

性海綿状脳症が長期経過により全脳型に移行することを以前に指摘しており³⁾、発症後 12 ヶ月頃に亜急性海綿状脳症から全脳型に移行すると考えられた。近似式に当てはめると発症 12 ヶ月の大脳新皮質ステージは 3.5 であり、ステージ 3 から 4 に移る時期、すなわち神経細胞脱落や組織の粗鬆化が進行し、皮質の層構造が不明瞭になる時期に全脳型に至ると推定された。また臨床的には MRI・拡散強調画像の高信号やミオクロースス、脳波上の周期性同期性放電が消失し、無動性無言に至る時期に全脳型に移行すると推定された。

D. 考察

抗プリオン蛋白免疫染色の染色性はホルマリン固定期間や濃度、ギ酸処理の有無や処理時間、前処置の塩酸濃度、一次抗体の種類や製造元等による影響が大きく、各症例間での比較が難しいと考えられる。今回提案した大脳皮質ステージは H-E 染色のみで判定可能であり、有用性が期待される。ステージ 1 と 2 を軽度(mild)、ステージ 3 と 4 を中等度(moderate)、ステージ 5 と 6 を高度(severe)と判定するのも簡便で、有用と思われる。

基本的に、このステージは大脳皮質以外の灰白質(基底核、視床、小脳、脳幹、脊髄)にも応用できると考えられる。また MM1 型以外のタイプ(MM2 型、MV1 型、MV2 型、VV1 型、VV2 型)にもこのステージは応用できると考えている。

E. 結論

H-E 染色のみで判定可能な 6 段階の大脳皮質病変のステージを提案した。大脳新皮質のステージから発症時期や全経過、死亡時の臨床所見、脳重をある程度推定可能であると思われた。

[参考文献]

- 1) Iwasaki Y, Yoshida M, Hashizume Y, et al. Clinicopathologic characteristics of sporadic Japanese Creutzfeldt-Jakob disease classified according to prion protein gene polymorphism and prion protein type. *Acta Neuropathol* 112:561-571, 2006.
- 2) Parchi P, Giese A, Capellari S, et al.

Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann Neurol* 46:224-233, 1999.

- 3) 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* 18:999-1002, 2011.

F. 健康危険情報

本研究は CJD 剖検症例の臨床データおよび病理標本を用いた検討であり、健康危険に関する情報は無い。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iwasaki Y, Yokoi F, Tatsumi S, Mimuro M, Iwai K, Kitamoto T, Yoshida M. An autopsied case of Creutzfeldt-Jakob disease with mutation in the prion protein gene codon 232 and type 1+2 prion protein. *Neuropathology*, in press.
- 2) Iwasaki Y. Three cases of Creutzfeldt-Jakob disease with prion protein gene codon180 mutation presenting with pathological laughing and crying. *J Neurol Sci* 319:47-50, 2012.
- 3) 岩崎 靖, 森 恵子, 伊藤益美. 無動性無言状態にいたったプリオン病患者の臨床経過と治療に関する検討. *臨床神経* 52:314-319, 2012.
- 4) 岩崎 靖. 孤発性 Creutzfeldt-Jakob 病. *病理と臨床* 30:315-319, 2012.
- 5) 岩崎 靖. クロイツフェルト・ヤコブ病. *Journal of Integrated Medicine* 22:389-390, 2012.

2. 学会発表

- 1) 岩崎 靖, 森 恵子, 伊藤益美, 三室マヤ, 吉田眞理. プリオン病の終末期治療と剖検について. 第 53 回日本神経学会学術大会, 東京, 5.23-25, 2012.
- 2) 岩崎 靖, 辰己新水, 三室マヤ, 吉田眞理. 孤発性 Creutzfeldt-Jakob 病の大脳皮質病変の進展に関する検討. 第 53 回日本神経病理学会総会, 新潟, 6.28-30, 2012.
- 3) 岩崎 靖, 森 恵子, 伊藤益美, 辰己新水, 三室マヤ, 吉田眞理. 大脳白質のびまん性髄鞘

淡明化を呈した全経過 12 ヶ月の MM1 型孤発性 Creutzfeldt-Jakob 病の 1 剖検例. 第 53 回日本神経病理学会総会, 新潟, 6.28-30, 2012.

4) 岩崎 靖, 横井風児, 辰己新水, 三室マヤ, 吉田眞理. 緩徐進行性の認知機能障害を呈し、1+2 型プリオン蛋白を認めた M232R 変異 Creutzfeldt-Jakob 病の 1 剖検例. 第 53 回日本神経病理学会総会, 新潟, 6.28-30, 2012.

5) Iwasaki Y, Yoshida M. Three cases of Creutzfeldt-Jakob disease with prion protein gene codon180 mutation presenting with pathological laughing and crying. Asian Pacific Prion Symposium 2012, Yokohama, July 29-30, 2012.

6) 岩崎 靖, 辰己新水, 三室マヤ, 吉田眞理. 当施設におけるプリオン病剖検例の検討. 第 17 回日本神経感染症学会総会, 京都, 10.19, 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 各症例の病理学的所見(海綿状変化、グリオーシス、組織の粗鬆化、神経細胞脱落)の検討

症例番号	性別	発症年齢	死亡年齢	全経過(月)	前頭葉 (上前頭回、中前頭回)			側頭葉 (上側頭回、中側頭回)			頭頂葉 (下頭頂小葉)			後頭葉 (烏距溝、外側後頭回)			海馬 (アンモン角)			辺縁系(内嗅皮質、 烏葉、帯状回)			脳重(g)	病理学的分類						
					海綿状変化	グリオーシス	組織の粗鬆化	神経細胞脱落	海綿状変化	グリオーシス	組織の粗鬆化	神経細胞脱落	海綿状変化	グリオーシス	組織の粗鬆化	神経細胞脱落	海綿状変化	グリオーシス	組織の粗鬆化	神経細胞脱落	海綿状変化	グリオーシス			組織の粗鬆化	神経細胞脱落	海綿状変化	グリオーシス	組織の粗鬆化	神経細胞脱落
1	男	82	82	2	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1240	SSE
2	男	76	76	2	1	2	0	0	1	2	0	0	1	2	0	0	1	2	0	0	1	0	0	0	1	2	1	0	1100	SSE
3	女	74	74	2	1	0	0	0	1	2	0	0	1	1	0	0	1	2	0	0	1	0	0	0	1	2	0	0	1040	SSE
4	男	64	64	3	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1210	SSE
5	男	59	59	3	1	1	0	0	1	1	0	0	2	2	1	0	1	2	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1520	SSE
6	男	68	68	4	1	2	0	0	1	2	0	0	2	2	1	0	2	2	1	0	1	0	0	0	1	2	1	0	1370	SSE
7	女	60	60	4	1	1	0	0	1	2	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1200	SSE
8	女	68	68	4	2	2	1	0	2	2	1	0	2	1	0	0	2	2	2	0	1	0	0	0	2	2	1	0	1080	SSE
9	男	64	64	5	1	2	0	0	2	2	1	0	2	2	1	0	2	2	1	0	1	0	0	0	2	2	1	0	1255	SSE
10	女	82	83	5	2	2	1	0	2	2	1	1	2	2	2	1	2	2	2	1	1	0	0	0	2	2	1	0	1110	SSE
11	女	80	81	5	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2	1	1	2	1	1	1	1	0	0	0	2	2	1	0	940	SSE
12	女	64	65	11	3	3	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1	1	0	0	2	2	1	0	840	全脳型
13	女	74	75	12	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1	0	0	0	3	3	2	2	885	全脳型
14	男	69	70	13	2	2	1	1	2	3	2	2	2	3	2	2	2	3	2	2	1	0	0	0	2	3	2	2	1270	SSE
15	女	65	68	13	3	3	2	2	3	3	2	2	3	3	2	2	3	3	2	2	1	0	0	0	2	2	2	1	710	全脳型
16	女	58	59	14	3	3	2	2	3	3	3	3	3	3	2	2	3	3	3	3	1	0	0	0	2	2	1	1	840	全脳型
17	女	63	64	16	3	3	2	2	3	3	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	1	0	0	0	3	3	3	3	820	全脳型
18	女	61	62	18	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1	0	0	0	3	3	3	3	710	全脳型
19	男	65	67	20	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1	2	0	0	3	3	3	3	700	全脳型
20	男	58	60	23	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1	2	0	0	3	3	2	2	1050	全脳型
21	男	74	76	24	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1	0	0	0	3	3	2	2	995	全脳型
22	女	70	72	24	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1	0	0	0	3	3	3	3	770	全脳型
23	女	70	72	24	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1	0	0	0	3	3	2	2	740	全脳型
24	男	78	81	27	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1	1	0	0	3	3	2	2	880	全脳型
25	男	69	71	30	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1	2	0	0	3	3	3	3	860	全脳型
26	女	62	65	30	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2	1	0	3	3	3	3	590	全脳型
27	男	72	74	31	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1	0	0	0	3	3	2	2	730	全脳型
28	男	67	69	32	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1	0	0	0	3	3	2	2	820	全脳型

