

厚生労働行政推進調査事業費補助金（難治性疾患政策研究事業）

（総合）分担研究報告書

研究課題：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

プリオン病サーベイランスにおける、 ヒトプリオン病患者の髄液中のバイオマーカーの解析

研究分担者：佐藤克也

長崎大学医歯薬学総合研究科

運動障害リハビリテーション分野

研究協力者：西田教行

長崎大学医歯薬学総合研究科感染分子解析学

研究要旨

平成 23 年 4 月 1 日から平成 30 年 11 月 1 日に測定依頼のあった 4662 症例について検討を行った。この 4213 症例について髄液中のバイオマーカーの解析を行った。プリオン病サーベイランス委員会にて検討され、プリオン病と診断された症例数は 2632 症例であった。髄液検査に依頼された症例の中、孤発性プリオン病は 798 症例、遺伝性プリオン病は 132 症例、獲得性プリオン病は 3 症例であった。非プリオン病は 1701 症例であり、非プリオン病の症例では症候性てんかん、アルツハイマー型認知症、レビー小体型認知症、前頭側頭型認知症、傍腫瘍症候群であった。ヒトプリオン病患者における孤発性プリオン病の髄液中のバイオマーカー(14-3-3 蛋白 WB, 14-3-3 蛋白 ELISA, 総タウ蛋白, RT-QUIC 法)では感度 79.8%, 74.1%, 75.7%, 71.8% 特異度は 82.2%, 88.9%, 77.2%, 99.3% であった。RT-QUIC 法は 100%ではなく、偽陽性症例は 15 例であった。早期でバイオマーカーと異常プリオン蛋白試験管内増幅法 (RT-QUIC 法) で陰性だった症例で 1 か月後の再提出で陽性になった症例が 8 例あった。

プリオン病患者の髄液以外の生体材料からプリオン活性の測定を目指して、各臓器のプリオン活性の測定について測定した。遺伝性プリオン病患者の上部消化管からのプリオン活性は脳組織に近似したものであった。

A. 研究目的

プリオン病サーベイランスにおける、ヒトプリオン病患者の髄液中におけるバイオマーカーの有効性を明らかにすることを研究の課題の目的とする。

感染分子解析学教室・医療科学専攻保健科学分野に依頼された検体数は 4213 症例であった。

プリオン病患者の髄液以外の生体材料からプリオン活性の測定について測定を行った。

B. 研究方法

平成 23 年 4 月 1 日から平成 30 年 11 月 1 日までの長崎大学医歯薬学総合研究科

（倫理面への配慮）

研究環境・生命倫理・安全対策に関わる全

般を所掌する部門があり、人に関わる研究・動物実験を伴う研究・遺伝子組換え実験を伴う研究のすべてが、機関長への申請の手続きを必要とする。機関長から付託された全学的メンバーで構成される各種実験審査委員会(倫理審査委員会、動物実験委員会、組換え DNA 実験委員会)において研究内容が審査され、研究環境・生命倫理・安全対策に問題がなく法律規則を順守していることが確認されたのちに、機関長から許可される体制が取られている。研究開始後は、人に関わる研究では毎年、動物実験を伴う研究及び遺伝子組換え実験を伴う研究では各機関が定める時期毎に、研究状況を機関長に報告することになっている。検査および実験については、医学部共同生物災害防止実験施設内の BSL2,BSL3 実験室を利用し、病原体の拡散防止には万全を期している。

C. 研究結果

1) 髄液検査に依頼された中で平成 21-29 年度プリオン病サーベイランス委員会にて検討された症例数の中で、986 症例でプリオン病は 891 症例、遺伝性プリオン病は 92 症例、獲得性プリオン病は 3 症例であった。(表 1)

表 1.
ヒトプリオン病患者の髄液における
バイオマーカーの解析

	14-3-3 protein ELISA	14-3-3 protein WB	total tau protein	RT-QUIC assay
感 度	79.8%	74.1%	75.7%	71.8%
特 異 度	82.2%	88.9%	77.2%	99.3%

2) 非プリオン病は 1648 症例であり、非プリオン病の症例では症候性てんかん、アルツハイマー型認知症、レビー小体型認知症、前頭側頭型認知症、傍腫瘍症候群であった。(表 2)

表 2.
ヒトプリオン病患者の髄液における
バイオマーカーの解析

	14-3-3 protein ELISA	14-3-3 protein WB	Total tau protein	RT- QUIC assay
sporadic	89.6%	79.1%	83.3%	75.9%
genetic	41.3%	36.8%	43.3%	39.8%
acquired	50.0%	50.0%	50.0%	50.0%

3) ヒトプリオン病患者における孤発性プリオン病の髄液中のバイオマーカー(14-3-3 蛋白 WB,14-3-3 蛋白 ELISA,総タウ蛋白,RT-QUIC 法)では感度 79.8%,74.1%,75.7%,71.8% 特異度は 82.2%,88.9%,77.2%,99.3%であった。

4) 研究の中で早期症例について再検討を行った。特に早期 RT-QUIC 法陰性例症例に対してその後 4 週間後に再検討を行った

た。(表 3)

表 3. 再検依頼についてプリオン病

14-3-3 protein	total tau protein	RT-QUIC
- → +	562 → 1369	- → +
- → +	874 → 3238	- → +
- → +	1021 → 8812	- → +
- → +	123 → 1329	- → +
- → +	673 → 1432	- → +
- → +	1192 → 2918	- → +
- → -	983 → 834	- → +
- → -	711 → 743	- → +

5) RT-QUIC 法は 100%ではなく、偽陽性症例は 15 例であった。(表 4)

表 4.

QUIC法における偽陽性症例

- Primary epilepsy 5 cases
- Symptomatic epilepsy due to CVA 2 cases
- Symptomatic epilepsy due to encephalitis 1 case
- Symptomatic epilepsy due to Hashimoto's encephalopathy 1 case
- Hashimoto's encephalopathy 1 case
- FTLT-DTP-43 encephalopathy 1 cases
- Alzheimer's disease 1 case
- Hypoxemic encephalopathy 2 cases
- NMDA encephalopathy 1 case

6) PSD が出現される時期は QUIC 法の検出率は高くなる。又現在まで偽陽性が 15 例あったが、1 例は剖検にて CJD と判断され、又経過中 1 例 CJD と診断された。

7) プリオン病患者の各臓器からのプリオン活性について測定した。(表 5, 表 6)

表 5. プリオン病患者の各臓器からのプリオン活性

	log SD ₅₀ /g tissue											
	Patient 1			Patient 2			Patient 3			Patient 4		
	1 st	2 nd	3 rd	1 st	2 nd	3 rd	1 st	2 nd	3 rd	1 st	2 nd	3 rd
脾	-	-	-	6	5.75	6	5.5	<5.25	<6.25	5.25	6.5	5.75
腎	5.75	<4.75	7	5.75	<6.0	6.5	5.5	5.5	-	<5.5	6.5	6.75
肺	-	-	-	6.75	7	6.75	<5.25	<5.5	<5.75	5.25	5.25	<5.75
肝	<6.25	<6.5	6.25	6.75	6.75	7.25	<5.25	<6.5	<6.0	-	-	-
脳	7	6.5	5.75	6.75	6.5	6.25	<5.0	-	<5.25	7.25	7.5	7.5

