

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）
 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

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 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 保健科学分野

研究要旨

【目的】ヒトプリオン病患者の髄液中の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。

【方法】2011年4月1日から2020年8月31日までの長崎大学感染分子解析学教室・運動障害リハビリテーション学講座に依頼された検体数は4153症例であった。

【結果】髄液検査に依頼された中で平成18-令和2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、4153症例中でプリオン病は2030症例、孤発性プリオン病は1592症例、遺伝性プリオン病は427症例、獲得性プリオン病は11症例であった。非プリオン病は2123症例であった。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 WB法・ELISA,総タウ蛋白,RT-QUIC法)では感度は79.3%,81.4%,80.1%,70.6% 特異度は81.2%,80.4%,86.4%,97.6%であった。RT-QUIC法は100%ではなく、擬陽性症例は25例であった。

【考察】早期におけるQUIC法の検出は低い、PSDが出現される時期はQUIC法の検出率は高くなる。又現在まで擬陽性が25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。

【結論】さらなる症例の蓄積と特異度を高めるRT-QUIC法の改良が必要であると考えられた。又髄液以外からの異常プリオン蛋白の検出法を開発すべきであると考えられる。

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の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。

B. 研究方法

2011年4月1日から2020年8月31日までの長崎大学感染分子解析学教室・運動障害リハビリテーション学講座に依頼された検体数は4153症例であった。

(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18-令和2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、4153症例中でプリオン病は2030症例、孤発性プリオン病は1592症例、遺伝性プリオン病は427症例、獲得性プリオン病は11症例であった。非プリオン病は2123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 WB法・ELISA,総タウ蛋白,RT-QUIC法)では感度は79.3%,81.4%,80.1%,70.6% , 特異度は81.2%,80.4%,86.4%,97.6%であった。RT-QUIC法は100%ではなく、擬陽性症

例は25例であった。

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 WB	14-3-3 protein ELISA	total tau protein	RT-QUIC assay
感度	79.30%	81.40%	80.10%	70.60%
特異度	81.20%	80.40%	86.80%	97.60%

2) 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80.1%, 81.7%, 81.3%, 79.4%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

	総数	14-3-3 protein WB	14-3-3 protein ELISA	Total tau protein	RT-QUIC assay
孤発性	1,592	80.10%	81.70%	81.30%	79.40%
遺伝性	427	71.40%	74.00%	71.90%	38.40%
獲得性	11	90.90%	90.90%	72.70%	72.70%

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における発症期間からの感度 (definite casesにおける) を示す(表3)

表 3. 孤発性プリオン病 (definite cases における 158 症例) バイオマーカーの感度発症時期から髄液採取までの期間

	総数	14-3-3 protein WB	14-3-3 protein ELISA	Total tau protein	RT-QUIC assay
before the onset	2	100%	100%	100%	100%
0-4 weeks	13	85.70%	100%	100%	79%
4-8 weeks	39	94.70%	94.70%	94.70%	97.40%
9-12 weeks	21	95.80%	95.80%	91.70%	79.20%
12-24 weeks	52	77.10%	82.90%	88.60%	82.90%
7-9 month	10	75.00%	81.30%	62.50%	50.00%
10-12 month	5	62.50%	62.50%	62.50%	50.00%
13-24 month	11	70.00%	70.00%	80.00%	60.00%
25-36 month	2	0%	50.00%	50.00%	50.00%
> 36 month	3	100%	100%	100%	67%

4) 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25症例

Primary epilepsy	4 症例
Symptomatic epilepsy due to CVA	2 症例
Symptomatic epilepsy due to encephalitis	1 症例
FTLD-TDP-43 encephalopathy	2 症例
Corticobasal syndrome	2 症例
Steroid responsive encephalopathy	2 症例
NMDA encephalopathy	1 症例
Progressive supranucleus palsy	1 症例
Wilson's disease	1 症例
Multiple System Atrophy	1 症例
Neurosyphilis	1 症例
Leukoencephalopathy	1 症例
Viral encephalitis	1 症例
Dural arteriovenous fistula	1 症例
Encephalopathy due to unknown	1 症例

5) 新規診断機銃の提案

孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病の新規診断基準 2021年 Lancet Neurology 草案

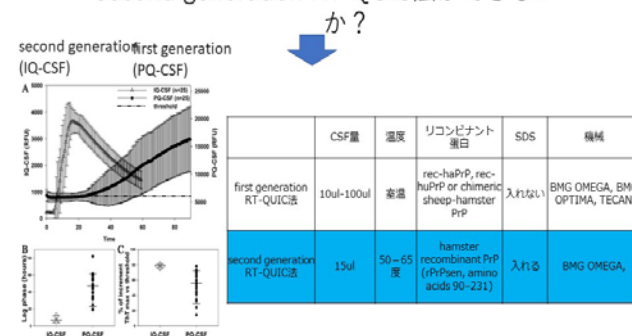
- A. 確実例definite
特徴的な病理所見又はWestern blotや免疫染色法で脳に異常プリオン蛋白を検出。
- B. ほぼ確実例probable
 - I. 急速進行性認知症。
 - II. 臨床症状
 - a. ミオクローヌス
 - b. 視覚または小脳症状
 - c. 錐体路または錐体外路徴候
 - d. 無動性無言
 - III. 脳波上で周期性同期性放電(PSD)
 - IV. MRI拡散強調画像にて大脳皮質・基底核領域に高信号領域を示す
 - V. 髄液又は他の組織中のRT-QUIC法にて異常プリオン蛋白を検出
- C. 疑い例possible 上記のBの1および2の2つ以下,罹病期間が2年未満。

6) second generation QUICへの挑戦

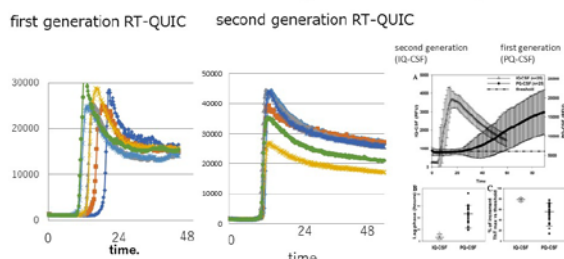
First generation QUICと second generation QUICとでは検出感度においてMM1で検出感度の違いはないが、MM2の検出感度はFirst generation QUICで低い。しかしながらsecond generation QUIC法における偽陽性は多い。今度改善させる必要がある。

プリオン病の髄液検査の宿題

second generation RT-QUIC法ができない



プリオン病の first と second generation RT-QuIC法



- first と second generation RT-QuIC法ではほぼ違いはない。
- 多数例での検討が必要。
- 問題点はすでに偽陽性が今まで2倍。
- 陽性と陰性の基準をどうするのか再検討する必要がある

D. 考察

早期における QUIC 法の検出は低いが、PSD が出現される時期は QUIC 法の検出率は高くなる。また現在まで擬陽性が 25 例あったが、1 例は剖検にて CJD と判断され、また経過中 1 例 CJD と診断された。

E. 結論

さらなる症例の蓄積と特異度を高める RT-QuIC 法の改良が必要であると考えられた。又髄液以外の異常プリオン蛋白の検出法を開発すべきであると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

1. 論文発表

- 1) Hamada Y, Deguchi K, Tachi K, Kita M, Nonaka W, Takata T, Kobara H, Touge T, Satoh K, Masaki T. Significance of cortical ribboning as biomarker in the prodromal phase of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Intern Med.* doi:10.2169/internalmedicine.2022; 8354-21.
- 2) Satoh K. CSF biomarkers for prion diseases. *Neurochem Int.* 155:105306, 2022
- 3) Sano K, Iwasaki Y, Yamashita Y, Irie K, Hosokawa M, Satoh K, Mishima K. Tyrosine 136 phosphorylation of α -synuclein aggregates in the Lewy body dementia brain: involvement of serine 129 phosphorylation by casein kinase2. *Acta Neuropathol Commun.* 2021; 9(1):182.
- 4) Nakagaki T, Nishida N, Satoh K. Development of α -Synuclein Real-Time Quaking-Induced Conversion as a Diagnostic Method for α -Synucleinopathies. *Front Aging Neurosci.* 2021; 13:703984. Dong TT, Akagi A, Nonaka T, Nakagaki T, Mihara B, Ta

kao M, Iwasaki Y, Nishida N, Satoh K. Formalin RT-QuIC assay detects prion-seeding activity in formalin-fixed brain samples from sporadic Creutzfeldt-Jakob disease patients. *Neurobiol. Dis.* 2021; 159:105504.

- 5) Dong TT, Satoh K. The Latest Research on RT-QuIC Assays-A Literature Review. *Pathogens.* 2021; 10(3):30.
- 6) Honda H, Mori S, Watanabe A, Sasagawa N, Sadashima S, Đông T, Satoh K, Nishida N, Iwaki T. Abnormal prion protein deposits with high seeding activities in the skeletal muscle, femoral nerve, and scalp of an autopsied case of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuropathology.* 2021; 41(2):152-158.
- 7) Fujita H, Ogaki K, Shiina T, Onuma H, Skuramoto H, Satoh K, Suzuki K. V180I genetic Creutzfeldt-Jakob disease with cardiac sympathetic nerve denervation masquerading as Parkinson's disease: A case report. *Medicine (Baltimore).* 2021; 100(2): e24294.

2. 学会発表

- 1) 赤羽寅彦, 佐藤克也: ヒトプリオン病の患者の髄液中のバイオマーカー解析. 第40回日本認知症学会学術集会. WEB東京,2021.11.26-28 (ポスター)
- 2) 佐藤克也:プリオン病の腰椎穿刺と脳脊髄液マーカー. 第36回日本老年精神医学会. WEB, 2021.9.16(口頭)
- 3) 佐藤克也:ヒトプリオン病の患者の髄液中のバイオマーカーの解析. 第62回日本神経学会学術大会. 京都,2021.5.21(口頭)
- 4) 佐藤克也:バイオマーカーを利用したプリオン病の早期診断と病態評価. 第62回日本神経学会学術大会. 京都,2021.5.19(口頭)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし