の症例の脳に Aβ 沈着を多く認めたという報告があり³、硬膜移植によって脳βアミロイドーシスが伝播した可能性が否定出来ない。そこで、我々は、硬膜移植後 CJD 症例の剖検脳を Aβ に対する抗体で免疫染色を行い、硬膜移植で脳βアミロイドーシスが伝播する可能性を検討する。

B. 研究方法

[症例]死亡時 39歳、男性。19歳時に交通事故

で右頭蓋底、両側頭骨、左側頭骨を骨折。頭蓋骨形成術にて加療され、右前頭蓋窩にヒト屍体由来硬膜(Lyodura[®])が移植された。37歳時に体重減少、歩行時のふらつきを認め、その後幻覚、不眠、見当識障害も出現した。更に認知機能障害は進行し、ミオクローヌスも出現した。頭部 MRI にて大脳皮質全体や両側基底核に拡散強調画像で高信号を認め、脳脊髄液検査で 14-3-3 蛋白高値、脳波にて周期性同期性放電を認めた。プリオン蛋白遺伝子検査では、コドン 129 は Met/Met で、遺伝子変異を認めなかった。以上より硬膜移植後 CJD のほぼ確実例と診断した。発症 11ヶ月後に永眠され、剖検を行った。[病理学的検討]本症例の剖検脳を用いて、HE 染色およびプリオン蛋白(3F4)、Aβ(4G8)、リン酸化タウ蛋白(AT8)に対する抗体を用いた免疫染色を行った。

(倫理面への配慮)

本症例の剖検脳の研究利用については金沢大学医学倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

脳重量は 896g で高度に萎縮し、右前頭蓋窩に移植硬膜を認めた。HE 染色では、大脳皮質は前頭葉から後頭葉にかけて神経細胞が高度に脱落し、グリオシスが著明で、組織の粗鬆化を認めた。側頭葉内側部に関しては、海馬の構造は保たれ、神経細胞も比較的保たれており、著明な海綿状変化を認めた。

プリオン蛋白に対する免疫染色では、大脳および小脳皮質にシナプス型のプリオン蛋白沈着を認め、プラーク型の沈着は認めなかった。以上より、非プラーク型の硬膜移植後 CJD と診断した。

A β に対する免疫染色では、右前頭葉皮質に A β 沈着を認め、右頭頂葉にも少量ながら A β 沈着を認めた。リン酸化タウ蛋白の沈着は認めなかった。

D. 考察

本症例は、1985 年に右前頭蓋窩に Lyodura[®] が移植され、その 19 年後に硬膜移植後 CJD を発症し、発症 1 年 10 ヶ月後の 39 歳時に死亡された。死亡時 39 歳と若年にも関わらず、硬膜移植部位近傍の右前頭葉を中心に A β 沈着を認めた。

これまでにプリオン病患者の脳 A β 沈着を認めたとする症例報告は多数あるが、症例報告でありプリオン蛋白と A β の沈着に何らかの関連があるかどうかは不明である。多数例での検討では、110 例の CJD 確実例のうち、37 例 (33.6%) で A β 沈着を認めたが、コントロール症例 110 例でも 37 例 (33.6%) に A β 沈着を認めており、差が無かったとされている⁴。また、同じ研究では、CERAD による病理学的診断でも検討しており、CJD 確実例の 10.9% が AD と診断されているが、コントロール症例の 19.1% と比較して有意差を認めず⁴、プリオン病によって A β 沈着が促進されているわけではないことが示唆されている。本症例は 39 歳と若年であったにも関わらず A β 沈着を認めた点が特徴的であったが、各年代別の脳への A β 沈着を検討した複数の研究にて、30 歳代の脳への A β 沈着は極めて稀であることが報告されている⁵⁻⁷。

本症例の脳への A β 沈着の原因としては、1. 自然経過、2. 脳へのプリオン蛋白沈着が A β 沈

着を促進した、3. 硬膜移植によって A β 沈着が伝播した、といった 3 つの可能性が考えられる。この 1 例で結論を出すことは出来ず、今後、多数例で検討を行う予定である。

E. 結論

39 歳で死亡した非プラーク型硬膜移植後 CJD 症例の脳の硬膜移植部位近傍に A β 沈着を認めた。硬膜移植によって A β 沈着が伝播している可能性が否定出来ず、今後多数例での検討を行う。

[参考文献]

- 1) Meyer-Luehmann M, Coomaraswamy J, Bolmont T, Kaeser S, Schaefer C, Kilger E, Neuenschwander A, Abramowski D, Frey P, Jaton AL, Vigouret JM, Paganetti P, Walsh DM, Mathews PM, Ghiso J, Staufenbiel M, Walker LC, Jucker M. Exogenous induction of cerebral β -amyloidosis is governed by agent and host. *Science* 313:1781-1784, 2006.
- 2) Hamaguchi T, Eisele YS, Varvel NH, Lamb BT, Walker LC, Jucker M. The presence of A β seeds, and not age per se, is critical to the initiation of A β deposition in the brain. *Acta Neuropathol* 123:31-37, 2012.
- 3) Preusser M, Strobel T, Gelpi E, Eiler M, Broessner G, Schmtzhard E, Budka H. Alzheimer-type neuropathology in a 28 year old patient with iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease after dural grafting. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77:413-416, 2006.
- 4) Hainfellner JA, Wanschitz J, Jellinger K, Liberski PP, Gullotta F, Budka H. Coexistence of Alzheimer-type neuropathology in Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol* 96: 116-122, 1998.
- 5) Yamaguchi H, Hirai S, Morimatsu M, Shoji M, Ihara Y. A variety of cerebral amyloid deposits in the brains of the Alzheimer-type dementia demonstrated by β protein immunostaining. *Acta Neuropathol* 76:541-549, 1988.
- 6) Braak H, Braak E. Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories. *Neurobiol Aging* 18:351-357, 1997.

7) Funato H, Yoshimura M, Kusui K, Tamaoka A, Ishikawa K, Ohkoshi N, Namekata K, Okeda R, Ihara Y. Quantitation of amyloid β -protein ($A\beta$) in the cortex during aging and in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 152:1633-1640, 1998.

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Alcalde-Cabero E, Almazán-Isla J, Brandel JP, Breithaupt M, Catarino J, Collins S, Haybäck J, Höftberger R, Kahana E, Kovacs GG, Ladogana A, Mitrova E, Molesworth A, Nakamura Y, Pocchiari M, Popovic M, Ruiz-Tovar M, Taratuto AL, van Duijn C, Yamada M, Will RG, Zerr I, de Pedro-Cuesta J. Health professions and risk of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease, 1965 to 2010. *Euro Surveill* 17:pii:20144, 2012.
- 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* 2:e000649, 2012.
- 3) Hamaguchi T, Eisele YS, Varvel NH, Lamb BT, Walker LC, Jucker M. The presence of $A\beta$ seeds, and not age per se, is critical to the initiation of $A\beta$ deposition in the brain. *Acta Neuropathol* 123:31-37, 2012.
- 4) 浜口 毅, 山田正仁. β アミロイドの propagation による進展. *Current Therapy* 30:336-340, 2012.
- 5) 浜口 毅, 山田正仁. 周期性ミオクロームス: Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) 概論. *Clin Neurosci* 30:760-763, 2012.
- 6) 浜口 毅, 山田正仁. 臨床化学的側面からみたプリオン病の診断と病態解析. *臨床化学* 41:35-40, 2012.

2. 学会発表

- 1) Sakai K, Hamaguchi T, Noguchi-Shinohara M, Nozaki I, Sato T, Takumi I, Sanjo N, Nakamura Y, Kitamoto T, Saito N, Mizusawa H, Yamada M. Prion protein propagation in dura mater graft-associated Creutzfeldt-jakob disease. Prion 2012, Amsterdam, May 9-12, 2012.
- 2) Sanjo N, Ohara M, Satoh K, Hamaguchi T, Nakamura Y, Kitamoto T, Yamada M, Mizusawa H. Clinical features of genetic prion disease and cerebrospinal fluid findings in Japanese patients. Prion 2012, Amsterdam, May 10-12, 2012.
- 3) Sanjo N, Maya Ohara M, Katsuya Satoh K, Hamaguchi T, Nakamura Y, Kitamoto T, Yamada M, Mizusawa H. Cerebrospinal fluid findings in genetic prion disease in Japan and their association with clinical features. Prion 2012, Amsterdam, May 9-12, 2012.
- 4) Noguchi-Shinohara M, Hamaguchi T, Nozaki I, Sakai K, Yamada M. Serum tau protein as a marker for the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. Asian Pacific Prion Symposium 2012, Yokohama, July 29-30, 2012.
- 5) Sakai K, Hamaguchi T, Noguchi-Shinohara M, Nozaki I, Sato T, Takumi I, Sanjo N, Nakamura Y, Kitamoto T, Saito N, Mizusawa H, Yamada M. Prion protein propagation in dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease. Asian Pacific Prion Symposium 2012, Yokohama, July 29-30, 2012.
- 6) 篠原もえ子, 浜口 毅, 野崎一朗, 坂井健二, 山田正仁. 孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病における非浸襲的診断マーカーとしての血清総タウ蛋白. 第17回日本神経感染症学会総会学術総会, 京都, 10.19-20, 2012.

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 難治性疾患等克服研究事業（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
研究協力者：山下典生 岩手医科大学医歯薬総合研究所
研究協力者：齊藤絏一 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、その経時的変化の客観的判定法は存在しない。そこで、画像統計解析手法を本症に応用し、経時的変化の自動検出プログラムを新たに開発した。本手法によって、DWI 異常域の出現と消退を客観的に評価することが可能となり、今後の早期治療介入における薬効のサロゲートマーカーとしても有望と考えられた。

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。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]。また、薄切スライス撮像や 3 Tesla 装置における診断能を明らかにするため、プリオン病班とサーベイランス班の合同画像委員会を組織し、前向き多施設研究を実施中である。

一方で、プリオン病に対する疾患修飾薬による早期治療介入が検討されつつあり、薬効評価のためのサロゲートマーカーの確立が急務である。DWI が最も有望と考えられるが、DWI における拡散異常域の経時的変化を客観的・定量的に評価する手法は存在しない。そこで、我々は、画像統計解析手法を応用して、DWI 所見の経時的変化の客観的評価法の確立を試みた。

B. 研究方法

DWI を経時的に撮像できた早期 Creutzfeldt-Jakob(CJD)病患者 3 名(42-75 歳)を後方視的に検討した。MRI は 1.5 Tesla 装置(Signa HDxt, GE Healthcare)を用い、DWI は $b=1000\text{s/mm}^2$, matrix 128x128, FOV 22cm, 5mm 厚で撮像した。撮像間隔は 1-2 か月であった。

DWI 画像を匿名化 DICOM 形式ファイルで収

集し NifTI 形式に変換後、同一患者の 2 時点のデータを SPM(Statistical Parametric Mapping)を用いて脳マスク抽出およびリアライメントを行い、信号輝度を正規化した後に、差分画像を作成した。信号上昇部位および低下部位のカラーコード化や体積算出も試みた。

(倫理面への配慮)

画像データは匿名化を行った後に画像処理に供した。

C. 研究結果

全例で2点間の差分画像を自動生成することが可能であった(図)。差分画像では、新たな病変の出現域は高信号として(赤矢印)、病変の消退域は低信号として(緑矢印)明瞭に描出することができた。

一部の画像にミスレジストレーションが認められたが、部分容積効果および萎縮の進行が原因と考えられた。

信号輝度の正規化および異常部位の自動抽出・定量化に関しては安定した結果を得ることができず、さらなる改良が必要と考えられた。

D. 考察

本研究によって、画像統計解析手法を応用することで、プリオン病の早期病変の経時的変化を客観的に評価することが可能であることが示唆された。本手法を薬効評価指標などに用い

るには、さらなる精度向上が不可欠であり、そのためには、1)薄切スライス(3mm 厚ギャップレス)の撮像、2)b0 画像による信号輝度自動正規化法の開発、3)変化域抽出のための閾値の最適化、4)変化域の可視化法の最適化 などが必要と考えられる。現在、解析プログラムの改良を行っており、今後協力施設を募り、精度検証を進めていきたい。

E. 結論

画像統計解析手法を応用することで、早期 CJD における DWI 異常域の経時的変化を客観的に評価することが可能となった。

[参考文献]

- 1) Sasaki M, Ida M, Yamada K, 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, et al. 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* 2:e000649, 2012.

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

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

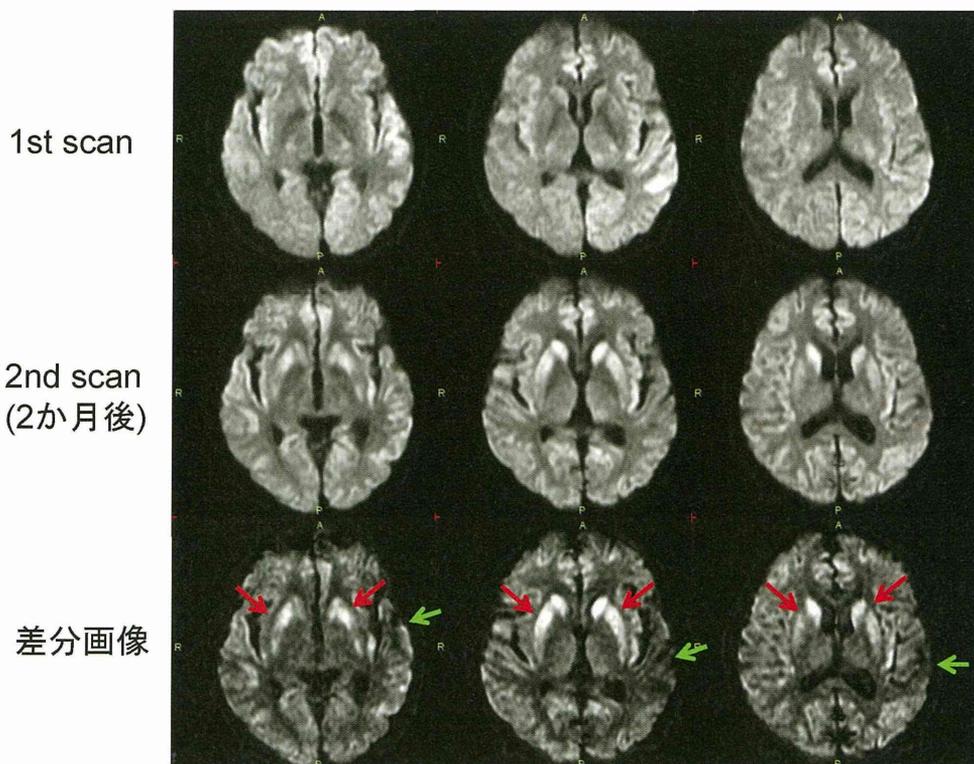
なし

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 難治性疾患等克服研究事業（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

CJD 経過に伴う髄液 H-FABP の変動と認知症患者の血清 H-FABP

研究分担者：堀内浩幸 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分子解析学
 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分子解析学

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質)に焦点を当て、新規な免疫学的 H-FABP 検出系の開発を進めている。平成 24 年度は、これまでに開発した高感度 H-FABP 検出系を用いた CJD 患者髄液検査データの再調査を行い、total-tau (t-tau)⁻, 14-3-3⁻, H-FABP⁺の患者は全て Val180Ile (V180I) の遺伝子変異を持つことがわかった。また CJD の病状経過に伴う髄液 H-FABP 濃度の変動を過去に報告された症例の t-tau 濃度と同症例患者髄液を用いて比較したところ、H-FABP 濃度は、t-tau 濃度と同様に病状経過で大きく変動すること、また H-FABP 濃度の変動が t-tau 濃度の変動と近似であること、また各症例とも H-FABP と t-tau 濃度が無動無言の前に高値を示す傾向があることがわかった。各種認知症患者の血清 H-FABP 濃度を定量したところ、弧発性 CJD (sCJD) の H-FABP 濃度は 2934.7 pg/mL (n=7) であったのに対して、レビー小体型認知症 (DLB) では、7644 pg/mL (n=2) で高値を示し、またパーキンソン病 (PD) でも 5376.5 pg/mL (n=2) でわずかに高値を示した。さらに sCJD と DLB の H-FABP 濃度は、髄液中と血清中で逆相関している可能性が示唆された。本研究で構築した H-FABP 検出系はこれまでの研究利用実績から、極めて安定して H-FABP の検出と定量が可能であることがわかった。

A. 研究目的

我国における CJD, なかでも医原性 CJD の発生頻度は世界で最も高く、その治療法の確立と CJD 診断法の充実が医療現場並びに医療行政から強く求められている。

CJD の髄液中のマーカーとして診断に利用されているものには、t-tau と 14-3-3 タンパク質があるが、CJD に経過に伴い t-tau は変動が大きいことや両タンパク質共に陰性である患者も存在する。

近年、CJD の髄液中の新たなマーカータンパク質として H-FABP(心臓型脂肪酸結合タンパク質)が注目されている。

そこで本研究では、この H-FABP の高感度検出系を構築するとともに、CJD や他の認知症患者の髄液中における H-FABP の動態を解析することで CJD 診断法における H-FABP 検査の有効性を検証する。また医療現場で簡易かつ高感度に H-FABP を検出できる系を確立することが目的である。

B. 研究方法

1. H-FABP 検出系

H-FABP の検出系には、本研究で構築した H-FABP 特異的マウスモノクローナル抗体 (3E9) をキャプチャー抗体に、HRP 標識ニワトリモノクローナル抗体 (HUFa26) を検出抗体としたサンドイッチ ELISA を用いた。

2. H-FABP 検出患者の特徴解析

平成 23 年実施した CJD 患者髄液 46 検体の中で、H-FABP 陽性であった 40 検体について遺伝的変異等の特徴がないか再解析した。

3. CJD 患者の経過に伴う髄液中の H-FABP の変動

CJD 患者の経過に伴う症状と髄液検査で用いられた髄液試料 (2007 年 Satoh ら) 中の H-FABP 濃度を測定し、t-tau 濃度との比較や症状との特徴を考察した。

4. 各種脳疾患患者における血清 H-FABP

孤発性 CJD (sCJD) (7 検体), DLB (2 検体), PD (2 検体), 晩発性小脳皮質萎縮 (LCCA, 1 検体), アルツハイマー病 (AD, 3 検体) の血清中の H-FABP 濃度を測定し, その特徴を解析した。

5. H-FABP 検出系の安定性

H-FABP 検出系の安定性を試験するために, 同一ロット抗体を同一の条件下で管理したものを毎回の試験に使用し, その際の定量直線の変化を検討した。

(倫理面への配慮)

ヒトプリオン病他の脳脊髄液並びに血清を用いたバイオマーカー測定は, 研究協力者が所属する長崎大学で実施し, 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. H-FABP 検出 CJD 患者の特徴解析

46 検体の髄液中のマーカートンパク質 (t-tau, 14-3-3, H-FABP) の検出において, 4 検体は全てが陰性であった。また, 14-3-3 のみ陽性が 2 検体, H-FABP のみ陽性が 9 検体, 14-3-3 と H-FABP の共陽性が 5 検体, 3 種全てが陽性であったものが 26 検体であった (図 1)。このうち, H-FABP のみ陽性であった 9 検体は, V180I の遺伝子変異であることがわかった。

2. CJD 患者の経過に伴う髄液中の H-FABP の変動

Sato らによって解析された 5 症例の CJD 患者の経過に伴う症状と髄液検査で用いられた髄液試料中の H-FABP 濃度を 4 症例について測定した。このうち, 1 症例に関しては, H-FABP と t-tau の変動が近似であった (図 2)。また H-FABP の変動は, t-tau と同様, 病状経過で大きく変動することもわかった。病状との関連では, H-FABP と t-tau はいずれも無動無言の症状の前に最も高値を示す傾向があることがわかった。

3. 各種脳疾患患者における血清 H-FABP

各種認知症患者の血清 H-FABP 濃度を定量したところ (表 1), sCJD の H-FABP 濃度は 2934.7 pg/mL (n=7) であったのに対して, DLB では,

7644 pg/mL (n=2) で高値を示し, また PD でも 5376.5 pg/mL (n=2) でわずかに高値を示した。またその他の脳疾患患者血清中の H-FABP 濃度は, sCJD の濃度以下であった。同 sCJD と DLB 患者の髄液中の H-FABP 濃度は, 血清中とは逆に sCJD 患者で高値, DLB 患者で低値であった (結果は示していない)。

5. H-FABP 検出系の安定性

H-FABP 検出系に使用する同一ロット抗体を同一の条件下で 1 年以上使用し, その定量直線を経過観察したが, この経過期間内であれば, 感度並びに相関性が高く維持されていることがわかった (結果は示していない)。

D. 考察

平成 24 年度の研究では, 昨年度までに行なった CJD 患者の髄液中のマーカートンパク質の再解析を行なった。その結果, 46 検体中, H-FABP 陽性が 40 検体と最も多かったが, 陰性も 6 検体存在した。これは, CJD 患者の経過に伴う髄液中の H-FABP の濃度変動が t-tau と同様に大きいためではないかと考えられる。しかしながら, H-FABP 陽性は, t-tau や 14-3-3 陰性の CJD 髄液中でも認められるため, CJD 髄液検査における H-FABP 検出の有効性を示していると考えられる。さらに, この H-FABP のみ陽性の 9 検体がいずれも V180I の遺伝子変異であったことは非常に興味深い。今後さらに検体数を増加させることで, H-FABP 検出の有効性を高めることができるものと思われる。また CJD 患者の経過に伴う髄液中の H-FABP の検出において, t-tau と同様に変動が大きいことを考慮すれば, CJD 患者の髄液検査に t-tau と 14-3-3 に H-FABP の検出も加えることは, 意義があると考えられる。

各種脳疾患患者における血清 H-FABP の検出では, 検体数が少数ではあるが, 血清 H-FABP 濃度が髄液中のそれと, DLB と sCJD で逆相関している可能性が示唆された。今後は, より多くの検体での解析と ^{123}I -MIBG 心筋シンチデータとの関連も視野に検討する必要があるものと思われる。

E. 結論

CJD 髄液中で H-FABP のみの陽性検体は、V180I の遺伝子変異であった。CJD 患者の経過に伴う髄液中の H-FABP の変動では、t-tau の変動と近似であり、無動無言の症状の前に最も高値を示す傾向が示唆された。各種脳疾患患者における血清 H-FABP の検出では、少例ながらも DLB で高い濃度が検出された。本研究で構築した H-FABP 検出系は、高感度かつ高い安定性を示すことがわかった。

[参考文献]

- 1) 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* 23:372-381, 2007.
- 2) Steinacker P, Mollenhauer B, Bibl M, Cepek L, Esselmann H, Brechlin P, Lewczuk P, Poser S, Kretschmar HA, 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.
- 3) Wada-Isobe K, Imamura K, Kitamaya M, Kowa H, Nakashima K. Serum heart-fatty acid binding protein levels inpatients with Lewy body disease. *J Neurol Sci* 266:20-24, 2008.
- 4) Mollenhauer B, Steinacker P, Bahn E, Bibl M, Brechlin P, Schlossmacher MG, Locascio JJ, Wiltfang J, Kretschmar HA, Poser S, Trenkwalder C, Otto M. Serum heart-type fatty acid-binding protein and cerebrospinal fluid tau: marker candidates for dementia with Lewy bodies. *Neurodegener Dis* 4:366-375, 2007.

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

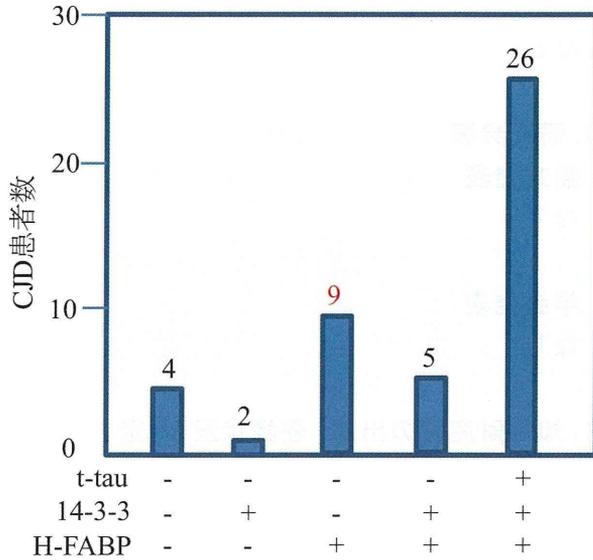


図1. CJD患者髄液46検体の3種マーカー検出と特徴

表1. 各種脳疾患患者における血清H-FABP

	血清H-FABP (pg/mL)
弧発性CJD (sCJD n=7)	2934.7
レビー小体型認知症 (DLB) #1	6073
レビー小体型認知症 (DLB) #2	9215
平均 n=2	7644
パーキンソン病 (PD) #1	4794
パーキンソン病 (PD) #2	5959
平均 n=2	5376.5
晩発性小脳皮質萎縮 (LCCA)	2368
アルツハイマー病 (AD) #1	1685
アルツハイマー病 (AD) #2	3476
アルツハイマー病 (AD) #3	1554

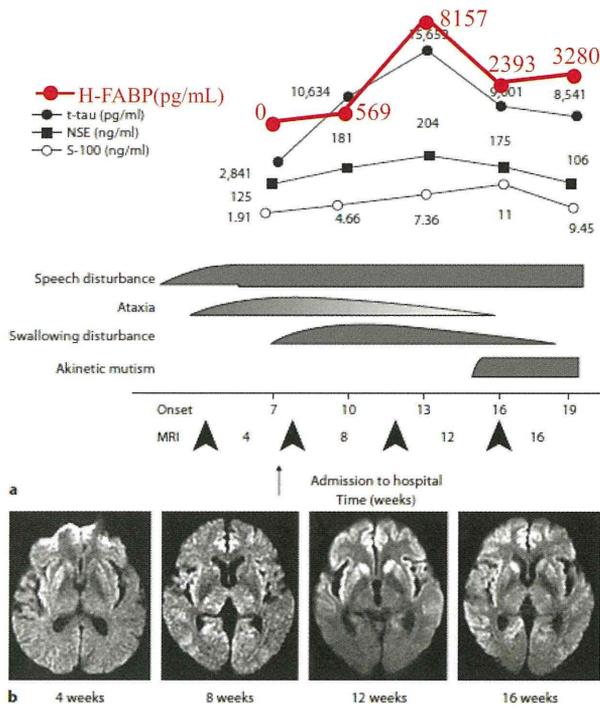


図2. CJD患者の経過に伴う症状と髄液検査

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業（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

リコンビナント PrP^C を用いたヒトプリオンの増幅

研究分担者：竹内敦子 東北大学大学院医学系研究科

研究協力者：北本哲之 東北大学大学院医学系研究科

研究要旨 本研究では、リコンビナント正常プリオン蛋白 (PrP^C) を用いて Creutzfeldt-Jacob disease (CJD) 患者脳から、Protein Misfolding Cyclic Amplification (以下 PMCA) 法によってヒトプリオンの高効率な増幅を試みた。弧発性 CJD (sCJD)-MV2, VV2 プリオンは、基質 PrP^C の遺伝子型が 129V の時、プロテアーゼ抵抗性 PrP (PrP^{res}) の顕著な産生を認めた。一方、プラークタイプの異常プリオン蛋白 (PrP^{Sc}) の沈着を示す硬膜移植後 CJD 脳 (dCJD-PL) を seed とした場合、seed の遺伝子型は 129M/M であるにも関わらず、MV2, VV2 と同様基質として遺伝子型が 129V の PrP^C を用いた場合に PrP^{Sc} の顕著な増幅が認められた。

A. 研究目的

プリオン病は現時点で有効な治療法のない感染性の致死性神経疾患である。こうした CJD の二次感染を今後確実に防止するためには、輸血用血液や医薬品原料のスクリーニングが必須であり、一刻も早くヒトプリオンを高感度検出する技術を確立しなければならない。異常プリオン蛋白 (PrP^{Sc}) の *in vitro* 増幅系である PMCA 法は、ハムスタースクレイピー263K 株における PrP^{Sc} の高感度検出法として広く知られているが、日本人に最も多いタイプである sCJD-MM1 プリオンの増幅は非常に困難であり、依然として実用化レベルに増幅率が達していない。一方、variant CJD プリオンについては、リコンビナント PrP^C を基質に用いる PMCA 法 (Cell-PMCA 法) により超高感度で検出が可能となった¹⁾。このように、CJD プリオンはタイプによって同じ条件では増え方に大きな違いがある。今回は、sCJD の中でも、比較的効率良く増幅される MV2, VV2 プリオンに対してマルチラウンド Cell-PMCA 法により高感度検出を試みた。

B. 研究方法

ヒトプリオンの増幅に用いる基質として、293F 細胞 (ヒト胎児腎臓細胞由来) にヒト PrP^C (129M または V) を一過性に発現させた細胞破砕液を基質として用い、各タイプの

CJD プリオン (sCJD-MV2, VV2, dCJD-PL) から Cell-PMCA 法によって PrP^{Sc} を増幅させ、proteinase K 処理の後、ウエスタンブロット法により PrPres を検出した。

(倫理面への配慮)

ヒトを対象とした研究に関しては、東北大学医学部・医学系研究科倫理委員会の規定に従い研究を行った。また動物実験に関しては動物衛生研究所動物実験に関する指針を遵守した。

C. 研究結果

MV2, VV2 プリオンは基質 PrP の遺伝子型が 129M では増幅率が低いのにに対し、129V では非常に高い増幅率を示す (図 1, 2)。本研究ではこの増幅率の高さに着目し、マルチラウンドでの高感度検出を試みた。129VPrP^C を基質とした PMCA により非常に効率良く増幅され、マルチラウンド PMCA により 10⁻⁸ から 10⁻⁹ 希釈された脳ホモジネートから PrP^{res} を検出することが可能であった。そこで、ノックインマウスを用いた感染実験から MV2 あるいは VV2 からの感染が疑われている dCJD-PL プリオン (分子量は中間型である MMi)²⁾ に対して、Cell-PMCA 法による増幅を試みた。その結果、seed に用いた dCJD-PL プリオンの遺伝子型は 129M/M であるにも関わらず、動物実験で得られている結果と同様に、129MPrP^C を用いた場合の増幅率は非

常に低かった。一方で、129VPrP^Cを基質に用いた場合には非常に高い増幅率を示すことが明らかとなった(図 2)。

D. 考察

MV2, VV2 プリオンは基質 PrP の遺伝子型が 129M では増幅率が低いのに対し、129V では非常に高い。この結果は、我々の用いた PMCA 条件では、タイプ 2 である 129VPrP^{Sc} は非常に効率よく増幅されることを示している。一方 dCJD-PL プリオンの遺伝子型は 129M/M であるが、もとの感染源を V2 プリオンであると仮定すれば、129VPrP^C を異常化する能力が残存することが、*in vitro* 系である PMCA 法によっても確認できることが分かった。この結果により、MV2 や VV2 の生前診断法として応用できることが示唆されだけでなく、MMi タイプのような感染由来の CJD について、129VPrP^C を基質に用いた Cell-PMCA 法を行うことにより、MM1 や MM2 との増幅率の明確な違いを利用して sCJD と区別できる可能性が示唆された。

E. 結論

129VPrP^C を基質に用いた Cell-PMCA 法は、MV2 や VV2 の生前診断法として応用できる可能性だけでなく、非典型的な(感染由来が疑われるような)CJD に関しては、増幅の基質特異性の違いを利用することで、一つの診断法として応用できる可能性がある。

[参考文献]

- 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.
- 2) Kobayashi A, Asano M, Mohri S, Kitamoto T. A traceback phenomenon can reveal the origin of prion infection. *Neuropathology* 29:619-624. 2009.

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

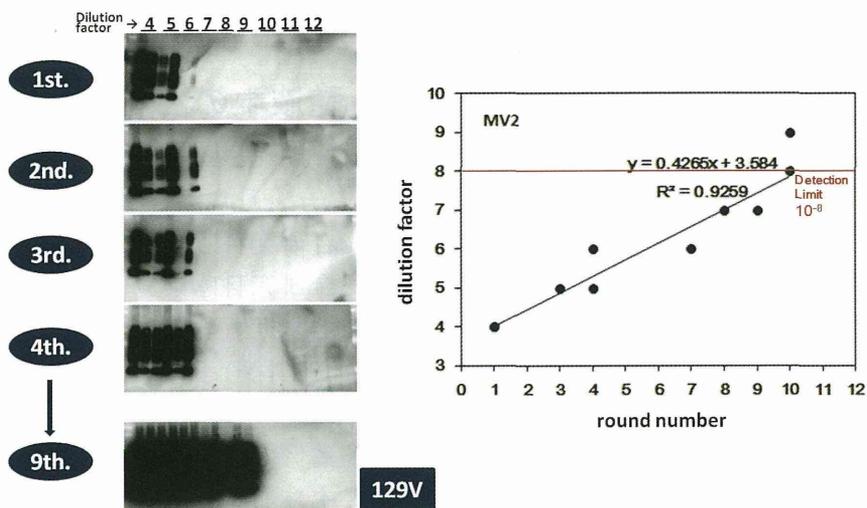


図 1 MV2 の Cell-PMCA による増幅結果

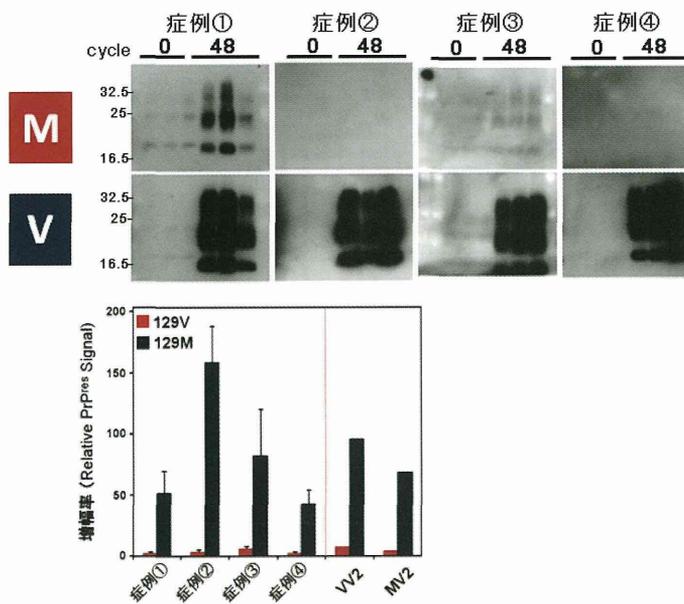


図 2 dCJD-PL タイププリオンの増幅結果

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業（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

ヒトプリオン病の definite cases における髄液中のバイオマーカーの検討と 異常プリオン蛋白試験管内増幅法 (RT-QuIC 法) による解析

研究分担者：西田教行 長崎大学医歯薬総合研究科感染分子解析学分野
 研究協力者：佐藤克也 長崎大学医歯薬総合研究科感染分子解析学分野
 研究協力者：新竜一郎 長崎大学医歯薬総合研究科感染分子解析学分野

研究要旨 2011 年ヒト孤発性プリオン病における、髄液中の異常プリオン蛋白試験管内増幅法 (RT-QuIC 法) の解析結果を報告した。しかしながら、多数例の definite cases におけるヒト孤発性プリオン病の髄液中のバイオマーカーの検討と、異常プリオン蛋白試験管内増幅法 (RT-QuIC 法) による解析は報告されていない。

今回我々は、多数例の definite cases におけるヒト孤発性プリオン病の髄液中のバイオマーカーの検討と、異常プリオン蛋白試験管内増幅法 (RT-QuIC 法) の解析を本研究の目的とした。definite cases は計 92 症例について検討を行った (非プリオン病患者は 240 症例について検討を行った)。definite cases 92 症例と非プリオン病 240 症例について、14-3-3 蛋白及び総タウ蛋白は ELISA 法、異常プリオン蛋白試験管内増幅法は RT-QuIC 法にて検討した。14-3-3 蛋白の感度・特異度は 90.8%、81.2%、総タウ蛋白の感度・特異度は 87.6%、86.8%、RT-QuIC 法の感度・特異度は 82.5%、98.7% であった。さらに 14-3-3 蛋白と総タウ蛋白と RT-QuIC 法の組み合わせにて検出できた症例は、88 症例、95.6% 検出であった。14-3-3 蛋白と総タウ蛋白と RT-QuIC 法を組み合わせで診断することは、極めて重要である。

A. 研究目的

2011 年、ヒト孤発性プリオン病における髄液中の異常プリオン蛋白試験管内増幅法 (RT-QuIC 法) の解析結果を報告した。しかしながら、多数例の definite cases におけるヒト孤発性プリオン病の髄液中のバイオマーカーの検討と、異常プリオン蛋白試験管内増幅法 (RT-QuIC 法) による解析は報告されていない。

今回我々は多数例の definite cases におけるヒト孤発性プリオン病の髄液中のバイオマーカーの検討と、異常プリオン蛋白試験管内増幅法 (RT-QuIC 法) の解析を本研究の目的とした。

B. 研究方法

definite cases は日本 28 症例、オーストラリア 16 症例、韓国 4 症例、ドイツ 8 症例、スペイン 36 症例計 92 症例について検討を行った。又 Parchi の分類に基づく MM1 41 症例、MV1 2 症例、VV1 2 症例、MM2-皮質型 27 症例、MM2-視床型 1 症例、MV2 8 症例、VV2 11 症例であ

った (表 1)。非プリオン病患者は 240 症例について検討を行った (表 2)。definite cases 92 症例と非プリオン病 240 症例について、14-3-3 蛋白及び総タウ蛋白は ELISA 法、異常プリオン蛋白試験管内増幅法 (RT-QuIC 法) にて検討した。

(倫理面への配慮)

長崎大学医歯薬学総合研究科の倫理委員会の規定に準ずる。

C. 研究結果

1) 結果は表 3・4・5 に示す。

14-3-3 蛋白の感度・特異度は 90.2%、81.2%、総タウ蛋白の感度・特異度は 85.9%、86.8%、RT-QuIC 法の感度・特異度は 82.6%、98.7% であった (表 4)。(タイプ別の感度については、表 5 を参照。)

2) 14-3-3 蛋白と総タウ蛋白と RT-QuIC 法の組み合わせにて検出できた症例は、88 症例、95.6% 検出であった (表 3)。

3) 非プリオン病患者において RT-QuIC 法にて症候性けいれんを 2 症例、神経梅毒を 1 症例にて偽陽性を示した(表 6)。

4) 偽陽性を示した症候性けいれんと神経梅毒について、多数例での検討し、現在まで偽陽性を示した症例以外で偽陽性の症例は認められなかった(表7・8)。

D. 考察

プリオン病確定例では、髄液中の 14-3-3 蛋白およびタウ蛋白と RT-QuIC 法の併用にて、高い精度での診断が可能であった。

E. 結論

RT-QuIC 法においても偽陽性が存在するため、鑑別診断することは極めて重要である。

[参考文献]

- 1) Alcalde-Cabero E, Almazan-Isla J, Brandel JP, et al. Health professions and risk of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease, 1965 to 2010. *Euro Surveill* 17:pii:20144, 2012.
- 2) Hamlin C, Puoti G, Berri S, et al. A comparison of tau and 14-3-3 protein in the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 79:547-552, 2012.
- 3) Matsui Y, Satoh K, Miyazaki T, et al. 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) McGuire LI, Peden AH, Orru CD, et al. Real time quaking-induced conversion analysis of cerebrospinal fluid in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* 72:278-285, 2012.
- 5) Muayqil T, Gronseth G, Camicioli R. Evidence-based guideline: Diagnostic accuracy of CSF 14-3-3 protein in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: Report of the Guideline Development Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 79:1499-1506, 2012.
- 6) Schmidt C, Redyk K, Meissner B, et al. Clinical features of rapidly progressive Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 29:371-378, 2012.

7) Sorbi S, Hort J, Erkinjuntti T, et al. EFNS-ENS Guidelines on the diagnosis and management of disorders associated with dementia. *Eur J Neurol* 19:1159-1179, 2012.

8) Stoeck K, Sanchez-Juan P, Gawinecka J, et al. Cerebrospinal fluid biomarker supported diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease and rapid dementias: a longitudinal multicentre study over 10 years. *Brain* 135:3051-3061, 2012.

9) Wang LH, Bucelli RC, Patrick E, et al. Role of magnetic resonance imaging, cerebrospinal fluid, and electroencephalogram in diagnosis of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol*, in press.

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ishizaka S, Horie N, Satoh K, Fukuda Y, Nishida N, Nagata I. Intra-arterial cell transplantation provides timing-dependent cell distribution and functional recovery after stroke. *Stroke*, in press.
- 2) Sano K, Satoh K, Atarashi R, Takashima H, Iwasaki Y, Yoshida M, Sanjo N, Murai H, Mizusawa H, Schmitz M, Zerr I, Kim YS, Nishida N. Early detection of abnormal prion protein in genetic human prion diseases now possible using real-time QUIC Assay. *PLoS One* 8:e54915, 2013.
- 3) Ishibashi D, Atarashi R, Nishida N. Protective role of MyD88-independent innate immune responses against prion infection. *Prion* 6:443-446, 2012.
- 4) Nakato G, Hase K, Suzuki M, Kimura M, Ato M, Hanazato M, Tobiume M, Horiuchi M, Atarashi R, Nishida N, Watarai M, Imaoka K, Ohno H. Cutting Edge: Brucella abortus exploits a cellular prion protein on intestinal M cells as an invasive receptor. *J Immunol* 189:1540-1544, 2012.
- 5) Ishibashi D, Atarashi R, Fuse T, Nakagaki T, Yamaguchi N, Satoh K, Honda K, Nishida N. Protective role of interferon regulatory factor

3-mediated signaling against prion infection. *J Virol* 86:4947-4955, 2012.

6) Kubota T, Hamazoe Y, Hashiguchi S, Ishibashi D, Akasaka K, Nishida N, Katamine S, Sakaguchi S, Kuroki R, Nakashima T, Sugimura K. Direct evidence of generation and accumulation of β -sheet-rich prion protein in scrapie-infected neuroblastoma cells with human IgG1 antibody specific for β -form prion protein. *J Biol Chem* 287:14023-14039, 2012.

7) 佐藤克也, 新竜一郎, 西田教行. プリオン病における脳脊髄液の QUIC 診断. *Clinical Neuroscience* 30:1202-1204, 2012.

8) 新竜一郎, 西田教行. プリオン病診断法の開発. *最新医学* 67:32-36, 2012.

9) 西田教行ら. ポリオ. 平山謙二・感染症事典編集委員会・編 感染症事典, 株式会社オーム社, 東京, pp450-452, 2012.

2. 学会発表

1) Takatsuki H, Atarashi R, Sano K, Satoh K, Nishida N. Quantitation of seeding activity of human prion using real-time quaking induced conversion assay. Prion 2012, Amsterdam, May 9-12, 2012.

2) 佐藤克也, 新竜一郎, 調 漸, 佐野和憲, 高月英恵, 岩崎 靖, 北本哲之, 辻畑光宏, 六倉和男, 西田教行. 遺伝性プリオン病患者における髄液中のバイオマーカーの検討. 第 53 回日本神経学会学術大会, 東京, 5.22-25, 2012.

3) Homma T, Ishibashi D, Atarashi R, Nishida N. Increased expression of Sequestosome-1 in prion disease and its association with pathogenic prion protein. Asian Pacific Prion Symposium 2012, Yokohama, July 29-30, 2012.

4) Nishida N, Satoh K. Sensitivity and specificity of RT-QuIC. JPND research, Hanover, August 23-25, 2012.

5) 三條伸夫, 日熊麻耶, 北本哲之, 佐藤克也, 新竜一郎, 西田教行, 水澤英洋. 遺伝性プリオン病における病型と髄液所見. 第 17 回日本神経感染症学会総会学術集会, 京都, 10.19-20, 2012.

6) 佐藤克也, 新竜一郎, 西田教行. ヒトプリオン病患者における髄液中の生化学的バイオマーカーと異常プリオン蛋白の検出について. 第 17 回日本神経感染症学会総会学術集会, 京都, 10.19-20, 2012.

7) 高月英恵, 新竜一郎, 佐野和憲, 佐藤克也, 西田教行. RT-QUIC 法を用いたヒトプリオンサンプル中の Seeding Activity の測定. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 11.13-15, 2012.

8) 祖母井香織, 新竜一郎, 西田教行. プリオン蛋白の構造安定性に対する金属イオンの影響. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 11.13-15, 2012.

9) 祖母井香織, 新竜一郎, 西田教行. プリオン蛋白の構造安定性に対する金属イオンの影響. 第 85 回日本生化学会大会, 福岡, 12.14-15, 2012.

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

表1. 孤発性CJDのdefinite casesにおけるタイプ別の内訳 (92症例)

タイプ	症例
MM1	41
MV1	2
VV1	2
MM2-cortical	27
MM2-thalamic	1
MV2	8
VV2	11

表4. 14-3-3蛋白、総タウ蛋白、RT-QuIC法の感度・特異度

	14-3-3γ	総タウ蛋白	RT-QuIC
感度	90.2%	85.9%	82.6%
特異度	81.2%	86.8%	98.7%

表2. 非プリオン病患者の内訳 (240 症例)

アルツハイマー型認知症	200
前頭側頭型認知症	4
脳血管性認知症	4
橋本脳症	6
辺縁系脳炎	6
精神疾患	7
症候性けいれん	10
神経梅毒	3
MELAS	4
リンパ腫	2
大脳皮質基底核変性症	1
進行性多巣性白質脳症	1

表5. タイプ別における髄液中のバイオマーカーとRT-QuIC法の陽性率

	14-3-3蛋白	総タウ蛋白	RT-QuIC
MM1	90.2	85.4	82.9
MV1	100	100	100
VV1	50	0	0
MM2-cortical form	88.9	88.9	85.2
MM2-thalamic form	0	0	0
MV2	100	87.5	75
VV2	100	100	100

表3. 各検査の陽性率 (definite cases 92 症例)

14-3-3γ	総タウ蛋白	RT-QuIC	総数
+	+	+	68
+	-	+	4
-	+	+	0
+	+	-	9
-	+	-	2
+	-	-	2
-	-	+	3
-	-	-	4

表6. RT-QuIC法における偽陽性

性別	年齢	総タウ蛋白 (pg/ml)	14-3-3 protein WB method	14-3-3 protein ELISA	RT-QuIC assay	診断
男性	41	<40	-	1,520	+	神経梅毒
男性	67	700	-	1,650	+	症候性けいれん
男性	72	2,872	+	3,482	+	症候性けいれん

表7. 神経梅毒患者に対するRT-QuIC法の
検討結果

性別	年齢	t-tau protein (pg/ml)	14-3-3 protein WB method	14-3-3 protein ELISA	RT-QuIC assay
男性	41	<75	-	1,520	+
男性	64	201	-	625	-
女性	43	495	-	321	-
女性	65	87	-	430	-
男性	74	364	-	410	-
男性	71	156	-	760	-
男性	82	231	-	125	-
男性	69	330	-	582	-

表8. 症候性けいれん患者に対するRT-QuIC法の
検討結果

性別	年齢	総タウ蛋白 (pg/ml)	14-3-3 protein WB	14-3-3 protein ELISA	RT-QuIC assay
男性	81	3,364	+	889	-
女性	66	15,070	+	2,839	-
男性	62	7,120	+	864	-
男性	61	5,710	+	1,483	-
女性	58	333	+	783	-
女性	88	680	+	1,730	-
女性	76	4,820	+	862	-
男性	66	2,109	+	782	-
男性	67	700	-	1,650	+
男性	72	2,872	+	3,482	+

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業（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

MM1 型孤発性 Creutzfeldt-Jakob 病における 大脳皮質病変の進展と臨床経過との対応

研究分担者：岩崎 靖 愛知医科大学加齢医科学研究所
研究協力者：辰己新水 愛知医科大学加齢医科学研究所
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

研究要旨 MM1 型孤発性 Creutzfeldt-Jakob 病における大脳皮質病変について自験 28 例を用いて検討し、臨床症状との対比を試みた。大脳皮質病変の進展は、ステージ 1：海綿状変化、ステージ 2：肥胖性アストロサイトの増生、ステージ 3：neuropil の粗鬆化、ステージ 4：神経細胞脱落、ステージ 5：海綿状態(status spongiosus)、ステージ 6：大型の空洞形成、の 6 段階にステージ分類が可能であった。各症例の大脳新皮質ステージの平均と全経過および脳重には統計学的に有意な相関が認められた。発症時期や全経過、死亡時の臨床症状、脳重が不明な症例でも、大脳新皮質ステージからこれらの所見をある程度推定できると思われた。

A. 研究目的

孤発性 Creutzfeldt-Jakob 病 (CJD) では、大脳皮質は最も障害が強い部位であり、初期から海綿状変化やグリオシスが出現する¹⁾。経過と共に組織の粗鬆化や神経細胞脱落が進行するが、臨床症状と病変の進行との関連を多数例で検討した報告はみられない。また、一定のコンセンサスが得られた病変のステージ分類もない。そこで典型的な臨床病理所見を呈する MM1 型孤発性 CJD の大脳皮質病変を検討し、病変ステージングの提案および臨床症状との対比を試みた。

B. 研究方法

対象は愛知医科大学加齢医科学研究所において病理学的検索が施行された MM1 型孤発性 CJD 28 例 (男性/女性各 14 例) を用いた。発症年齢は 58～82 歳 (平均 68.4 歳)、全経過は 2～32 ヶ月 (平均 14.3 ヶ月)、脳重は 590～1520g (平均 974.1g) だった。神経病理学的には、大脳白質が保たれ脳萎縮が目立たない亜急性海綿状脳症が 12 例、高度の脳萎縮と大脳白質の広範な髄鞘淡明化を呈する全脳型が 16 例であった。

神経病理学的検索はホルマリン固定、パラフィン包埋した大脳の H-E 染色標本を観察して検

討した。検索部位は Parchi らの報告を参照し²⁾、大脳新皮質は前頭葉 (上前頭回と中前頭回)、側頭葉 (上側頭回と中側頭回)、頭頂葉 (下頭頂小葉)、後頭葉 (鳥距溝と外側後頭回) を観察し、海馬 (アンモン角) と辺縁系 (内嗅領皮質、島葉、帯状回) も追加検討した。各検索部位の (1) 海綿状変化、(2) グリオシス、(3) neuropil の粗鬆化、(4) 神経細胞脱落をそれぞれ、なし、軽度、中等度、高度の 4 段階 (0～3) で半定量した。これらの半定量結果を基に、病変のステージ分類を試みた。また各検索部位のステージを再度検討した。

臨床所見の検討は、各症例の (1) 頭部 MRI・拡散強調画像上の高信号の出現時期、(2) ミオクローヌスの出現時期、(3) 脳波上の周期性同期性放電の出現時期、(4) 無動性無言状態に至った時期、(5) 全経過について検討した。

大脳新皮質のステージと各臨床データとの対応について検討し、さらに大脳新皮質ステージの平均と全経過、脳重との相関については統計学的検討 (スピアマン順位相関係数検定) を行った。

(倫理面への配慮)

本検討は臨床データの後方視的解析と組織

標本の病理学的観察であり、介入研究ではない。各臨床データ、病理組織は症例番号で管理し、患者の特定はできないよう配慮した。また解析データに生年月日等の個人を特定できるデータは含まれていない。

C. 研究結果

各症例の病理学的所見のまとめは表 1 に示した。海綿状変化は観察した大脳皮質においては必ず認められ、グリオシスが出現するのは海綿状変化の出現よりも後であった。また組織 (neuropil) の粗鬆化がみられるのはグリオシスが出現した後であり、神経細胞脱落がみられるのは組織の粗鬆化が進行した後であった。これらの結果をもとに以下の 6 段階の皮質病変のステージ分類を試みた。

ステージ 1: 軽度の海綿状変化を認める (図 1a)。グリオシスはみられないか軽度で、肥性アストロサイトはみられない。Neuropil の粗鬆化や神経細胞脱落はまだない。

ステージ 2: 海綿状変化とグリオシスが目立つ (図 1b)。ステージ 1 との主な違いは肥性アストロサイトの増生が目立つことである。Neuropil の粗鬆化はまだないか軽度で、神経細胞脱落はまだない。

ステージ 3: Neuropil の粗鬆化により空胞はやや不明瞭となり、肥性アストロサイトの増生が著明である (図 1c)。ステージ 2 との主な違いは neuropil の粗鬆化が目立つことと、神経細胞脱落がみられることである。残存する神経細胞の一部は inflated neuron の像を示す。

ステージ 4: 肥性アストロサイトの増生と neuropil の粗鬆化が高度となり、空胞は不明瞭となる (図 1d)。ステージ 3 との主な違いは神経細胞脱落が目立つことである。この段階でみられる海綿状変性はステージ 1 と 2 でみられる境界明瞭な空胞とは異なり、組織の粗鬆化によるものである。

ステージ 5: Neuropil は高度に粗鬆化し、多数の肥性アストロサイトに加えて、線維性グリオシス、マクロファージがみられる (図 1e)。神経細胞は高度に脱落し、海綿状態 (Status spongiosus) と呼ばれる状態である。

ステージ 6: 特徴的な大型の空洞が形成される (図 1f)。肥性アストロサイトは減少し、空洞

内にはマクロファージがみられる。空洞は皮質深層から形成され、分子層は残る傾向がある。

各症例の大脳皮質ステージを各検討部位で再検討し、大脳新皮質については前頭葉、側頭葉、頭頂葉、後頭葉の平均を算出した (表 2)。各症例の大脳新皮質ステージの平均と全経過には統計学的に有意な正の相関が認められた ($r_s = 0.93, P < 0.0001$) (図 2)。大脳新皮質ステージの平均 (y) と全経過月 (x) の近似式は $y = 0.1461x + 1.7738$ となった。この近似式に当てはめると CJD 発症時の大脳新皮質ステージは 1.8 であり、ステージ 2 に至る時期は発症後 1.5 ヶ月、ステージ 4 に至る時期は発症後 15.2 ヶ月、ステージ 6 に至る時期は発症後 28.9 ヶ月となった。大脳新皮質ステージから全経過を、逆に全経過から大脳新皮質ステージをある程度推定できると考えられた。

各症例の大脳新皮質ステージの平均と脳重には統計学的に有意な負の相関が認められた ($r_s = -0.76, P < 0.0005$)。大脳新皮質ステージの平均 (y) と脳重 (x) の近似式は $y = -0.0059x + 9.5933$ となった。この近似式に当てはめると、脳重が 1000g に至る時期はステージ 3.7 で、発症後 13.2 ヶ月となった。大脳新皮質ステージから脳重を、逆に脳重から大脳新皮質ステージをある程度推定できると考えられた。

各臨床所見の初回観察時期 (発症からの経過月) を表 3 に示した。MRI 拡散強調画像の高信号域が最初に認められる時期は発症後平均 1.7 ヶ月であり、近似式に当てはめるとこの時期の大脳新皮質ステージは 2.0 となった。ミオクローヌスと周期性同期性放電が最初に認められる時期はいずれも発症後平均 2.1 ヶ月であり、近似式に当てはめるとこの時期の大脳新皮質ステージは 2.1 だった。無動性無言状態に至った時期は発症後平均 3.0 ヶ月であり、近似式に当てはめるとこの時期の大脳新皮質ステージは 2.2 であった。大脳新皮質ステージから死亡時の臨床所見を、逆に死亡時の臨床所見から大脳新皮質ステージをある程度推定できると考えられた。

大脳新皮質ステージと臨床所見、神経病理所見の対応については表 4 に示した。亜急性海綿状脳症症例の全経過は 2~13 ヶ月、全脳型症例の全経過は 11~32 ヶ月であった。我々は亜急