表 6. プリオン病患者の各臓器 (消化管) からのプリオン活性

	log SD ₅₀ /g tissue											
	Patient 1			Patient 2			Patient 3			Patient 4		
	1 st	2 nd	3 rd	1 st	2 nd	3 rd	1 st	2 nd	3 rd	1 st	2 nd	3 rd
血液	8.2	8.43	8.5	8.43	7.75	7.53	N.E.	N.E.	N.E.	N.D. ⁷⁴	≤ 6.57	≤ 6.70
胃	7	≤ 6.90	7.2	N.D.	≤ 6.57	≤ 6.23	≤ 6.80	≤ 6.67	≤ 6.57	N.D.	N.D.	6.5
十二指腸	7.43	7.57	6.3	≤ 5.75	6.41	6.06	8.1	8.5	8.34	N.E.	N.E.	N.E.
小腸	≤ 6.80	7.12	7.29	6.5	6.5	6.33	N.D.	≤ 6.67	N.D.	≤ 5.80	6.67	≤ 6.00
生血	7.5	8	7.71	N.D.	≤ 6.75	≤ 6.90	N.D.	N.D.	N.D.	≤ 5.64	6.88	7.25
腸行結腸	6.14	≤ 5.80	≤ 5.90	≤ 5.80	7	≤ 5.56	≤ 5.57	6.57	6.42	N.E.	N.E.	N.E.
盲腸結腸	N.D.	N.D.	N.D.	N.E.	N.E.	N.E.	7.8	7.5	7.5	N.D.	≤ 5.67	6.12
総	9.25	9.5	9.5	9.75	9	8.75	9.75	10.5	9.75	10.25	10	10

D. 考察

現在測定している髄液中のバイオマーカーについて診断に有用であると考えられる。さらに髄液以外の生体材料からのバイオマーカーの検討が必要であると考えられる。

E. 結論

さらなる症例の蓄積は必要であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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. 2018;496:1055-1061
- 2) Maeda K, Sugihara Y, Shiraishi T, Hirai A, Satoh K. Cortical

- Hyperintensity on Diffusion-weighted Images as the Presymptomatic Marker of Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease. *Intern Med* .2018; 58(5): 727-729
- 3) Nishioka K, Suzuki M, Satoh K, Hattori N: Crossed cerebellar diaschisis in Creutzfeldt-Jakob disease evaluated through single photon emission computed tomography. *J Neurol Sci* .2018;395:88-90
 - 4) Aibara N, Ichinose K, Baba M, Nakajima H, Satoh K, Atarashi R, Kishikawa N, Nishida N, Kawakami A, Kuroda N, Ohyama K. Proteomic approach to profiling immune complex antigens in cerebrospinal fluid samples from patients with central nervous system autoimmune diseases. *Clin Chim Acta*. 2018;484:26-31
 - 5) Miyake K, Hara T, Oshima E, Kawada K, Ishizu H, Yamauchi Y, Satoh K, Kitamoto T, Takenoshita S, Terada S, Yamada N. Creutzfeldt-Jakob disease with Alzheimer pathology, presenting with status epilepticus following repeated partial seizures: a case report and literature review. *BMC Neurol*. 2018;18(1):54
 - 6) Sano K, Atarashi R, Satoh K, Ishibashi D, Nakagaki T, Iwasaki Y, Yoshida M, Murayama S, Mishima K, Nishida N. Prion-Like Seeding of Misfolded α -Synuclein in the Brains of Dementia with Lewy Body Patients in RT-QUIC. *Mol Neurobiol*. 2018; 55(5):3916-3930
 - 7) Matsubara T, Satoh K, Homma T, Nakagaki T, Yamaguchi N, Atarashi R, Sudo Y, Uezono Y, Ishibashi D, Nishida N. Prion protein interacts with the metabotropic glutamate receptor 1 and regulates the organization of Ca(2+) signaling. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020 pii: S0006-291X(20)30376-4. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.02.102.
 - 8) Satoh K, Fuse T, Nonaka T, Dong T, Takao M, Nakagaki T, Ishibashi D, Taguchi Y, Mihara B, Iwasaki Y, Yoshida M, Nishida N. Postmortem Quantitative Analysis of Prion Seeding Activity in the Digestive System. *Molecules*. 2019; 24(24)
 - 9) Hayashi Y, Iwasaki Y, Waza M, Shibata H, Akagi A, Kimura A, Inuzuka T, Satoh K, Kitamoto T, Yoshida M, Shimohata T. Clinicopathological findings of an MM2-cortical-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease patient with cortical blindness during a course of glaucoma and age-related macular degeneration. *Prion*. 2019; 13(1):124-131
 - 10) Ishibashi D, Homma T, Nakagaki T, Fuse T, Sano K, Satoh K, Mori T, Atarashi R, Nishida N. Type I interferon protects neurons from prions in in vivo models. *Brain*.