SSE: 亜急性性海綿状脳症

表2 各症例の大脳皮質ステージ

症例番号	病理所見							
	前頭葉 (上前頭回、 中前頭回)	側頭葉 (上側頭回、 中側頭回)	頭頂葉 (下頭頂 小葉)	後頭葉 (烏距溝、 外側後 頭回)	新皮質ステージ の平均	海馬 (アンモン角)	辺縁系 (内嗅皮質、 烏葉、帯状回)	
1	1	1	1	1	1	1	1	
2	2	2	2	2	2	1	2	
3	1	2	1	2	1.5	1	2	
4	1	1	1	1	1	1	1	
5	1	1	2	2	1.5	1	2	
6	2	2	2	2	2	1	2	
7	1	3	2	2	2	1	2	
8	2	2	2	3	2.25	1	2	
9	2	2	2	2	2	1	2	
10	2	3	3	3	2.75	1	2	
11	3	3	3	3	3	1	2	
12	4	5	5	5	4.75	1	3	
13	5	5	4	5	4.75	1	4	
14	3	4	4	4	3.75	1	3	
15	4	4	4	4	4	1	3	
16	4	5	4	5	4.5	1	3	
17	4	4	5	5	4.5	1	5	
18	6	6	6	6	6	1	5	
19	5	5	5	6	5.25	2	5	
20	5	5	6	5	5.25	2	5	
21	5	5	5	5	5	1	4	
22	5	6	6	6	5.75	1	5	
23	5	5	6	6	5.5	1	4	
24	5	5	6	6	5.5	1	4	
25	6	5	6	6	5.75	2	5	
26	5	5	6	6	5.5	2	5	
27	5	5	6	6	5.5	1	4	
28	5	5	5	6	5.25	1	4	

表3 各症例の臨床所見

症例番号	各臨床症状の初回観察時期 (発症からの経過月)			
	MRI拡散強調画像の高信号	ミオクローヌス	周期性同期性放電	無動性無言状態
1	N.E.	0.5	1	2
2	0.5	1	1	1
3	N.E.	2	-	2
4	1	2	2	3
5	N.E.	2	2	2.5
6	N.E.	2	2	2
7	N.E.	2	1	3
8	N.E.	3	3.5	4
9	1	2	1	2
10	N.E.	2.5	0.75	2
11	1.5	1	1	2
12	1	2	2	2
13	0.75	0.5	1	2
14	7	6	7	8
15	1	2	1	2
16	N.E.	2	2	2
17	N.E.	1.75	2.75	3
18	N.E.	1.75	1	3
19	N.E.	2.5	4	4
20	N.E.	3	3.5	4
21	N.E.	2	3	4
22	N.E.	2	2	2
23	1	1	1	3
24	3	3.5	3.5	4
25	1.5	1.5	1	3
26	2	3	3	4
27	1	1	1	3
28	N.E.	2	2	5
最小	0.5	0.5	0.75	1
最大	7	6	7	8
平均	1.7	2.1	2.1	3.0
標準偏差	1.7	1.1	1.4	1.4

N.E.: not examined

表4 大脳新皮質ステージと臨床症状、神経病理所見の対応

新皮質ステージ	対応する臨床所見					おおよその臨床経過(月)	対応する病理所見					病理解剖的分類	おおよその脳重(g)
	MRI拡散強調画像の高信号	ミオクローヌス	脳波上の周期性同期性放電	無動性無言状態	(*)近似式から求めた経過		海綿状変性	グリオシス	細胞の粗悪化	神経細胞脱層	Inflated neuron		
1	+	- or +	- or +	-	< 2 (-3.3)	軽度	なし~軽度 (肥胖性アストロサイトの増生なし)	なし	なし	なし	保持	SSE	>1200 (1456)
2	+	+	+	-	2-5 (1.5)	中等度	軽度 (肥胖性アストロサイトの増生)	なし~軽度	なし	なし	保持	SSE	1200 (1287)
3	+	+	+	-	5-12 (8.4)	中等度	中等度	軽度	軽度	軽度~中等度	保持	SSE	1100 (1118)
4	+ or -	+ or -	+ or -	+	12-20 (15.2)	高度	高度	中等度	中等度	中等度	不明瞭	全脳型	1900 (948)
5	-	-	-	+	> 20 (22.1)	高度 (海綿状)	高度	高度	高度	減少	消失	全脳型	<1000 (779)
6	-	-	-	+	> 20 (28.9)	高度 (大型の空胞形成)	高度	高度	完全に消失	消失	消失	全脳型	<800 (609)

SSE: 急性性海綿状脳症

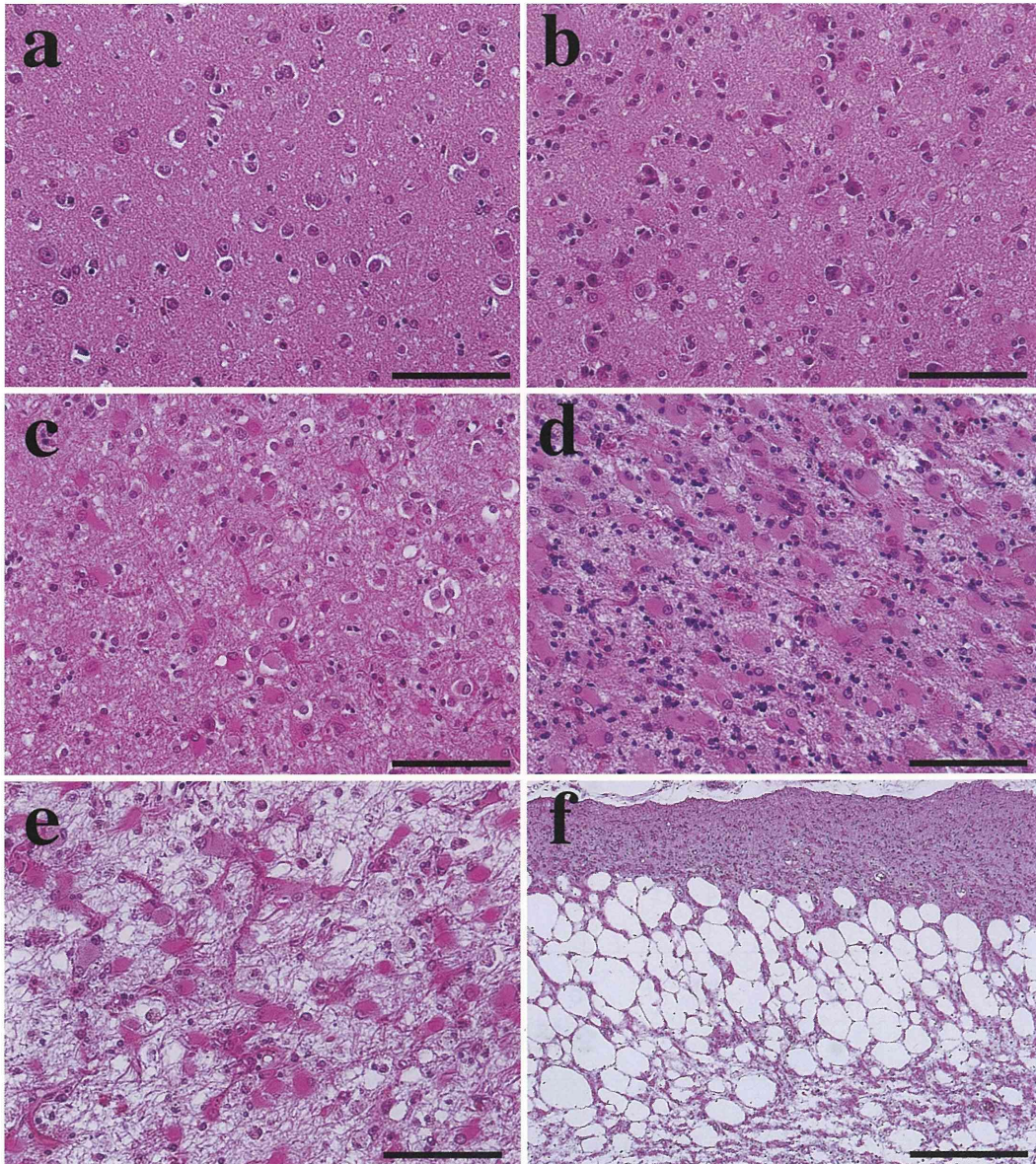


図 1 各大脳皮質ステージの病理像（ヘマトキシリン・エオジン染色、a-e: 20 倍（スケールバー; 100 μ m）、f: 4 倍（スケールバー; 500 μ m））

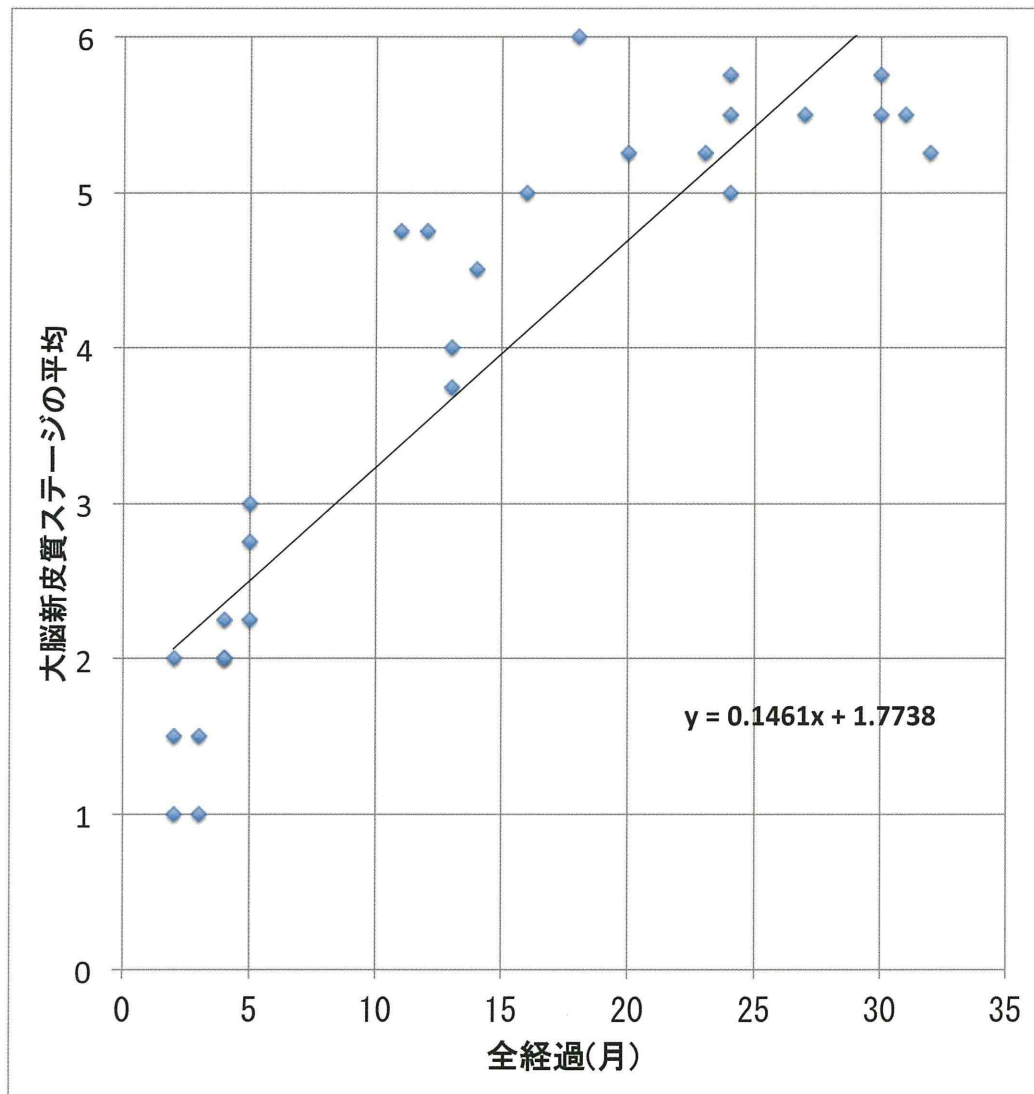


図 2 各症例の大脳新皮質ステージの平均と全経過の関連

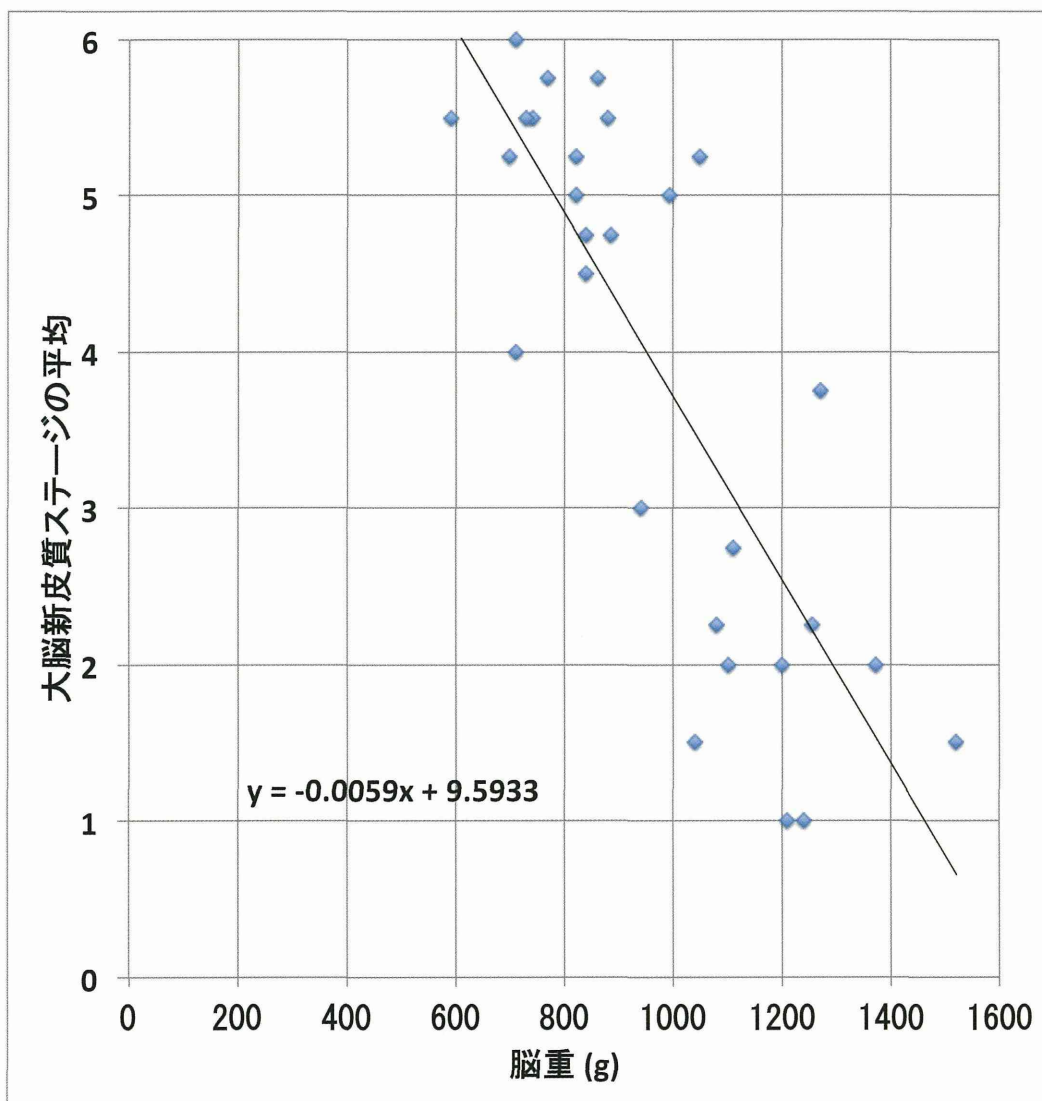


図3 各症例の大脳新皮質ステージの平均と脳重の関連

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

1. Gerstmann-Sträussler-Scheinker 病 A117V 変異例における検討

2. 平成 24 年美原記念病院におけるプリオン病剖検報告

研究分担者：高尾昌樹	東京都健康長寿医療センター
研究協力者：Bernardino Ghetti	Indiana Alzheimer Disease Center
研究協力者：Salvatore Spina	Indiana Alzheimer Disease Center
研究協力者：Jill R. Murrell	Indiana Alzheimer Disease Center
研究協力者：Francine Epperson	Indiana Alzheimer Disease Center
研究協力者：Bradley S. Glazier	Indiana Alzheimer Disease Center
研究協力者：Martin R. Farlow	Indiana Alzheimer Disease Center
研究協力者：Frederick W. Unverzagt	Indiana Alzheimer Disease Center
研究協力者：Andrew J. Saykin	Indiana Alzheimer Disease Center
研究協力者：Karmen K. Yoder	Indiana Alzheimer Disease Center
研究協力者：Shannon L. Risacher	Indiana Alzheimer Disease Center
研究協力者：Vladimir Kepe	David Geffen, School of Medicine UCLA
研究協力者：Jorge R. Barrio	David Geffen, School of Medicine UCLA
研究協力者：吉田洋二	公益財団法人脳血管研究所美原記念病院神経難病認知症部門
研究協力者：美原 盤	公益財団法人脳血管研究所美原記念病院神経内科
研究協力者：木村浩晃	公益財団法人脳血管研究所美原記念病院神経内科
研究協力者：尾方克久	独立行政法人国立病院機構東埼玉病院神経内科
研究協力者：伊藤慎治	東京都健康長寿医療センター
研究協力者：内野彰子	東京都健康長寿医療センター
研究協力者：野上 茜	東京都健康長寿医療センター
研究協力者：隅蔵大幸	東京都健康長寿医療センター
研究協力者：初田裕幸	東京都健康長寿医療センター
研究協力者：村山繁雄	東京都健康長寿医療センター
研究協力者：北本哲之	東北大学大学院医学研究科病態神経学分野

研究要旨

1. 目的：Gerstmann-Sträussler-Scheinker 病 A117V 変異は、現在までに少なくとも 7 家系が報告されている。我々が検討してきた家系の中で、特に 4 症例に関して新たなる知見を得たので、その神経病理所見を中心に報告する。方法：一般組織学的検索に加え、免疫染色を大切片を含み施行した。結果：臨床的に、構音障害、失調、錐体外路徴候、認知症を呈した。神経病理学的には、前頭葉、側頭葉、海馬傍回、基底核に 3F4 陽性のアミロイド斑を多数認めた。神経細胞脱落は軽度から中等度であった。大脳皮質、皮質直下白質、基底核の神経線維に沿って全例に 3F4 陽性沈着を認めた。この構造は thioflavin-S による蛍光所見を呈さなかった。髄鞘染色では深部白質の淡明化を認めた。考察：神経線維に沿った 3F4 陽性沈着は、GSSA117V において指摘されていない所見であり今後の検討を要する。
2. 目的：美原記念病院はプリオン病外部症例の剖検を受け入れていることから、昨年 of 班会議の抄録提出後に施行した剖検例を報告する。結果：平成 24 年から平成 25 年 1 月 21 日現在班会議までに 9 例の剖検を施行した。美原記念病院に入院中死亡したプリオン病 5 例の、全例で剖検が施行

された。3例は PRNP 遺伝子に変異のない弧発性 CJD, 1例は M232R 変異 CJD, 1例は GSS P102L 症例であった。他病院から搬送し剖検を施行した症例が 4 例。3例は同一病院からで片道約 100km, 他の 1例は片道 300km で当院の車両で搬送した。同一病院からの 3例のうち, 2例は弧発性 CJD, 1例は M232R 変異を有する症例であった。遠方からの症例は, 昭和 58 年に硬膜移植を施行された CJD 症例で, 家族からの剖検希望が強かった。考察: プリオン病の剖検は一定数あること, 美原記念病院は, 関東におけるプリオン病剖検が可能な 1 施設として機能していることから, 今後, 何らかの拠点施設の整備が必要である。美原記念病院でのプリオン病剖検率は 100% であり, 全身剖検も施行する場合もあることから, プリオン病剖検後の遺族や関係者へのご遺体に対する医学的注意事項も含め, 専属のスタッフが対応する方針とした。

A. 研究目的

1. Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease (GSS) は常染色体優性遺伝性の疾患で, PRNP 遺伝子変異により発症する¹⁾。臨床的に, 小脳失調, 錐体路徴候, 錐体外路徴候, 認知機能障害を様々な程度に認めることが一般的である。中でも, GSSA117V は, フランスで報告されて以来, イギリス, アイルランド, ハンガリー, 米国で報告がされている。本邦での報告はまだない。

GSS の神経病理学的所見は, 遺伝子変異による表現形が多彩であるが, GSSA117V は telencephalic variant とも言われ, 大脳皮質を中心に, プリオン蛋白陽性のアミロイド斑が沈着することが特徴である。今回, GSSA117V の一家系における神経病理所見の新しい所見を報告する。

2. 本邦において, プリオン病の患者の診療拒否, 入院拒否や剖検困難な施設の存在は, 今後解決されなければならない問題である。研究分担者(高尾)の研究協力機関である, 公益財団法人脳血管研究所美原記念病院(美原記念病院)において, プリオン病の剖検を施行しており, 特に他施設からの剖検依頼を引き受ける数少ない施設である。平成 24 年における, 同院での剖検実績も併せて報告する。

B. 研究方法

1. GSS A117V 家系において, 特に神経病理学的検索を統一して施行できた 4 例に関して, 通常のスクリーニング部位の組織学的検索に加え, 半球を冠状断でスライスした 10 ミクロン厚の切片をヘマトキシリンエオジン染色に加え(HE), 免疫染色として glial fibrillary acidic protein (GFAP), プリオン蛋白(3F4)を施行。

2. 美原記念病院における, 平成 24 年度のプリオン病剖検例を総括した。

(倫理面への配慮)

1. 研究分担者(高尾)の共同研究者が主催するインディアナ大学アルツハイマー病センターの, Institutional Review Board of Indiana University Indianapolis において承認され, 症例の家族よりインフォームドコンセントが得られている。

2. 美原記念病院倫理委員会において, 剖検, 研究同意が得られており, 各症例の家族よりインフォームドコンセントが得られている。

C. 研究結果

1. 一般的な神経病理所見に関しては, 既に報告している。神経細胞脱落, グリオシスは大脳皮質においては概して軽度で, 顕著な海綿状変性などは認めなかった。大脳皮質には, 3F4 免疫染色陽性のアミロイド形成を有するプラークを認めた。プラークは, 小さいアミロイドコアが集簇したものの周囲に, 3F4 陽性のびまん性沈着からなるもの, あるいはびまん性の沈着だけからなるもの, アミロイドコアの集簇だけからなるものなど様々であった。分布としては, 大脳皮質だけでなく, 大脳基底核にも認めるが, 総じて GSS P102L のように, 数多く, 広範な PrP 沈着を認めることはなかった。また, 小脳や脳幹における PrP 沈着の程度は, 軽かった。我々は, GSSA117V において, 特に海馬支脚を中心に形態的に特殊な PrP 沈着を認めることを, 既に報告している。これは, 遺伝性アルツハイマー病の中で, PSEN1 遺伝子変異に伴う一部の症例に認められる cotton wool plaque に

形態的に類似しているが、A β 免疫染色では陰性である。

最も特筆すべき所見は、大脳皮質から皮質下白質において、神経線維に沿って PrP 沈着所見を認めたことである²⁾。この所見は、特に前頭葉、帯状回、側頭葉などで顕著で、そういった部位では PrP 陽性のプラークも多かった(図1)。これらの PrP 陽性所見は、垂直方向あるいは水平方向に走行する神経線維に沿って認めた。しかし、神経線維自体の腫大(軸索腫大を含む)は明らかではなかった。thioflavin-S では、これら PrP 陽性神経線維は蛍光所見を認めなかった。

2. 平成 24 年 1 月から平成 25 年 1 月 21 日現在班会議までに 9 例の剖検を施行した(図2, 表)。美原記念病院に入院中死亡したプリオン病 5 例、全例で剖検が施行された。3 例は PRNP 遺伝子に変異のない弧発性 CJD, 1 例は M232R 変異 CJD, 1 例は GSS P102L 症例であった。他病院から搬送し剖検を施行した症例が 4 例あった。3 例は同一病院からで片道約 100km, 他の 1 例は片道 300km で当院の車両で搬送した。同一病院からの 3 例のうち、2 例は弧発性 CJD(1 例は検索中), 1 例は M232R 変異を有する症例であった。遠方からの症例は、昭和 58 年に硬膜移植を施行された CJD 症例で、家族からの剖検希望が強かった。

補遺：原則として頭部限定の剖検であり、脊髄採取が困難な症例が多い。以前、新潟大学で開発された、大後頭孔経由の脊髄採取器の使用を、4 例に試みた。1 例は頸椎変形が強く数 cm しか採取できなかったが、もう 1 例は胸髄中央部まで到達できた。また、全身剖検になる症例も増加している。

D. 考察

1. 遺伝性プリオン病において、本研究のような神経線維に沿った PrP 沈着の報告は、我々の検索し得た範囲ではない。また、本邦に多い GSSP102L において、類似の所見を現段階では認めていない。GSS は弧発性プリオン病とは、病態も異なるものであるが、本結果は、プリオン病における神経系内の propagation を検討する上で、重要な所見と考えられる。現在、他の検査結果などもふまえ、本家系の詳細な報告の

発刊準備中である。

2. プリオン病の剖検は、依然として困難な状況である、施設によっては、剖検だけではなく、入院診療まで不可能である場合も少なくない。本邦におけるこういった状況を打開する一助として、美原記念病院ではプリオン病の入院診療に加え、特に、関東中心に剖検が不可能な施設からの剖検依頼を引き受けている。硬膜移植例は、家族からの希望も強かったこと、入院先の施設では剖検が困難であり、東日本大震災のため、一時的に避難していた病院の神経内科医より本研究分担者へ死亡時の剖検可能性の打診がされていた。その後、もとの病院に戻った後死亡され、剖検依頼があり、福島県まで送迎を行い剖検を施行した。今後、日本における、プリオン病の剖検拠点を整備し、地域ごとの拠点施設で剖検が公費で施行できるようにすることは、医学研究だけでなく、公衆衛生的見地からも重要である。

E. 結論

1. 神経線維に沿った 3F4 陽性沈着は、GSSA117V において指摘されていない所見であると同時に、重要な所見と考える。

2. プリオン病の剖検は一定数あること、美原記念病院は、関東におけるプリオン病剖検が可能な 1 施設として機能している。同院でのプリオン病剖検率は 100% であり、全身剖検になることもあることから、プリオン病剖検後の遺族や関係者へのご遺体に対する医学的注意事項も含め、専属のスタッフが対応する方針とした。

(謝辞)

症例のご紹介をくださいました、独立行政法人国立病院機構いわき病院 関晴朗院長、独立行政法人国立病院機構水戸医療センター神経内科 吉沢和朗先生に深謝いたします。

[参考文献]

- 1) Ghetti B, Tagliavini F, Takao M, Bugiani O, Piccardo P. Hereditary prion protein amyloidosis. *Clin Lab Med* 23:65-85, 2003.
- 2) Takao M, Spina S, Murrell J, Epperson F,

Glazier B, Farlow M, Unverzagt F, Saykin S, Yoder K, Risacher S, Kepe V, Barrio J. New observations in Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease associated with the PRNP A117V mutation. *J Neuropathol Exp Neurol* 71:555, 2012.

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Funabe S, Takao M, Saito Y, Hatsuta H, Sugiyama M, Ito S, Kanemaru K, Sawabe M, Arai T, Mochizuki H, Hattori N, Murayama S. Neuropathologic analysis of Lewy-related α -synucleinopathy in olfactory mucosa. *Neruopathology*, in press.
- 2) Mochizuki Y, Isozaki E, Takao M, Hashimoto T, Shibuya M, Arai M, Hosokawa M, Kawata A, Oyanagi K, Mihara B, Mizutani T. Familial ALS with FUS P525L mutation: two Japanese sisters with multiple systems involvement. *J Neurol Sci* 323:85-92, 2012.
- 3) 高尾昌樹. 軽度認知障害の神経病理学. *臨床神経* 52:851-854, 2012.
- 4) 高尾昌樹, 村山繁雄, 美原 盤, 吉田洋二. バイオバンク構築における病理の役割. *ブレインバンクの現状, 高齢者ブレインバンク, 美原記念病院ブレインバンクの経験から. 病理と臨床* 30:635-645, 2012.
- 5) 高尾昌樹. 精神疾患における神経病理学的検索の重要性. *臨床精神医学* 41:897-905, 2012.

2. 学会発表

- 1) Takao M, Spina S, Murrell J, Epperson F, Glazier B, Farlow M, Unverzagt F, Saykin S, Yoder K, Risacher S, Kepe V, Barrio J. New observations in Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease associated with the PRNP A117V mutation. The 88th Annual meeting of the American Association of Neuropathologists, Inc., Chicago, June 21-24, 2012.

- 2) Takao M, Takada M, Ogata K, Suzuki M, Yoshida Y, Mihara B, Ito S, Nogami A, Funabe S, Hatsuta H, Kawai M, Murayama S, Haga T, Kitamoto T. Abundant tau accumulation in Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease associated with the PRNP P102L-129M mutation. The 88th Annual meeting of the American Association of Neuropathologists, Inc., Chicago, June 21-24, 2012.

- 3) 高尾昌樹. 病理医に必要な神経病理学. 第 101 回日本病理学会総会, 東京, 2012.4.26.
- 4) 高尾昌樹. 軽度認知障害の神経病理. 第 53 回日本神経学会総会, 東京, 5.22-25, 2012.
- 5) 高尾昌樹. 軽度認知障害の背景にある神経病理所見とは. 第 3 回日本血管性認知障害研究会, 東京, 9.8, 2012.
- 6) 高尾昌樹. シンポジウム II 「進行性失語」神経病理基盤に関する今日的理解. 第 36 回日本高次機能障害学会学術総会, 宇都宮, 11.23, 2012.
- 7) 高田真利子, 高尾昌樹, 尾方克久, 鈴木幹也, 吉田洋二, 美原 盤, 伊藤慎治, 野上 茜, 舟辺 さやか, 初田裕幸, 川井 充, 村山繁雄, 芳賀孝之, 北本哲之. Gerstmann-Sträussler-Scheinker 病 (P102L, 129M) - プラーク周囲に多数のタウ病変を認めた 1 剖検例 -. 第 53 回日本神経病理学期総会学術研究会, 新潟, 6.28-30, 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

図 1. GSSA117V 症例の前頭葉皮質における、プリオン免疫染色 (3F4 抗体). プラークに加え、神経線維に沿った陽性沈着を認める.

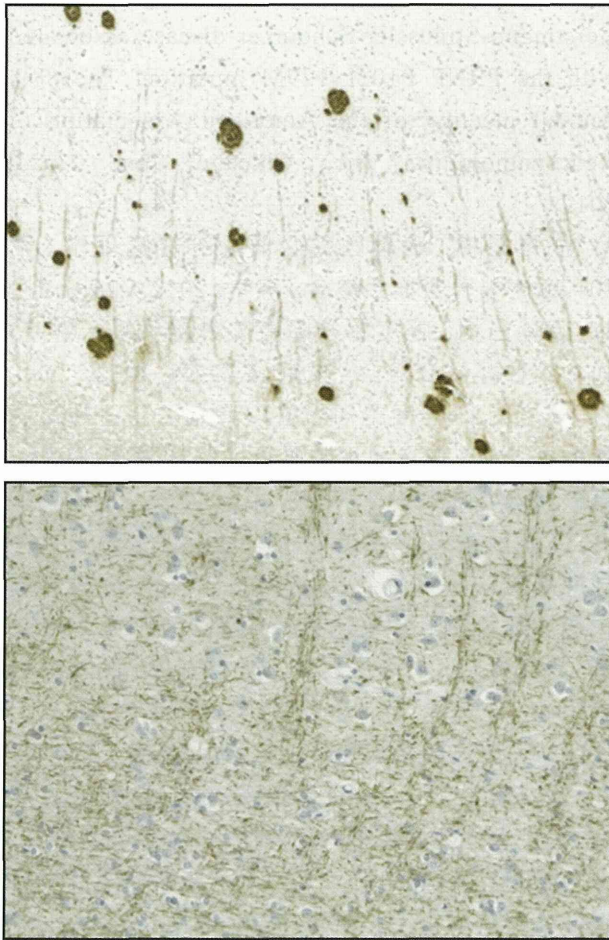


表. 平成 24 年 1 月から平成 25 年 1 月 21 日 (班会議までに施行した剖検の内訳)

死亡年齢	性	PRNP変異	codon 129	codon 219	その他
57	F	M232R	Met/Met	Glu/Glu	他院より移送し剖検
69	F	None	Met/Met	Glu/Glu	他院より移送し剖検
71	M	M232R	Met/Met	Glu/Glu	
82	F	None	Met/Met	Glu/Glu	他院より移送し剖検
59	F	None	Met/Met	Glu/Glu	
65	F	None	Met/Met	Glu/Glu	
59	M	P102L	Met/Met	Glu/Glu	
80	M	None	Met/Met	Glu/Glu	
72	F	検査準備中			他院より移送し剖検

図 2. プリオン病剖検率向上を目指した、群馬県伊勢崎市美原記念病院の取り組み



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

プリオン立体構造変換原理の解明とその制御

研究分担者：桑田一夫 岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科
 研究協力者：鎌足雄司 岐阜大学生命科学総合研究支援センター機器分析分野
 研究協力者：山口圭一 岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科
 研究協力者：福岡万佑子 岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科

研究要旨：プリオンタンパク質(PrP)に対する相互作用に基づいて、これまでに報告された抗プリオン物質を分類した。NMRにより、PrPとの結合部位の同定を行い、SPRにより結合の特異性を調べた。その結果、近年我々が見出したGN8類縁体は、ホットスポットに特異的に結合し、プリオンの正常構造を選択的に安定化する作用があることが分かった。我々はこのような作用を有する分子をメディカルシャペロンと名付け、それ以外の抗プリオン化合物と区別した。一方、これまでに報告されているキナクリンやペントサンは、PrP分子の表面全体に非特異的に結合することがわかった。さらにコンゴレッドは、PrPを沈殿させ、見かけのPrP濃度を減少させることが分かった。このようなPrPとの相互作用に基づく抗プリオン物質の分類は、その作用機序や副作用を評価するうえで有用であり、将来の臨床応用の指標となるだろう。

A. 研究目的

これまで、抗プリオン物質は多数報告されているが、その作用機序に関しては不明な点が多い。そこでプリオンタンパク質に対する結合の性質という観点から、抗プリオン物質を分類・整理した。

B. 研究方法

NMR及びSPR測定に必要なリコンビナントマウスPrP(¹⁵Nラベルあり、及びラベルなし)は、大腸菌で大量発現した。化合物は、有機合成したものか、或いは購入したものをを用いた。NMRは、当教室のAvance800、及びAvance600、SPRはBiacoreT200を使用した。

(倫理面への配慮)

該当なし。

C. 研究結果

抗プリオン物質をプリオンタンパク質に対する結合能により分類した(表1)。クラスIは、プリオン蛋白質(PrP)のホットスポットに特異的に結合する化合物で、PrPの天然構造を安定化させる性質がある。このクラスに属する化合物

をメディカルシャペロンと名付けた。メディカルシャペロンは、プリオンタンパク質と複製核との相互作用もブロックすることが分かっている。GN8やその類縁体がこれに属する。クラスIIは、PrPに非特異的に結合する化合物で、キナクリンなどがこれに属する。他のタンパク質にも非特異的な親和性があり、生物毒性や組織障害の原因となりやすい。また、PrP以外のタンパク質にも結合するため、脳への移行性は低いと考えられる。クラスIIIに属する化合物は、プリオンタンパク質を沈殿させ、有効なプリオンタンパク質濃度を減少させる性質がある。ペントサンポリサルフェイトやコンゴレッドがこれに属する。これらの物質は、他のタンパク質、例えば卵白リゾチームをも沈殿させる働きがある。今まで報告されてきた多くの化合物は、このクラスに属するものが多い。タンパク質の溶解度を下げ、非特異的な沈殿促進作用を持つ化合物は、長期連用した場合、慢性的な組織障害を引き起こす可能性があるため、臨床応用には適さないと考えられる。

D. 考察

これまで、報告されてきた多くの抗プリオン

化合物は、プリオンタンパク質に非特異的に吸着したり、凝集を促進したりする。これは、それらの化合物が、もともとプリオン病以外の目的で開発されたものであり、プリオン病に対する作用は副次的なものであることに由来する。それとは対照的に、メディカルシャペロンは、プリオン病を治療する目的で開発されてきており、PrP のホットスポットに特異的に結合し、正常型立体構造を安定化させる作用がある。また、このように開発された化合物は基本的に他のタンパク質に結合しにくい。臨床応用に際しての安全性という観点から、メディカルシャペロンを実用化することがより望ましい、と考えられる。

E. 結論

プリオン病治療薬としてのメディカルシャペロンの実用化を一刻も早く行うべきである。

[参考文献]

- 1) Kamatari Y, Hayano Y, Yamaguchi K, Hosokawa-Muto J, Kuwata K. Characterization of anti-prion compounds according to the binding properties to the prion protein. *Protein Sci*, in press.
- 2) 桑田一夫. 量子創薬—論理的形態制御学の原理—(Non-commutative Geometrical Drug Discovery —The Principle of Geometrical Regulation—). *YAKUGAKU ZASSHI* 132:873-879, 2012.

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 桑田一夫. 量子創薬—論理的形態制御学の原理—(Non-commutative Geometrical Drug Discovery —The Principle of Geometrical Regulation—). *YAKUGAKU ZASSHI* 132:873-879, 2012.
- 2) Mashima T, Nishikawa F, Kamatari Y, Fujiwara H, Saimura M, Nagata T, Kodaki T,

Nishiwaka S, Kuwata K, Katahira M. Anti-prion activity of an RNA aptamer and its structural basis. *Nucleic Acids Res*, in press.

3) Okamoto T, Ishikawa T, Koyano Y, Yamamoto N, Kuwata K, Nagaoka M. A minimal implementation of the AMBER-PAICS interface for Ab initio FMO-QM/MM-MD simulation. *Bull Chem Soc of Jpn*, in press.

4) Kamatari Y, Hayano Y, Yamaguchi K, Hosokawa-Muto J, Kuwata K. Characterizing anti-prion compounds based on their binding properties to prion proteins: Implications as medical chaperones. *Protein Sci* 22:22-34, 2013.

5) Ishikawa T, Kuwata K. RI-MP2 gradient calculation of large molecules using the fragment molecular orbital method. *J Phys Chem Lett* 3:375-379, 2012.

2. 学会発表

- 1) Kamatari YO, Hayano Y, Yamaguchi K, Hosokawa-Muto J, Kuwata K. Characterization of anti-prion compounds according to the binding properties to the prion protein. The 26th Annual Symposium, San Diego, August 5-8, 2012.
- 2) 桑田一夫. X線回折・NMR 融合アミロイド線維イメージング. X-FEL 第 1 回会合, 佐用, 9.18-19, 2012.
- 3) 桑田一夫. Relaxation Matrix and Prion. 蛋白研セミナー International Workshop on Pharmaceutical NMR-Nucleic Acids and Prion Protein, 大阪, 10.30, 2012.
- 4) 桑田一夫. 自己複製する蛋白質‘プリオン’の制御. 日本胎盤臨床研究会, 東京, 5.20, 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

表 1

Class	Mechanism	Biacore	NMR
I (GN8 derivatives)	Specific conformational stabilization of PrP ^C	Specific binding	Specific binding
II (Quinacrine, Epigallocatechin)	Non-specific stabilization of PrP ^C	Non-specific binding	Non-specific binding
III (Congo red, PPS)	Aggregation and precipitaiton to reduce PrP ^C population	Non-specific binding	Not detectable
IV (CP60,edarabone derivatives, D-PEN, Thompson derivatives)	Interaction with molecules other than PrP ^C	No binding	No interaction

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

プリオン病の治療予防に関する基礎研究

研究分担者：堂浦克美	東北大学大学院医学系研究科・神経化学分野
研究協力者：濱中大一	東北大学大学院医学系研究科・神経化学分野
研究協力者：逆瀬川裕二	東北大学大学院医学系研究科・神経化学分野
研究協力者：堺 英士	東北大学大学院医学系研究科・神経化学分野
研究協力者：倉橋洋史	東北大学大学院医学系研究科・神経化学分野
研究協力者：小熊 歩	東北大学大学院医学系研究科・神経化学分野
研究協力者：西澤桂子	東北大学大学院医学系研究科・神経化学分野
研究協力者：河田真樹	東北大学大学院医学系研究科・神経化学分野

研究要旨 プリオン病の治療予防開発に役立つ基礎研究として、昨年度発見した抗プリオン活性や治療効果をもつ化合物・生物因子について、作用機序の解明研究や実用化可能性の検討研究を実施した。プリオン持続感染細胞で抗プリオン活性を発揮する新たな化合物であるメラニン^①は、プリオン蛋白代謝やコレステロール代謝に影響せず、プリオン株に依存せずに抗プリオン活性を発揮した。一方、プリオン脳内感染マウスにおいて感染後期の末梢投与でも有効なサイトカインである GM-CSF は、Tg7-263K 疾患モデル動物では有効であったが、Tga20-22L 疾患モデル動物では無効か、あるいは逆に生命予後を短縮する傾向が見られ、GM-CSF の効果は疾患モデルに依存していることが明らかとなった。

A. 研究目的

プリオン病の治療予防開発に役立つ基礎研究として、昨年度発見した抗プリオン活性や治療効果をもつ化合物・生物因子について、作用機序の解明研究や実用化可能性の検討研究を実施した。

B. 研究方法

プリオン持続感染細胞やプリオン感染早発系マウスにおける各種の評価・解析は、すでに報告している方法(参考文献 1,2)に基づき実施した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え実験及び動物実験は、所属機関の許可を受けた後に、法令等を遵守して実施した。

C. 研究結果

昨年度新たに抗プリオン活性を発見した色素性化合物であるメラニンは、いずれのプリオ

ン持続感染細胞(RML プリオン感染 N2a 細胞、22L プリオン感染 N2a 細胞、Fukuoka-1 プリオン感染 N2a 細胞)においても、濃度依存的に抗プリオン活性を発揮しプロテアーゼ処理耐性プリオン蛋白(PrP^{res})の形成を抑制した。作用機序としては、昨年度報告した以外に、①由来の異なる 2 種類のメラニン(一つは市販のチロシン・メラニン、もう一つは L-ドーパから自家合成した L-ドーパ・メラニン)において、同様に抗プリオン活性が観察された。②多種類の細胞で調べたが、正常型プリオン蛋白については、細胞全体での発現量や細胞膜上での発現量や局在へのメラニンの影響は認められなかった。③同様に多種類の細胞で調べたが、細胞の脂質ラフトや脂質ラフト微小膜分画中の正常型プリオン蛋白の局在にメラニンは影響しなかった。また、④メラニンを構成する基本骨格の化合物と類似構造を有する化合物には、抗プリオン活性は観察されなかった。さらに、⑤メラニンは細胞のコレステロール量に影響しなかった。

一方、昨年度のプリオンを脳内感染させた早発系マウスを用いた研究で、感染後期の末梢投与でも有効なサイトカインとして発見したGM-CSFに関して、実用化の可能性について検討した。ハムスター型プリオン蛋白を発現するTg7マウスにハムスター順化263Kプリオンを脳内感染させ、7.5週目よりマウス組換え型サイトカインを投与したものでは、効果の程度は低いものの、対照に比して有意な生命予後改善効果が見られたので、発症時期の特定が容易である疾患モデルで発症後の効果を調べた。具体的には、マウス型プリオン蛋白を発現するTga20マウスにマウス順化22Lプリオンを脳内感染させると、10週目頃より頭部後屈や頭振などの異常行動が出現する。そこで、このマウスに10週目よりTg7マウスで投与した量と同量の週5日間、一回/日に500 ngを皮下に投与を行ったが、GM-CSF投与群では対照群より生命予後が短縮する傾向が出現した。そこで、投与量を週3日間に減量したところ、対照群との差はなくなったが、Tg7で観察されたような生命予後改善効果は見られなかった。さらに、22Lプリオン脳内感染Tga20マウスで投与時期を早め、感染後8.5週目より週3日間の投与を実施したが、生命予後改善とは逆に、生命予後を短縮させる結果となった。

Tg7-263K疾患モデルでのGM-CSF効果が、神経病理像に何らかの形で反映されている可能性もあるため、脳内感染後60日過ぎの対照マウスとGM-CSF投与マウスの脳組織において、プリオン蛋白、GFAP、Iba1の免疫染色を行い、異常プリオン蛋白沈着、アストロサイトの反応、ミクログリアの反応を調べたが、両者の間で明らかな差は観察されなかった。

D. 考察

検討したいずれのプリオン持続感染細胞においても抗プリオン活性を発揮したメラニンには、過去に報告のある抗プリオン活性を持つ化合物群と化学構造上ならびに物性としての共通点が乏しい。アミロイド親和性化合物とは一部に類似の共通構造があるものの、その部分だけの化学構造だけでは活性がなく、またアミロイド親和性化合物は特定のプリオン持続感染

細胞でのみ有効である点などはメラニンとは異なり、メラニンがアミロイド親和性化合物と同様な作用機序で効いているとは考え難い。また、メラニンはその基質の由来(チロシン、L-ドーパ)に関わらず、抗プリオン活性を有しており、正常型プリオン蛋白代謝・脂質ラフト・コレステロール代謝への影響は観察されなかったことより、メラニンの作用機序解明は新たなプリオン産生・分解に関わる分子メカニズムの解明と創薬標的の発見につながる可能性がある。メラニンの活性を持つ化学構造の特定、作用機序の特定や生理学的意義について、今後さらに解明を進める必要がある。

一方、Tg7-263K疾患モデルにおいて感染後期の末梢投与でも有効であったGM-CSFは、発症時期が観察しやすいTga20-22L疾患モデルでは無効かあるいは逆に生命予後を短縮させる結果となった。このことは、プリオン病のタイプによっては、GM-CSFの効果を期待できない、もしくは逆に症状を増悪させる可能性があることを示唆している。GM-CSFは海外では既製薬として臨床で使われていることより、早期に患者への実用化が可能であるが、プリオン病患者への応用には慎重であるべきことが、今回の結果から示された。

E. 結論

プリオン持続感染細胞で抗プリオン活性を発揮する新たな色素性化合物であるメラニンについて、その作用機序について解明研究を進めた。また、Tg7-263K疾患モデルにおいて感染後期の末梢投与で有効であったサイトカインGM-CSFについて、発症時期が観察しやすい他の疾患モデルでの検討を進め、実用化の可能性を評価した。

[参考文献]

- 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* 405:285-290, 2011.
- 2) Kawasaki Y, Kawagoe K, Chen CJ, Teruya K, Sakasegawa Y, Doh-ura K. Orally administered

amyloidophilic compound is effective in prolonging the incubation periods of animals cerebrally infected with prion diseases in a prion strain-dependent manner. *J Virol* 81:12889-12898, 2007.

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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* 32:124-132, 2012.

2. 学会発表

1) Sakasegawa Y, Doh-ura K. Extracellular heat shock protein 90 enhances PrPres production in prion-infected neuroblastoma N2a cells. Asian Pacific Prion Symposium 2012, Yokohama, July 29-30, 2012.

2) Kurahashi H, Doh-ura K. Applicational research from yeast prion to mammalian prion with Gpg1 and Rnq1 Δ 100 that inhibit propagation of yeast prion. Asian Pacific Prion Symposium 2012, Yokohama, July 29-30, 2012.

3) Hamanaka T, Doh-ura K. Melanin-like substances extracted from insect cuticle reduce the PrPres levels in prion-infected cells. Asian Pacific Prion Symposium 2012, Yokohama, July 29-30, 2012.

4) Sakai E, Doh-ura K. Glycerol enhances the protease-resistance prion protein production in prion-infected neuroblastoma cells. Asian Pacific Prion Symposium 2012, Yokohama, July 29-30, 2012.

5) Sakasegawa Y, Goto Y, Hachiya N, Kaneko K, Doh-ura K. Dominant negative inhibition by GPI anchor-less recombinant prion proteins is observed in persistently prion infected N2a cells in a culture medium-dependent manner. Prion 2012, Amsterdam, May 9-12, 2012.

6) 堂浦克美. ヤコブ病治療研究の現状と課題. 第 6 回 食と医療の安全に関わるプリオン病の市民講座, 東京, 12.2, 2012.

7) 坪井義夫, 堂浦克美. プリオン病に対する治療法の開発. 第 53 回日本神経学会学術大会, 東京, 5.25, 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

異常プリオン蛋白質の性状解析に関する研究

研究分担者：横山 隆	動物衛生研究所プリオン病研究センター
研究協力者：多辺田奈保子	動物衛生研究所プリオン病研究センター
研究協力者：三輪律子	動物衛生研究所プリオン病研究センター
研究協力者：宮澤光太郎	動物衛生研究所プリオン病研究センター
研究協力者：舛甚賢太郎	動物衛生研究所プリオン病研究センター

研究要旨 プリオン感染動物の脳乳剤を2種類のエンドプロテイナーゼ Lys-C または Arg-C で消化した後の PrP のバンド型により、スクレイピー Chandler 株、Obihiro 株、およびマウス馴化 BSE 株由来 PrP が区別できた。しかし、PrP^{Sc} 断片の酵素処理による解析にはサンプル中の PrP^C の除去が必要となる。PrP^C のみの除去方法について検討したところ 10 µg/ml のサーモライシン処理が有効であり、その際 PrP^{Sc} は全長のまま保持された。この処理により PrP^{Sc} のみのフラグメント断片の解析が可能となった。

A. 研究目的

プリオンの主要構成成分である異常プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) は、プリオン株によって分子量、糖鎖型に違いが認められる例も知られている。牛海綿状脳症 (BSE) 由来 PrP^{Sc} とスクレイピー由来 PrP^{Sc} では、プロテイナーゼ K (PK) 消化後の分子量、糖鎖型に明瞭な差が認められるが、多くのスクレイピー株では、生物学的性状の異なる株でも PK 消化後のバンドに違いは認められない。一方、スクレイピー感染動物の脳内に蓄積する PrP^{Sc} が、不均一な集合体であることが示唆されており、プリオン株の性状解明には、PrP^{Sc} をさらに分類する手法が必要である。プリオン株の選択・変異の機構を明らかにすることを目指して、各種蛋白質分解酵素に対する抵抗性とその際に出現する断片を指標とした、PrP^{Sc} の性状解析ならびにプリオン株の分類を行う。

B. 研究方法

PrP^{Sc} の細分化を目的として、PK 以外の蛋白質分解酵素処理によって出現する PrP^{Sc} 断片のバンド型別を行った。PrP^{Sc} のみの解析のため、サンプル中からの PrP^C の除去法を検討した。

(倫理面への配慮)

プリオン感染動物および材料の取り扱い

動物衛生研究所内のバイオセーフティレベル (BSL) 2 (スクレイピープリオン) または 3 (その他のプリオン) 実験施設にて行い、汚染物は 135°C、30 分間のオートクレーブ処理等により不活化した。すべての実験は動物衛生研究所バイオセーフティ委員会、実験動物委員会の許可を受けて実施した。

C. 研究結果

感染動物の脳乳剤を2種類のエンドプロテイナーゼ (Lys-C または Arg-C) で消化した後の PrP のバンド型により、スクレイピー Chandler 株、Obihiro 株、およびマウス馴化 BSE 株由来 PrP が区別できる可能性を示した。PrP^{Sc} の酵素処理による断片の解析には PrP^C の除去が必要となる。そこで、サーモライシンを使った PrP^{Sc} の検出方法について検討した。プリオン非感染動物の脳乳剤を 10 µg/ml のサーモライシンで処理すると、PrP^C のバンドは消失したが、プリオン感染動物では PrP のバンド型に変化は認められず、全長の PrP (PrP^{Sc}) が保持される。サーモライシン処理した試料を PK で消化すると、PK 処理のみと同じ PrP_{core} が出現するが、そのシグナル強度は大きく減弱する。このことから、調整した試料中には PK 抵抗性 PrP^{Sc} (PrP^{Sc}-res) および PK 感受性 PrP^{Sc} (PrP^{Sc}-sen) が含まれると考

えられた。PK 消化および未消化の試料のウェスタンブロットのシグナル強度を比較したところ、PrP^{Sc}-res は PrP^{Sc} の約 20~40% を占めることが示唆され、その比率はプリオン株によって異なっていた。

D. 考察

PrP^{Sc} の酵素処理による断片の解析のため、PrP^C の除去法を検討したところ、サーモライシン処理が有効であると考えられた。低濃度のサーモライシン処理は PrP^C を除去し、全長の PrP^{Sc} を保存すると考えられ、PK 感受性 PrP^{Sc} の検出への有用性も示唆された。

E. 結論

サーモライシン処理によって、試料中から PrP^C を除去することが可能となり、PrP^{Sc} のみのフラグメント断片の解析が可能となった。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hasegawa K, Mohri S, Yokoyama T. Comparison of the local structural stabilities of mammalian prion protein (PrP) by fragment molecular orbital calculations. *Prion* 7:1-7, 2013.
- 2) Okada H, Murayama Y, Shimozaki N, Yoshioka M, Masujin K, Imamura M, Iwamaru Y, Matsuura Y, Miyazawa K, Fukuda S, Yokoyama T, Mohri S. Prion in saliva of bovine spongiform encephalopathy-infected cattle. *Emerg Infect Dis* 18:2091-2092, 2012.
- 3) Dorj G, Okada H, Miyazawa K, Masujin K, Kimura K, Mohri S, Yokoyama T. Retrospective analysis of sheep scrapie by western blotting with formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues. *J Vet Med Sci* 74:1207-1210, 2012.
- 4) Kim HJ, Tark DS, Lee YH, Kim MJ, Lee WY, Cho IS, Sohn HJ, Yokoyama T. Establishment of a cell line persistently infected with chronic wasting disease prions. *J Vet Med Sci* 74:1377-1380, 2012.
- 5) Tang Y, Gielbert A, Jacobs JG, Baron T, Andreoletti O, Yokoyama T, Langeveld JP,

Sauer MJ. All major prion types recognised by a multiplex immunofluorometric assay for disease screening and confirmation in sheep. *J Immunol Methods* 380:30-39, 2012.

6) Kasai K, Hirata A, Ohyama T, Nokihara K, Yokoyama T, Mohri S. Novel assay with fluorescence-labelled PrP peptides for differentiating L-type atypical and classical BSEs, and scrapie. *FEBS Lett* 586:325-329, 2012.

7) Masujin K, Miwa R, Okada H, Mohri S, Yokoyama T. Comparative analysis of Japanese and foreign L-type BSE prions. *Prion* 6:89-93, 2012.

8) 横山 隆, 辻 智香, 横山真弓. ニホンジカのプリオン病(CWD)サーベイランス. *JVM* 65:479-481, 2012.

2. 学会発表

- 1) Masujin K, Miwa R, Okada H, Mohri S, Yokoyama T. Comparative analysis of Japanese and other countries L-type BSE prions. Prion 2012, Amsterdam, May 10-12, 2012.
- 2) Jacobs J, Langeveld J, Yokoyama T, Andreoletti O, Hope J, Bossers A, van Keulen L, Baron T. Ovine field CH1641 like scrapie cases do differ from classical scrapie and BSE—Western blotting studies on PrPres. Prion 2012, Amsterdam, May 10-12, 2012.
- 3) Yokoyama T, Dorj G, Okada H, Miyazawa K, Masujin K, Mohri S. Western blotting detection of abnormal prion protein (PrP^{Sc}) from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues—Immunoreactivity of mab discriminate sheep scrapie types. Prion 2012, Amsterdam, May 10-12, 2012.
- 4) Yokoyama Y. Atypical bovine spongiform encephalopathies. The 16th Annual meeting of Japanese society for neurovirology, Tokyo, August 30-31, 2012.
- 5) Imamura M, Kato N, Yoshioka M, Okada H, Iwamaru Y, Shimizu Y, Mohri S, Yokoyama T, Murayama Y. Proteinase K- and heat-treated insect cell lysate effectively stimulates *in vitro* high-fidelity replication of baculovirus-derived recombinant scrapie and BSE prions. Asian Pacific