

新潟・群馬・長野におけるプリオン病の発生状況

研究分担者：西澤 正豊 新潟大学脳研究所神経内科学分野

研究協力者：春日 健作 同遺伝子機能解析学分野

研究要旨

新潟・群馬・長野の3県におけるプリオン病の発生状況を調査し、サーベイランス委員会に報告するとともに、特異な経過等を呈した例は個々に発表・報告を行う。

A. 研究目的

新潟・群馬・長野3県におけるプリオン病の発生状況(人口に対する発症頻度、孤発性・遺伝性・獲得性の割合)が、本邦の他ブロックと比べ特徴があるか、あるいは前年度以前と比べ変化があるかを確認する。

B. 研究方法

新潟・群馬・長野3県からプリオン病サーベイランスに登録された症例全例を対象とし、主治医に症例情報を確認し発生状況を把握するとともに、特に経過を呈する症例に関しては個別により詳細な臨床情報を確認する。

(倫理面への配慮)

本研究において、対象症例のプライバシーの保護に関する規則は遵守されており、また情報開示に関し当施設所定の様式に基づいた同意を取得している。

C. 研究結果

平成27年度(平成28年1月21日現在)は新潟・群馬・長野3県においてサーベイランス委員会からの調査依頼は15例であり、うち9

例の臨床情報が確認できた(6例は情報未回収のため引き続き調査中)。さらにこれまでのサーベイランスにおいて情報が未回収であった症例を再調査することにより11例の臨床情報が確認できた。

これら20例のうち、11例が平成27年9月のサーベイランス委員会で検討を経て、孤発性 CJD probable とされたものが3例、possible とされたものが1例(脊髄小脳変性症31型との合併)、遺伝性 CJD V180I が1例であり、6例はCJDは否定的と考えられた。残る9例は平成28年2月のサーベイランス委員会で検討予定であるが、うち1例は硬膜移植後の発症であり獲得性 CJD と考えられる。

D. 考察

今年度の新潟・群馬・長野3県におけるCJDの発生状況については、平成27年2月のサーベイランス委員会での検討を待ち結論づける必要があるが、1例は硬膜移植による獲得性CJDの可能性がある。

E. 結論

プリオン病は感染症の側面をもつ疾患であることから、引き続き新潟・群馬・長野3県における発生状況を監視する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表 (2015/4/1～2016/3/31 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

特記事項なし

非典型的な臨床経過を呈した E200K 変異遺伝性 CJD の剖検例

研究分担者：田中 章景 横浜市立大学大学院医学研究科神経内科学

研究協力者：児矢野 繁 横浜市立大学大学院医学研究科神経内科学

研究協力者：岸田 日帯 横浜市立大学附属市民総合医療センター神経内科

研究要旨

E200K 変異を有する遺伝性クロイツフェルト・ヤコブ病（gCJD-E200K）では、通常の孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病（sCJD）MM1 と同様の典型的な進行性認知症の経過を呈する。小脳失調、精神症状で発症しミオクローヌスを認めず、脳 MRI 拡散強調画像で大脳基底核・視床のみに異常信号を呈し、経過 1 年で亡くなられた gCJD-E200K の症例について報告した。本症例ではコドン 129 は Met/Val 多型だった。大脳皮質は典型的な海綿状変化を示したが、神経細胞脱落は軽度だった。小脳も顆粒細胞層の神経細胞数の減少は軽微で、Kuru 斑を認めずアミロイド斑が散見されるのみだった。脳組織の Western blot では type intermediate + type 2 が検出された。臨床症状、病理所見、Western blot とともに、稀少な症例であった。

A. 研究目的

E200K 変異を有する遺伝性クロイツフェルト・ヤコブ病（gCJD-E200K）では、通常の孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病（sCJD）MM1 と同様の典型的な進行性認知症の経過を呈する。小脳失調、精神症状で発症しミオクローヌスを認めず、脳 MRI 拡散強調画像で大脳基底核・視床のみに異常信号を呈し、経過 1 年で亡くなられた gCJD-E200K の症例について報告した。

B. 研究方法

症例は、60 歳女性。初発症状は眩暈感で、その後もの忘れが徐々に進行して発症 4 ヶ月で歩行不能となった。プリオン病の家族歴なし。手術歴や輸血歴も一切なかった。神経学的検査では、高度の認知機能低下、構音障害と軀幹失調を認めた。ミオクローヌスは、経

過を通じて観察されなかった。脳 MRI 拡散強調画像では、両側大脳基底核に限局した高信号域を呈した。脳脊髄液検査では、総 tau 蛋白は高値だが、14-3-3 タンパクは正常範囲のだった。脳波で周期性同期性放電を認めなかった。プリオン蛋白（PrP）遺伝子検査では、コドン 200 に E200K 変異を認め、コドン 129 は Met/Val、コドン 219 は Glu/Glu であった。E200K 変異は、129Met と同一のアレルに存在した。上記所見より遺伝性 CJD（E200K）と診断した。

診断後、発症 8 ヶ月で無動無言に進行し、肺炎によりその 1 ヶ月後に死亡した。死亡時 61 歳、全経過は 9 ヶ月であった。患者家族の同意を得て、病理解剖をおこない、凍結脳標本も東北大学で Western blot を施行した。

（倫理面への配慮）

本症例の症例発表についてはご家族に対

し説明し、同意をいただいている。

C. 研究結果

脳重量は 1180g、肉眼的には大脳、小脳、脳幹を含め、脳萎縮はごく軽度で、断面でも大脳皮質・白質は良く保たれていた。

組織学的にも、大脳皮質ではその深部灰白質で典型的な spongiform changes を示して神経細胞数はよく保たれ、グリオーシスも目立たず臨床経過 1 年にしては非常に軽微な初期病変のみであった。小脳も顆粒細胞はよく保たれ、通常の E200K 変異症例の MM1 タイプでは考えられない初期病変を示すのみであった。小脳では歯状核の細胞数低下が目立ち、結果として上小脳脚の神経線維脱落、赤核の脂肪を含有したマクロファージが多数出現していた。また下オリーブ核も中等度の細胞数脱落を認めた。

PrP 免疫染色では、PrP^{Sc} はシナプス型の沈着を中心に認め、大脳皮質の神経細胞周囲に目立つ傾向にあった。小脳でも基本的にはシナプス型の沈着であったが、大脳皮質の一部と小脳の分子層には小さな淡い斑状の沈着も見られた。典型的な、クル斑（アミロイド斑）はほとんど認めず、小脳に極少数アミロイド斑を指摘できるのみであった。

PrP^{Sc} の Western blot では、type 1 より少し分子量が低い type intermediate と極少量の type 2 を認めた。

D. 考察

本症例は Parchi の分類でいう MV2K タイプに類似した臨床経過を呈したが、神経病理学的には、小脳でわずかにプラークを観察できるのみで孤発性 CJD の MV2K とは異なる病理所見だった。本症例は、E200K 変異を有する遺伝性 CJD で、type intermediate PrP^{Sc} と type 2 PrP^{Sc} が蓄積した初めての報告例である。

E. 結論

希少な E200K 変異を有する遺伝性 CJD を経験し、病理所見を含め報告した。

[参考文献]

Kovacs GG, Seguin J, Quadrio I, Höftberger R, Kapás I, Streichenberger N, Biacabe AG, Meyronet D, Sciot R, Vandenberghe R, Majtenyi K, László L, Ströbel T, Budka H, Perret-Liaudet A. Genetic Creutzfeldt-Jakob disease associated with the E200K mutation: characterization of a complex proteinopathy. *Acta Neuropathol.* 2011 121; 39-57.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表（2014/4/1～2015/3/31 発表）

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Hitaru Kishida, Shigeru Koyano, Mikiko Tada, Yousuke Kudo, Katsuo Kimura, Naohisa Ueda, Tetsuyuki Kitamoto, Fumiaki Tanaka. Atypical familial CJD with E200K and 129MV polymorphism. Asian Pacific Prion Symposium 2015. Kanazawa, Sep 4, 2015.

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

V180I-129M gCJD の SPECT 所見に関する検討

研究分担者	犬塚 貴	岐阜大学大学院医学系研究科神経内科・老年学分野
研究協力者	林 祐一	岐阜大学医学部附属病院神経内科・老年内科
	吉倉 延亮	岐阜大学医学部附属病院神経内科・老年内科
	竹腰 顕	岐阜大学医学部附属病院神経内科・老年内科
	山田 恵	岐阜大学大学院医学系研究科神経内科・老年学分野
	木村 暁夫	岐阜大学大学院医学系研究科神経内科・老年学分野

研究要旨

V180I gCJD は日本で最も頻度の高い遺伝性プリオン病である。V180I gCJD の臨床的特徴は、家族歴がなく高齢発症で緩徐進行、頭部 MRI Diffusion や FLAIR 画像で大脳皮質がやや浮腫状に高信号を呈することである。我々は当該サーベイランス地区で発生した V180I gCJD-129M 3 例をもとに SPECT 所見の特徴を明らかにするために本研究を行った。経時的に SPECT 所見を検討したところ、全例で発症から 20~23 ヶ月後のほぼ寝たきり状態にあっても後頭葉と小脳の血流が保たれていた。これは V180I-129M gCJD の SPECT 所見の特徴ではないかと考えた。

A. 研究目的

V180I gCJD は日本で最も頻度の高い遺伝性プリオン病である^{1,2)}。V180I gCJD の臨床的特徴は、家族歴がなく高齢発症で緩徐進行、頭部 MRI Diffusion や FLAIR 画像で大脳皮質がやや浮腫状に高信号を呈することである^{2,3)}。我々は当該サーベイランス地区で発生した V180I gCJD-129M 3 例をもとに SPECT 所見の特徴に関して明らかにするために本研究を行った。

B. 研究方法

2006 年から 2015 年までの 10 年間に当院に入院した V180I gCJD 患者のうち、MRI 及び SPECT 検査を経時的に観察できた 3 例 (SPECT 検査回数 7 回) の SPECT 所見の変化について後ろ向きに調査した。

(倫理面への配慮)

個人の特定につながる住所、生年月日、名前を削除し、研究に用いた。

C. 研究結果

【症例 1】 69 歳女性。家族歴・既往歴に特記すべきことなし。4 ヶ月前からの認知機能低下があり入院した。神経学的には、進行性認知機能低下、前頭葉徴候、動作緩慢を認めた。MRI diffusion 画像(DWI)で前頭葉・側頭葉に浮腫状の皮質高信号を認めた。プリオン蛋白遺伝子検査では V180I 遺伝子変異を認めた。髄液検査では、14-3-3 蛋白と t-tau 蛋白の上昇を認めた。症状は緩徐に進行し寝たきり状態に至ったが、視力障害や小脳失調は認めなかった。

【症例 2】 78 歳女性。家族歴・既往歴に特記すべきことなし。6 週間前から左手の振戦、認知機能低下があり入院した。神経学的には、

進行性認知機能低下、パーキンソニズムを認めた。DWI で前頭葉・側頭葉、頭頂葉に浮腫状の皮質高信号を認めた。プリオン蛋白遺伝子検査では V180I 遺伝子変異を認めた。髄液検査では、14-3-3 蛋白の上昇を認めた。症状は緩徐に進行し寝たきり状態に至ったが、視力障害や小脳失調は認めなかった。

【症例 3】74 歳女性。家族歴・既往歴に特記すべきことなし。7 ヶ月前からパーキンソニズム、認知機能低下があり入院した。神経学的には、進行性認知機能低下、四肢筋強剛、ミオクローヌス、四肢腱反射亢進、動作緩慢を認めた。DWI で左前頭葉・側頭葉、頭頂葉に浮腫状の皮質高信号を認めた。プリオン蛋白遺伝子検査では V180I 遺伝子変異を認めた。髄液検査では、t-tau 蛋白の上昇を認めた。症状は緩徐に進行し寝たきり状態に至ったが、視力障害や小脳失調は認めなかった。

3 症例は全て WHO 診断基準では V180I-129M gCJD の probable の症例に相当した。3 例の SPECT 所見を経時的に観察したところ、後頭葉と小脳、脳幹の血流が保たれていた。

D. 考察

V180I gCJD の症例では、MM1 sCJD と比較して視覚異常や小脳失調の出現頻度は MM1 sCJD よりも少ないと報告されている²⁾。また、病理学的には長期例においても後頭葉、小脳、脳幹の病変は軽度で比較的保たれる傾向がある⁴⁾。ほぼ寝たきり状態にあっても後頭葉と小脳、脳幹の血流が保たれていることとの関連が示唆される。

E. 結論

ほぼ寝たきり状態にあっても後頭葉と小脳の血流が保たれていることは、V180I-129M gCJD の SPECT 所見の特徴ではないかと考えた。

[参考文献]

- 1) Nozaki I, Hamaguchi T, Sanjo N, et al. Prospective 10-year surveillance of human prion diseases in Japan. *Brain* 2010; 133: 3043-3057.
- 2) Qina T, Sanjo N, Hizume M, et al. Clinical features of genetic Creutzfeldt-Jakob disease with V180I mutation in the prion protein gene. *BMJ Open*. 2014; 4(5): e004968.
- 3) Jin K, Shiga Y, Shibuya S, et al. Clinical features of Creutzfeldt-Jakob disease with V180I mutation. *Neurology* 2004; 62: 502-505.
- 4) Iwasaki Y, Mori K, Ito M, et al. An autopsied case of V180I Creutzfeldt-Jakob disease presenting with panencephalopathic-type pathology and a characteristic prion protein type. *Neuropathology* 2011; 31: 540-548.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表 (2015/4/1~2016/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Hayashi Y, Iwasaki Y, Yoshikura N, Asano T, Hatano T, Tatsumi S, Satoh K, Kimura A, Kitamoto T, Yoshida M, Inuzuka T. Decreased regional cerebral blood flow in the bilateral thalami and medulla oblongata determined by an easy Z-score (eZIS) analysis of ^{99m}Tc-ECD-SPECT images in a case of MM2-thalamic-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol Sci* 2015; 358: 447-452.

2. 学会発表

- 1) Hayashi Y, Yoshikura N, Takekoshi A, Harada N, Yamada M, Kimura A, Inuzuka T. SPECT findings during end-stage V180I gCJD. Asian Pacific Prion Symposium 2015. Kanazawa, Japan, 2015/9/4.
- 2) 林 祐一、堀田みゆき、安西将大、竹腰 颯、吉倉延亮、原田斉子、香村彰宏、木村暁夫、犬塚 貴. クロイツフェルト・ヤコブ病患者の医療連携に関する検討. 日本神経学会学術大会. 新潟, 2015/5/20.

- 3) 林 祐一、堀田みゆき、山田 恵、吉倉延亮、村上宗玄、竹腰 颯、木村暁夫、犬塚 貴. プリオン病患者の医療連携に関する 10 年間の試み. 日本難病医療ネットワーク学会. 仙台, 2015/11/13.

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

当院における遺伝性プリオン病血縁者に対する遺伝カウンセリング経験と今年度の近畿ブロックにおけるプリオン病サーベイランス状況

研究分担者：望月 秀樹 大阪大学大学院医学系研究科 神経内科学
研究協力者：高橋 正紀 大阪大学大学院医学系研究科 神経内科学
研究協力者：三原 雅史 大阪大学大学院医学系研究科 神経内科学

研究要旨（当院における遺伝性プリオン病血縁者に対する遺伝カウンセリング経験と今年度の近畿ブロックにおけるプリオン病サーベイランス状況）

当院遺伝子診療部において経験した遺伝性プリオン病血縁者に対する遺伝子カウンセリング事例について報告する。症例は40代男性。60代後半の母親がGSSと診断され、発症前診断についての詳しい説明を希望され来院。問題点として、家族に正確な病名（遺伝性を含め）を伝えられていない点、キーパーソンが不在な点などがあげられた。本症例に限らず、根治療法のない遺伝性神経疾患における遺伝子診断結果の告知については、解決すべき問題が多く、今後 at risk の血縁者へのサポート体制などの充実が望まれる。上記報告に加えて、当科が担当することとなった、2015年4月以降10月末までの近畿ブロックにおけるプリオン病サーベイランス状況についてもあわせて報告を行った。

A. 研究目的（当院における遺伝性プリオン病血縁者に対する遺伝カウンセリング経験）

我々が当院遺伝子診療部において行った遺伝子カウンセリング事案を通じて、遺伝性プリオン病などの根治療法のない遺伝性神経疾患の遺伝子診断における、今後解決すべき発症前診断の是非や遺伝子診断結果の告知についての倫理的、社会的な問題点について検討を行う。

（今年度の近畿ブロックにおけるプリオン病サーベイランス状況）

本年度より当科が担当することとなった、近畿ブロックにおけるプリオン病サーベイランス状況について、2015年4月以降の状況と現状の問題点について報告する。

B. 研究方法

（当院における遺伝性プリオン病血縁者に

に対する遺伝カウンセリング経験）

当院遺伝子診療部において経験したカウンセリング事案について報告し、今後解決すべき問題点について検討する。

（今年度の近畿ブロックにおけるプリオン病サーベイランス状況）

当科が担当となった、2015年4月以降の近畿ブロックにおけるプリオン病サーベイランス状況について報告し、現状での課題と解決策について検討を行う。

（倫理面への配慮）

今回の報告に関しては個人情報保護の観点から、個人が特定できるような情報に関しては一切開示しないように配慮を行っている。

C. 研究結果

（当院における遺伝性プリオン病血縁者に対する遺伝カウンセリング経験）

症例は 40 代男性。妻、子供 2 人あり。同胞は 1 人で子供 2 人あり。60 代後半の母親が、某大学病院にて GSS と診断され、子供への遺伝が不安であることから発症前診断を希望されるも母親の主治医からは倫理的な問題があり発症前診断は困難と説明された。今回発症前診断についての詳しい説明を希望され来院。