2019;142(4):1035-1050

- 11) Hayashi Y, Iwasaki Y, Waza M, Kato S, Akagi A, Kimura A, Inuzuka T, Satoh K, Kitamoto T, Yoshida M, Shimohata T. Clinicopathological findings of a long-term survivor of V180I genetic Creutzfeldt-Jakob disease. *Prion*. 2020;(1):109-117. doi: 10.1080/19336896.2020.-1739603.
- 12) T Takahashi-Iwata I, Yabe I, Kudo A, Eguchi K, Wakita M, Shirai S, Matsushima M, Toyoshima T, Chiba S, Tanikawa S, Tanaka S, Satoh K, Kitamoto T, Sasaki H. MM2 cortical form of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease without progressive dementia and akinetic mutism: A case deviating from current diagnostic criteria. *J Neurol Sci*. 2020 ;412:116759. doi: 10.1016/j.jns.2020.116759.

2. 学会発表

- 1) 佐藤克也、調漸、西田教行. 生体試料からの異常プリオンタンパクの検出による診断法開発. 第 59 回日本神経学会学術大会. 2018 年 5 月 23-26 日、北海道
- 2) Satoh K, S Shirabe. Eating behavior changed in the severity of dementia, and eating disturbance may contribute to the early admission into the facility through the observational study for two years. 4th Congress of the European Academy of Neurology (EAN 2018). Lisbon, Jun 16-19, 2018
- 3) 佐藤克也. プリオン病における異常型プリオンタンパクの顧感度検出法の開発と神経変性疾患への応用. 第 91 回日本生化学会大会. 2018 年 9 月 24-26 日、京都
- 4) 佐藤克也. アルツハイマー型認知症患者の嚥下障害とアルツハイマー型治療薬の効果. 第 19 回日本早期認知症学会学術大会. 2018 年 10 月 6-7 日、島根
- 5) 佐藤克也. 認知症患者に対するラメルテオン投与での睡眠導入剤の減量効果と転倒予防効果. 第 37 回日本認知症学会学術集会. 2018 年 10 月 12-14 日、札幌
- 6) 佐藤克也. 生体試料からの異常プリオンタンパクの検出による診断法開発. 第 23 回日本神経感染症学会総会・学術大会. 2018 年 10 月 19-20 日、東京
- 7) 佐藤克也. ヒトプリオン病患者におけるバイオマーカーの検討. 大阪. 第 60 回日本神経学会学術大会. 2019 年 5 月 25 日
- 8) 佐藤克也. RT-QUIC 法を応用したプリオン病患者のホルマリン固定能と病理ブロックからのプリオンシーリング活性の固定法の挑戦. 名古屋. 2019 年 7 月 16 日
- 9) 佐藤克也. ヒトプリオン病患者におけるバイオマーカーの検討. 第 24 回日本神経感染症学会総会・学術大会. 東京. 2019 年 10 月 11 日
- 10) 佐藤克也. 脳腫瘍が多発した肺炎球菌性髄膜炎の 1 剖検例. 第 24 回日本神経感染症学会総会・学術大会. 東

京.2019年10月11日

- 11) 佐藤克也. シヌクレイノパチーのバイオマーカー. 第37回日本神経治療学会学術集会. 横浜.2019年11月6日
- 12) 佐藤克也. Realtime quaking induced conversion (RTQuIC) 法を利用した認知症診断. 第38回日本認知症学会学術集会. 東京. 2019年11月9日

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 1) 名称： α -シヌクレイン検出方法、出願番号：特願2016-231861、発明者：西田 教行、佐藤 克也、新 竜一郎、布施 竜一郎、布施 隆行、佐野 隆行、佐野 和憲、出願人：国立大学法長崎大学、 学校法人福岡大学、出願日：2016年11月29日
- 2) 名称：14-3-3 蛋白 γ アイソフォーム特異的 ELISA、出願番号：特願 2011-244809、発明者：佐藤克也、調漸、宮崎敏昭、出願人：国立大学法人長崎大学、出願日：2011年11月8日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし