

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等政策研究事業（難治性疾患政策研究事業）
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

医原性プリオン病である、硬膜移植後 CJD と 成長ホルモン製剤投与後 CJD について

研究分担者：北本哲之 東北大学大学院医学系研究科
研究協力者：毛利資郎 東北大学大学院医学系研究科

研究要旨 我々は、硬膜移植後 CJD の 30%を占める V2 プリオン感染に関して従来からの消毒法が有効か否かを検討中である。今年度は、硬膜移植後 CJD と比較して V2 プリオンの感染が多いと報告されている英国例ではなく、フランス症例と同様に V2 プリオンの比率が多いかを実際のフランス例を用いて解析を行った。2016 年度の班会議でコドン 129MM 症例 3 例、MV 症例 2 例を提示したが今年度は実際の感染実験の結果を報告する。なお、感染実験は観察期間が 1 年 2 ヶ月であり、途中経過であるが現時点で 129V/V ノックインマウスが発症中であり、129M/M マウスは同じ時期に接種したものの発病には至っていない。現時点での感染実験結果からは、接種したプリオンはすべて V2 プリオンと判断して矛盾しない。

A. 研究目的

わが国で数多く報告されている医原性プリオン病である硬膜移植例と比較するために、英国とフランスでの成長ホルモン製剤 (hGH) による医原性プリオン病を検索してきた。成長ホルモン製剤は、製薬会社が作製したものではなく、英国、フランスの研究機関がそれぞれ独自に作成したものであり、剖検例の下垂体から精製したものである。ちなみに、英国の成長ホルモン製剤では、1 ロット作製するために 40 万例以上の下垂体が使用されており、この中にプリオン病の剖検例が含まれていたと考えられている。硬膜も下垂体もヨーロッパの剖検症例から得たものであるが、わが国の硬膜移植後 CJD がヨーロッパの sCJD の M1 (70%) と V2 プリオン (30%) の頻度どおり、M1 プリオンが 70%、V2 プリオンが 30% であるのに比較して、英国の hGH-CJD では M1 プリオンが 5%、V2 プリオンが 95% と全く sCJD の頻度と異なっている (参考文献)。本当にフランスの hGH 由来の CJD でも同様の頻度なのかを、サルペトリエール病院からサンプルを取り寄せ検討した。

B. 研究方法

{材料}

サルペトリエール病院から、hGH-CJD と診断

された 5 症例の凍結脳を手に入れた。J-43~47 と各症例に番号化した。遺伝子検査では、コドン 129Met/Met が 3 例、コドン 129Met/Val が 2 例であった。

{方法}

1. 遺伝子検査。凍結脳から DNA を抽出してサーベイランスで行っているのと同じ方法で各症例の遺伝子解析を行った。
2. ウェスタンブロット。部分精製したプリオン分画をプロテアーゼ処理後ウェスタンブロット解析をおこなった。
3. 感染実験。10%脳乳剤を作製し、Ki-129Met/Met と Ki-129Val/Val マウスを用いて頭蓋内投与により感染実験を行っている。

(倫理面への配慮)

遺伝子解析に関しては、所属施設の倫理審査の許可を得て行っている。また動物実験に関しても、感染実験の許可を受けて行っている。

C. 研究結果

遺伝子解析、ウェスタンブロットの結果を以下にまとめる

J-43 MMiK

J-44 MV2
 J-45 MV2
 J-46 MMiK
 J-47 MMiK

また、凍結脳を一部ホルマリン固定後、組織学的に検討した結果全ての症例でクル斑を認めた。129Val を基質とした PMCA を行うと全ての症例で増幅することが可能であった。これらの結果からはすべて V2 プリオンの感染の可能性が最も高いことが解ったが、感染性を直接調べる感染実験を行っている。

現時点で発病しているマウスは、すべて Ki-129V/V マウスであった。なお、J-46 サンプルは bacterial contamination などのため感染実験はすこし遅れて進行中である。

J-43 (MM genotype) Ki-129V/V incubation period
 311±25.3 days (6/6)
 J-44 (MV genotype) Ki-129V/V incubation period
 312,401 days (2/2)
 J-45 (MV genotype) Ki-129V/V incubation period
 374±22.6 days (5/5)
 J-47 (MM genotype) Ki-129V/V incubation period
 325±8.5 days (5/5)

結果は、すべての Ki-129V/V マウスへの感染が成立しており、300 日～400 日の潜伏期間であった。Ki-129M/M マウスはいまだ経過観察中であり、発病は見られていない。

D. 考察

いまだ途中経過観察中であるが、現時点での感染実験の結果は、フランスの成長ホルモン製剤投与後 CJD はすべて V2 プリオンとして矛盾しないという結果である。今後、Ki-129M/M マウスの発病を待つてウエスタン解析まで行う予定である。途中経過ながら、今年度の感染実験の結果と、2017 年報告された英国での成長ホルモン製剤による CJD の報告から M1 プリオンに相当する症例はごく少なく、ほとんどの症例が V2 プリオン感染であることが明らかとなった。成長ホルモン製剤も硬膜もヨーロッパの CJD がその感染源である。我が国の硬膜移植症例は 70%が M1 プリオン、30%が V2 プリオン

とヨーロッパの孤発性 CJD の頻度とほぼ同じ頻度である。しかし、成長ホルモン製剤による医原性 CJD では、この頻度を反映せず圧倒的に V2 プリオンが多いことが明らかになりつつある。成長ホルモン製剤と硬膜の違いは、その使用(投与)場所である。成長ホルモン製剤は、筋肉内注射か皮下注射という末梢ルートからの投与であるのに比較して、硬膜は頭蓋内で直接使用されほぼ脳内投与と考えてよい。これらの投与方法の違いによって、感染するプリオンが異なることは最近の詳細なサーベイランス調査により初めて明らかになった事実である

E. 結論

硬膜移植後 CJD と比較して、成長ホルモン製剤投与後 CJD では圧倒的に V2 プリオン感染の比率が多い。

[参考文献]

1) Ritchie DL, Barria MA, Peden AH, Yull HM, Kirkpatrick J, Adlard P, Ironside JW, Head MW. UK Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease: investigating human prion transmission across genotypic barriers using human tissue-based and molecular approaches. *Acta Neuropathol* 133:579-595, 2017.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Iwasaki Y, Kato H, Ando T, Mimuro M, Kitamoto T, Yoshida M. MM1-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease with 1-month total disease duration and early pathologic indicators. *Neuropathology* 37:420-425, 2017.
 2) Iwasaki Y, Saito Y, Aiba I, Kobayashi A, Mimuro M, Kitamoto T, Yoshida M. An autopsied case of MV2K + C-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease presenting with widespread cerebral cortical involvement and Kuru plaques. *Neuropathology* 37:241-248, 2017.
 3) Iwasaki Y, Mori K, Ito M, Akagi A, Mimuro M, Kitamoto T, Yoshida M. An autopsy case of Creutzfeldt-Jakob disease with a prion protein gene

codon 180 mutation presenting with pathological laughing and an exaggerated startle reaction. *Neuropathology* 37:575-581, 2017.

4) Hayashi Y, Iwasaki Y, Yoshikura N, Asano T, Mimuro M, Kimura A, Satoh K, Kitamoto T, Yoshida M, Inuzuka T. An autopsy-verified case of steroid-responsive encephalopathy with convulsion and a false-positive result from the real-time quaking-induced conversion assay. *Prion* 11:284-292, 2017.

5) Fernández-Borges N, Espinosa JC, Marín-Moreno A, Aguilar-Calvo P, Asante EA, Kitamoto T, Mohri S, Andréoletti O, Torres JM. Protective effect of val₁₂₉-PrP against bovine spongiform encephalopathy but not variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Emerg Infect Dis* 23:1522-1530, 2017.

6) Takeuchi A, Kobayashi A, Morita M, Kitamoto T. Application of protein misfolding cyclic amplification for the rapid diagnosis of acquired Creutzfeldt-Jakob disease. *Med Res Arch* 5:1-11, 2017.

7) Kobayashi A, Kitamoto T, Mizusawa H. Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease. *Handb Clin Neurol*, in press.

8) Hayashi Y, Yamada M, Kimura A, Asano T, Satoh K, Kitamoto T, Yoneda M, Inuzuka T. Clinical findings of a probable case of MM2-cortical-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease with antibodies to anti-N-terminus of α -enolase *Prion* 11:454-464, 2017.

9) Akagi A, Iwasaki Y, Mimuro M, Kitamoto T, Yamada M, Yoshida M. Pathological progression of genetic Creutzfeldt-Jakob disease with a PrP V180I mutation. *Prion* 12:54-62. 2018.

10) Cali I, Cohen ML, Haik S, Parchi P, Giaccone G, Collins SJ, Kofskey D, Wang H, McLean CA, Brandel JP, Privat N, Sazdovitch V, Duyckaerts C, Kitamoto T, Belay ED, Maddox RA, Tagliavini F, Pocchiari M, Leschek E, Appleby BS, Safar JG, Schonberger LB, Gambetti P. Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease with amyloid- β pathology: an international study. *Acta Neuropathol Commun* 6:5, 2018.

11) Munesue Y, Shimazaki T, Qi Z, Isoda N, Sawa H, Aoshima K, Kimura T, Mohri S, Kitamoto T, Kobayashi A. Development of a quick bioassay for the evaluation of transmission properties of acquired prion diseases. *Neurosci Lett* 668:43-47, 2018.

12) Ito Y, Sanjo N, Hizume M, Kobayashi A, Ohgami T, Satoh K, Hamaguchi T, Yamada M, Kitamoto T, Mizusawa H, Yokota T. Biochemical features of genetic Creutzfeldt-Jakob disease with valine-to-isoleucine substitution at codon 180 on the prion protein gene. *Biochem Biophys Res Commun* 496:1055-1061, 2018.

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

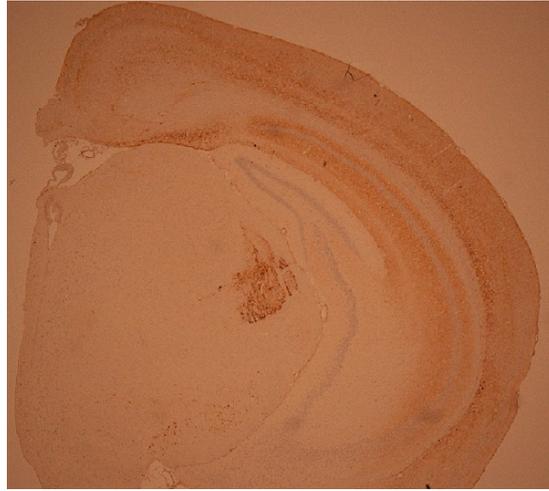
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



J-44 の脳乳剤を接種した Ki-129V/V マウスの免疫染色。大脳皮質、海馬、視床にシナプス型の異常型プリオン蛋白が沈着している。