母親は下肢の痙性、歩行障害で発症し、約 2 年の経過で高次脳機能障害、認知機能障害が進行。母方祖母および母親の同胞 10 人のうち 2 人が同様の症状で 70 歳前後に死亡。本症例の問題点として、依頼者の妻、義母に正確な病名（遺伝性を含め）を伝えられていない点、キーパーソンが不在な点などがあげられた。依頼者に疾患についての情報、特に治療法が存在せず、また優性遺伝で浸透率は高めであるが 100%ではない点などを説明し、第 1 回目のカウンセリングを終了した。

（今年度の近畿ブロックにおけるプリオン病サーベイランス状況）

今年度は 12 月末までの時点で、58 例についての調査依頼があり、大阪府 26 例、兵庫県 15 例、京都府 8 例、滋賀県 5 例、奈良県 3 例、和歌山県 1 例とほぼ人口比と同様の分布であった。また、2011 年より前年度末までに、近畿ブロックでは 186 例分の調査結果が未回収であったが、今年度、改めて都道府県担当専門医を通じて各施設への働きかけを行った結果、2015 年 12 月末までの時点で 58 例から調査結果の回答が得られている。

D. 考察

（当院における遺伝性プリオン病血縁者に対する遺伝カウンセリング経験）

本症例に限らず、根治療法のない遺伝性神経疾患における遺伝子診断結果の告知については、解決すべき問題が多く、今後 at risk の血縁者へのサポート体制などの充実が望ま

れる。

（今年度の近畿ブロックにおけるプリオン病サーベイランス状況）

各府県の調査依頼数はほぼ人口分布と一致しており、近畿ブロック各府県での発生数の把握状況はほぼ同等と考えられた。今年度は担当が交代したこともあり、各都道府県担当専門医と連携が不十分でし、調査結果未回収を低減するための体制を構築していきたいと考えている。

E. 結論

遺伝性プリオン病の遺伝子診断に当たっては、診断前から家族・血縁者に十分に情報提供し、フォローアップし支援する体制の充実が求められる。

また今後は各都道府県担当専門医と連携して、調査結果を効率的に回収する体制を構築していきたい

【参考文献】

なし

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表（2014/4/1～2015/3/31 発表）

1. 論文発表

奥野龍禎. 脳炎. In: 望月秀樹・北川一夫・編. 神経内科クリニカルスタンダード. 文光堂. 東京. 2015:344-365

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。）

なし

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

中国四国地区におけるプリオン病サーベイランス

研究分担者：阿部 康二 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科脳神経内科学

研究協力者：佐藤 恒太 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科脳神経内科学

研究要旨

本邦でクロイツフェルト・ヤコブ病（CJD）サーベイランス委員会が設置されてからの 15 年あまりの調査にて我が国のプリオン病の実態が明らかにされてきている。特に遺伝性プリオン病の病型分布においては V180I および M232R の変異の頻度が高く、欧米とは異なった傾向を示している。我々はプリオン病サーベイランスの結果に基づき中国四国地区におけるプリオン病の実態について検討を行った。

2014 年 10 月から 2015 年 9 月の期間で中国四国地区において当委員会に報告され、プリオン病と判定されたのは全 27 例、うち孤発性 CJD 22 例、遺伝性 CJD 5 例であった。また診断不明あるいは他の疾患による保留または否定が 13 例であった。当該地区における 1999 年 4 月から 2015 年 9 月の通算では、259 例がプリオン病（確実、ほぼ確実、疑い）と判定された。その内訳は、孤発性 CJD 208 例（80.3%）、遺伝性 CJD 46 例（17.8%）、獲得性 CJD（硬膜移植後）5 例（1.9%）で全国平均とほぼ同様であった。変異型 CJD は同定されなかった。遺伝性 CJD の PRNP 蛋白遺伝子の変異別頻度は、V180I 34 例（73.9%）、M232R 9 例（19.6%）、E200K 1 例（2.2%）、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病（P102L）1 例（2.2%）、家族性致死性不眠症 1 例（2.2%）、D178N 1 例（2.2%）の順であった。

2012 年 9 月から 2015 年 9 月に限ると V180I 変異症例が 12 例増えており、全国統計に比べて、V180I の頻度が高いばかりでなく、近年報告数が益々増加していることが示唆された。

A. 研究目的

プリオン病サーベイランスの結果に基づき、中国四国地区におけるプリオン病の実態を明らかにする。

B. 研究方法

中国四国地区においてプリオン病サーベ

イランス委員会に報告された全 351 例（1999 年 4 月から 2015 年 9 月）について、中国四国各県の CJD 担当専門医の協力のもとに電話・訪問調査を行い、定期的に行われるサーベイランス委員会にて個々の患者のプリオン病の診断（病型、診断の確実

性、他) についての評価を行った。そして、これらの症例について発生地域、発病年齢、病型(孤発性、遺伝性、獲得性)、臨床症状などの項目について統計解析を行った。

(倫理面への配慮)

当研究における匿名化された個人情報を含む研究結果の発表に関しては、サーベイランス事務局のある東京医科歯科大学医学部倫理委員会の審査承認を受け、すべての患者の同意を得ている。

C. 研究結果

2014年10月から2015年9月の期間で中国四国地区において当委員会に報告され、プリオン病と判定されたのは全27例、うち孤発性CJD 22例、遺伝性CJD 5例であった。また診断不明あるいは他の疾患による保留または否定が13例であった。当該地区において当委員会に報告された全351例(1999年4月から2015年9月)のうち、259例がプリオン病(確実、ほぼ確実、疑い)と判定された。その内訳は、孤発性CJD 208例(80.3%)、遺伝性CJD 46例(17.8%)、獲得性CJD(硬膜移植後) 5例(1.9%)で全国平均とほぼ同様であった(図1)。

遺伝性CJDのPRNP蛋白遺伝子の変異別頻度は、V180I 34例(73.9%)、M232R 9例(19.6%)、E200K 1例(2.2%)、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病(P102L) 1例(2.2%)、家族性致死性不眠症 1例(2.2%)、D178N 1例(2.2%)の順であり、全国調査との乖離が見られた(図2)。

D. 考察

中四国地域は遺伝性プリオン病のうち、V180Iの頻度が全国統計(約40%)に比べて、明らかに高く、E200K・P102Lの頻度が小さいという特徴が見られた。以上より本邦の遺伝性プリオン病の分布には地域差

があると考えられた。また、2012年9月から2015年9月に限るとV180I変異症例が12例増えており、全国統計に比べて、V180Iの頻度が高いばかりでなく、近年報告数が益々増加していることが示唆された。

E. 結論

[参考文献]

- 1) Nozaki I, Hamaguchi T, Yamada M et al. Prospective 10-year surveillance of human prion diseases in Japan. *Brain*. 2010; 133: 3043-57.
- 2) 山田正仁, 篠原もえ子, 浜口 毅, 野崎 一朗, 坂井健二. 日本におけるヒト・プリオン病のサーベイランスと疫学的実態. In: 厚生労働省科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業「プリオン病および遅発性ウイルス感染症に関する調査研究班」編. プリオン病と遅発性ウイルス感染症. 東京, 金原出版, 2010; 16-21.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表 (2014/4/1~2015/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Matsuzono K, Honda H, Sato K, Morihara R, Deguchi K, Hishikawa N, Yamashita T, Kono S, Ohta Y, Iwaki T, Abe K. 'PrP systemic deposition disease': clinical and pathological characteristics of novel familial prion disease with 2-bp deletion in codon 178. *Eur J Neurol*. 2016 Jan;23(1):196-200.

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。)

なし

図1. プリオン病患者の病型分類

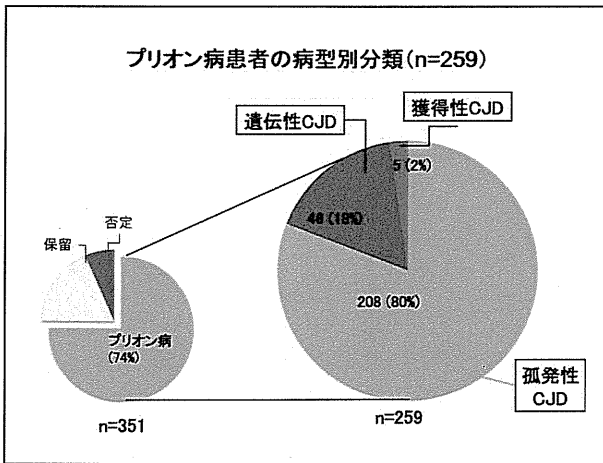
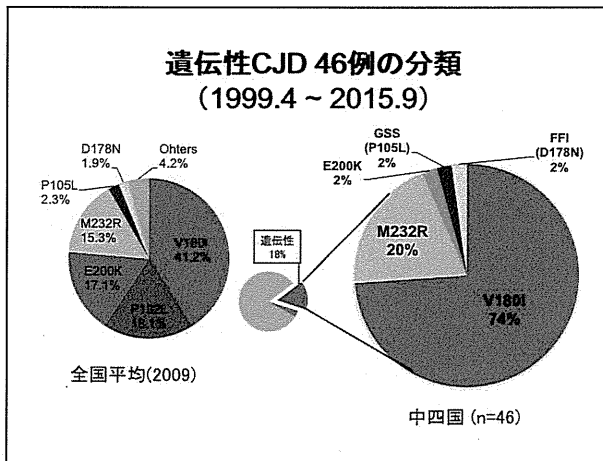


図2. 遺伝性プリオン病の全国調査との比較



平成 27 年 九州・山口・沖縄地区のプリオン病サーベイランスの現状

研究分担者：村井 弘之

九州大学大学院医学研究院脳神経治療学

研究要旨

九州・山口・沖縄地区のクロイツフェルト・ヤコブ病サーベイランス体制の実態と課題を検討した。同地区では、都道府県によってプリオン病の調査依頼数が異なっていた。正確な臨床像の把握のためには実地調査によるサーベイランスが望ましいが、調査対象患者の増加にともない、その実施が困難になってきているのが課題である。

A. 研究目的

平成 27 年の九州・山口・沖縄地区のクロイツフェルト・ヤコブ病サーベイランス体制の実態と課題を検討する。

B. 研究方法

平成 26 年 11 月から平成 27 年 10 月までの期間にクロイツフェルト・ヤコブ病サーベイランス事務局より九州・山口・沖縄地区ブロック担当者へ調査指示のあった症例について、その都道府県別の症例数、調査の現状などについて検討した。

（倫理面への配慮）

調査にあたっては、患者本人または家族に研究の同意書にを記載していただき、また、個人が特定できないよう、匿名で調査票を記載した。

C. 研究結果

平成 26 年 11 月から平成 27 年 10 月までの期間にクロイツフェルト・ヤコブ病サーベイランス事務局より九州・山口・沖縄地区ブロック担当者に調査指示があったのは、計 84 症例

であった。その都道府県別の内訳は、福岡県 38 例（45.2%）、佐賀県 6 例（7.1%）、長崎県 6 例（7.1%）、熊本県 6 例（7.1%）、大分県 6 例（7.1%）、宮崎県 3 例（3.6%）、鹿児島県 11 例（13.1%）、沖縄県 5 例（6.0%）、山口県 3 例（3.6%）であった。すなわち、福岡県のみで全体の半数ちかくを占めた。九州・山口・沖縄全体に占める福岡県の人口は 5,071,968/16,048,121（=31.6%）であることより、人口の割合に比してヤコブ病調査依頼が多かった。一方、熊本県、宮崎県、山口県などは人口比から予想された件数よりも低い傾向にあった（表 1）。

次に、調査依頼のソースを調べてみると、特定疾患 2.4%、プリオン蛋白遺伝子検査 11.9%、髄液 14-3-3 蛋白等検査 78.6%、感染症法・その他 7.1%と、圧倒的に髄液 14-3-3 蛋白等検査からの情報が多いことが明らかとなった。

九州・山口・沖縄地区では、ブロック担当者が福岡県、長崎県、大分県、宮崎県、沖縄県の 5 県（調査依頼数では 58/84=69%）の調査を担当、極力実地調査をしている。

D. 考察

今回の調査で、九州・山口・沖縄地区では、人口比を考慮しても福岡県は調査依頼数が多かった。福岡県の医療機関がプリオン病に対する意識が高い可能性が考えられたが、詳細は不明である。

調査依頼のソースは、プリオン病関連検査からの情報がメインであることが明らかとなった。特定疾患（指定難病）の情報については都道府県ごとの処理の温度差が大きく、少なくとも現時点では悉皆調査のソースとしてはあまり適切でないように思われた。

調査の方法としては、(1) 実地訪問調査、(2) 電話調査、(3) 主治医へ調査票を郵送、などの方法がありえるが、実地訪問調査がもっとも望ましい。その理由としては、検査をしてもらいたいために誇張した表現になる場合があり、実際の臨床像とずれてくること、検査依頼書記入時にはなかった神経徴候や脳波上の PSD 所見などがその後に出現していることがあること、などがある。また、主治医が PSD 陽性、MRI 拡散強調画像における皮質の高信号陽性、と判断していても、本当に陽性とはいえない場合や、判断に迷う場合もしばしばある。このような場合はその所見を訂正したり、その脳波や画像の実際をサーベイランスで検討したりする必要がある。九州・山口・沖縄地区のブロック担当者は福岡県ほか5県の調査を担当しているが、実地調査のための時間の確保が課題である。

E. 結論

九州・山口・沖縄地区では、都道府県によってプリオン病の調査依頼数が異なっていた。正確な臨床像の把握のためには実地調査によるサーベイランスが望ましいが、調査対象患者の増加にともない、その実施が困難になってきているのが課題である。

[参考文献]

なし

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Amano Y, Kimura N, Hanaoka T, Aso Y, Hirano T, Murai H, Satoh K, Matsubara E. Creutzfeldt-Jakob Disease with a prion protein gene codon 180 mutation presenting asymmetric cortical high-intensity on magnetic resonance imaging. *Prion*. 2015; 9: 29-33

2. 学会発表

Murai H, Nakamura Y, Kitamoto T, Tsuboi Y, Sanjo N, Yamada M, Mizusawa H, Kira J. Clinical and epidemiological survey of Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease with codon 102 mutation in Japan. The 22nd World Congress of Neurology. Santiago, Chile, 2015.11.4

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

なし

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1 平成27年 都道府県別のサーベイランス調査依頼数（合計84例）と人口

都道府県	依頼数	依頼数%	人口	人口%	調査担当者
福岡県	38	45.2	5,071,968	31.6	ブロック担当者
佐賀県	6	7.1	849,788	5.3	都道府県担当者
長崎県	6	7.1	1,426,779	8.9	ブロック担当者
熊本県	6	7.1	1,817,426	11.3	都道府県担当者
大分県	6	7.1	1,196,529	7.5	ブロック担当者
宮崎県	3	3.6	1,135,233	7.1	ブロック担当者
鹿児島県	11	13.1	1,706,242	10.6	都道府県担当者
沖縄県	5	6.0	1,392,818	8.7	ブロック担当者
山口県	3	3.6	1,451,338	9.0	都道府県担当者

耐熱性プロテアーゼによるプリオン蛋白質の分解と二次感染予防法の確立

研究分担者：古賀 雄一 大阪大学大学院工学研究科

研究協力者：清水 七海 大阪大学大学院工学研究科

研究要旨（耐熱性プロテアーゼによるプリオン蛋白質の分解と二次感染予防法の確立）

熱安定性の高いプロテアーゼによる異常プリオンタンパク質の分解及び感染性の評価を行い、プリオンの二次感染予防を目的とした洗浄剤の開発を行った。本酵素単体もしくは酵素を有効成分とする試作洗浄剤を用いて、プリオン感染マウスの脳ホモジネートに含まれる PrP^{Sc} を不活化処理し、その感染性低減効果の定量的評価を行った。

A. 研究目的（耐熱性プロテアーゼによるプリオン蛋白質の分解と二次感染予防法の確立）

本研究ではプリオン蛋白質（PrP）を分解し二次感染予防する酵素洗浄剤の開発を目的とした。これまでに超好熱菌由来プロテアーゼでプリオン蛋白質を酵素分解できることを確認している（BMC Biotechnology, 2013, 13,19）が、分解産物の感染性の有無は不明であった。また、実用的なプリオン蛋白質の酵素分解法についても検討する必要がある。本年度は非 SDS 系の界面活性剤を用いた酵素入り洗浄剤を試作し、プリオン分解特性の評価を行った。

B. 研究方法

洗浄用酵素として、超好熱菌由来プロテアーゼ Tk-SP を実用化するためには、本酵素を大量生産できる系を確立する必要がある。しかし、本酵素はプロテアーゼ活性が大腸菌等発現宿主の生育を阻害するため通常の生産方法を取ることができない。そこで、セルフスプライシング能を持つペプチド配列インテインを Tk-SP の構造形成コアに融合し、酵素を

不活化して生産した後に、自己触媒的に再活性化する生産法を検討した。

Tk-SP と界面活性剤、キレート剤、pH 調整剤などを混合した洗浄剤試作品を作成した。酵素活性、保存安定性、プリオン分解能力の評価を行った。培養細胞を用いた感染性の評価を行った。感染に係る実験は徳島大学において行い、その他は大阪大学で実施する。

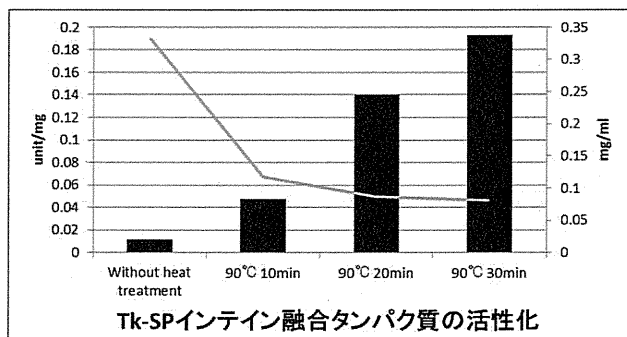
（倫理面への配慮）

実験動物に必要以上の苦痛を与えないことを旨とし、発症後の速やかな安楽死を行った。研究計画および倫理面での配慮については研究実施機関の承認を得、また、当機関の規則にのっとり実施した。

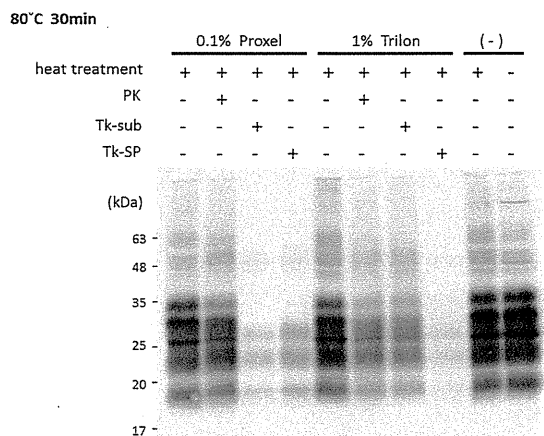
C. 研究結果

インテイン配列を活用した Tk-SP 発現系の構築を行った。超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* 由来 Cell division control protein(Tk1620)に含まれる mini intein は温度依存的にセルフスプライシングすることができる。本配列を Tk-SP の 359 番目の Ser の前に挿入した融合タンパク質遺伝子を設計し、大腸菌菌体内で発現させた。野生型酵素

では毒性を示し大腸菌は宿主として適さないが、本融合タンパク質は大腸菌が生育し、タンパク質として発現していることも確認できた。発現後のタンパク質を熱処理すると経時的に酵素の比活性が上昇し、Tk-SP が活性化していることが示された。一方でタンパク質濃度が低下していた。



Tk-SP を有効成分とする洗浄剤の試作を行った。洗浄剤組成物として、陽イオン界面活性剤 2 種、両性界面活性剤、キレート剤の酵素との相性を検討した。各成分と酵素を混合し、RML 感染脳ホモジネートに加えて加熱し、*in vitro* での PrP^{Sc} 分解活性をウエスタンブロットによって検討した。

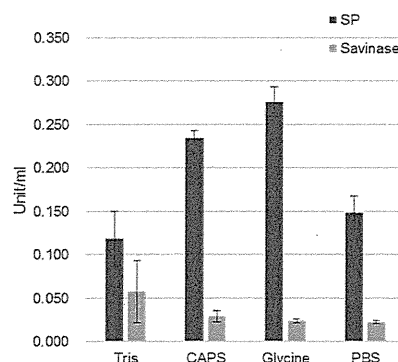


洗浄剤成分とプロテアーゼによるPrP^{Sc}分解

一般的なプロテアーゼ PK に比べ、超好熱菌由来プロテアーゼ (Tk-sub、Tk-SP) は PrP^{Sc} に対する分解活性が高い。しかし、キレート成分 (Trilon) 存在下では Tk-SP のみが、強い分解活性を示す事がわかった。

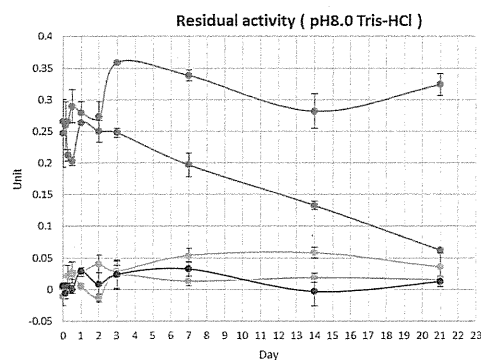
これらの洗浄剤成分を組合せた試作品を検

討した。洗浄有効成分として陽イオン界面活性剤 2 種、キレート剤はそれぞれ 5%最終濃度になるように調整した。また洗浄剤の濁りを抑制するために両性界面活性剤も終濃度 5%まで添加した。これらの組成物に酵素を加え、pH7~9.5 で酵素活性に与える影響を検討した。



洗浄剤中のプロテアーゼ活性のpH依存性

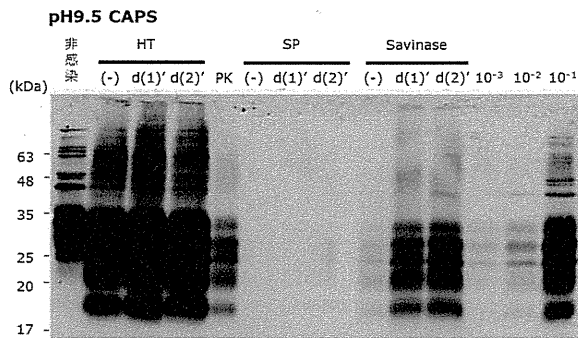
また、洗浄剤を 40°C で保存し、洗浄剤組成物中での酵素の保存安定性を検討した。その結果、洗浄剤存在下では Tk-SP の半減期が 2 週間程度であることが分かった。



洗浄剤中での酵素活性の保存安定性 オレンジ: Tk-SP、ピンク: Tk-SPと洗浄剤

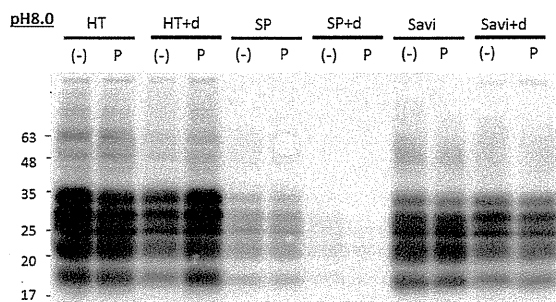
上記洗浄剤を用いて RML 感染脳ホモジネートに加えて加熱し、*in vitro* での PrP^{Sc} 分解活性をウエスタンブロットによって検討した。通常のプロテアーゼ (PK、サビナーゼ) と熱を加えると PrP^{Sc} の分解はある程度進むが、10⁻² の低減効果しかない。一方、Tk-SP では 10⁻³ 以上の低減効果が得られている。また、洗浄剤と Tk-SP を共存させると効率的に

分解が進むことが確認できた。



試作洗浄剤でのPrP^{Sc}分解能の比較

試作品洗浄剤で分解した PrP^{Sc} の感染性を検証するために、マウス神経芽細胞への感染試験を行った。感染後の細胞を継代し PrP^{Sc} の蓄積量で感染性を検証した。



PrP^{Sc}蓄積量による感染性の比較

Tk-SP と界面活性剤を組み合わせることで PrP^{Sc} の蓄積の遅れが認められた。

D. 考察

Tk-SP とインティンを融合することで、毒性を抑制して大腸菌大量発現系を構築することに成功した。また、熱処理によって自己触媒的に Tk-SP が活性化することが確認できた。おり生産性を低下させているという問題点も明らかになった。

医療用洗浄剤としての実用化を目指して、陽イオン界面活性剤 2 種類、キレート剤、両性界面活性剤を組み合わせた洗浄剤に酵素を加えたが、Tk-SP は洗浄剤存在下で安定に酵素活性を発揮できることが明らかとなった。また、洗浄剤と Tk-SP を組み合わせることにより、PrP^{Sc} が効率的に進むことも確認でき

た。これは脳ホモジネートに含まれる脂質などの成分が界面活性剤により可溶化し、また、タンパク質の疎水面を界面活性剤が露出させたために、会合状態が解消されて PrP^{Sc} と Tk-SP の接触機会が増えたためと考えられる。

Tk-SP の分解効率の高さに比例して感染性の低減も認められた。一方で、界面活性剤が細胞毒性を示すことから、感染性の検証には今後の動物実験が必要と考えられる。

E. 結論

プリオン分解が可能なプロテアーゼとして Priozyme が製品化されているが、耐熱性、界面活性剤耐性がないため使用条件が限定されており医療現場に普及していない。また、現在医療用洗浄剤に使用されている subtilisin 系プロテアーゼは今回用いた界面活性剤存在下で活性を失うことから、本酵素は界面活性剤存在下で熱をかけて洗浄する事が可能な初めての洗浄用酵素である。

[参考文献]

[雑誌] 著者名. 題名. 誌名. 発行年: 巻数; 頁

[書籍] 著者名. 題名. In: 編集者名・編. 書籍名, 発行地, 発行所名, 発行年; 頁-頁.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表 (2015/4/1~2016/3/31 発表)

1. 論文発表

Azumi Hirata, Akikazu Sakudo, Kazufumi Takano, Shigenori Kanaya and Yuichi Koga, Effects of Surfactant and a Hyperthermostable Protease on Infectivity of Scrapie-Infected Mouse Brain Homogenate. Journal of Biotechnology and Biomaterials 2015, 5, 3 1000194

2. 学会発表

発表者名. 題名. 学会名. 発表地, 発表日.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む.)

1. 特許取得

名称: 新規なプロテアーゼおよびその利用

発明者: 金谷茂樹、チタ フーパオ、高野和文、古賀雄一

出願番号PCT/JP2009/063547

登録番: 5339543 (国内)、8535928 (米国)、
ZL200980130490.4 (中国)、欧州で許可通知受領済み

2. 実用新案登録

3. その他

プリオンタンパク質の異常型構造への分岐とプリオン病の予防

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：本田 諒 岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科

山口圭一 岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科

研究要旨

ストップフロー法、連続フロー法、及びNMRによる水素・重水素交換反応を用いた詳細な速度論的解析により、プリオン蛋白質の巻き戻り過程は、U（変性状態）→I（中間状態）→A（MG状態）→N（天然状態）の順に進むことが分かった。このとき、A状態は、オリゴマー形成への分岐点となる。A状態では、ヘリックスIは変性しており、ヘリックスII及びIIIは、一部不安定化している状態にあることも分かった。従って、N型を安定化させ、A型生成を抑制する薬剤が、プリオン病の予防に役立つ。現在、治験に向けた準備が行われているP092塩は、まさにこの作用点に働く治療薬候補化合物である。

A. 研究目的

感染性のプリオン蛋白質は凝集する。凝集体の全てが感染性を有するわけではないが、他のプリオンライクなタンパク質の凝集体も、多かれ少なかれ感染性を有することが明らかになってきている。従って、プリオン蛋白質が構造変化を起こした場合、どの段階から凝集体（オリゴマー）形成に進むのか？を原子分解能で知ることは、発症予防や治療薬設計の観点からも極めて重要である。

我々は、詳細な速度論的解析を行うことにより、天然構造とオリゴマー構造の分岐点に位置する構造がA型であることを突き止めた。

B. 研究方法

ストップフローや連続フローによる速度論的解析を主に用いた。また、NMR検出による水素・重水素交換、ゲル濾過HPLCによる凝集体のポピュレーション解析を用いた。

（倫理面への配慮）

該当なし

C. 研究結果

プリオン蛋白質の巻き戻り過程は、U（変性状態）→I（中間状態）→A（MG状態）→N（天然状態）の順に進む。このとき、A状態は、オリゴマー形成への分岐点となることが判明した。A状態では、ヘリックスIは変性しており、ヘリックスII及びIIIは、一部不安定化している状態にある。

【考察】オリゴマーへの分岐点であるA状態が、天然状態の近傍に存在することが分かった。これは、わずかな環境変化による天然構造の揺らぎが、オリゴマー形成の引き金になることを示している。この微妙なバランスを、P092塩のような低分子化合物により変えることにより、異常型は激減すると考えられる。