

## ＜シンポジウム(4)-5-4＞プリオン病の最新情報

### 髄液によるプリオン病の診断と鑑別診断

佐藤 克也<sup>1)</sup>

要旨：プリオン病の診断において病気の進行を考え、発症早期に正確に診断することが重要であり、治療法開発とともに、診断法の確立とくに生前確定診断法の確立が望まれている。しかしながら現在までこの生前確定診断法の技術は脳生検以外の方法は不可能であるかの如く考えられてきた。現在の診断はMR拡散強調像と髄液中の生化学マーカーにて診断率の向上がみとめられている。しかしながらこのMR拡散強調像と髄液中の生化学マーカーも確定診断法にはいたらなかった。われわれは髄液中の異常プリオン蛋白を検出する新規革新的な方法を生み出した。この方法は特異度99%であるが、感度は80～85%であるためにさらに感度が高い14-3-3蛋白のELISAの開発に成功した。今後大規模研究による髄液検査の2つの検査の併用とMR拡散強調像による診断率の解析が望まれる。

(臨床神経 2013;53:1252-1254)

Key words：プリオン病, 髄液, 14-3-3蛋白, 総タウ蛋白

#### はじめに

プリオン病をふくめた急速進行性認知症は、一般的な認知症とはことなり、認知機能障害が約1～2年以内に急速に進行する。Geschwindら<sup>1)</sup>は急速進行性認知症の曖昧な概念を整理し、一定した概念を定義づけた。プリオン病は急速進行性認知症の約30～40%を占める。1996年Hsichら<sup>2)</sup>が髄液中の14-3-3蛋白の有効性を示し、1998年WHO診断基準の補助項目の一つとなったために、プリオン病における髄液検査が重要視されるようになった。さらに現在髄液中の異常プリオン蛋白の検出法を開発・成功して以降、さらに検査の意義が高まっている。

#### 急速進行性認知症をきたす疾患

急速進行性認知症は、カルフォルニア大学サンフランシスコ校のGeschwind<sup>1)</sup>が2008年に提唱した概念であり、最初の報告では急速に認知症をきたした179症例について検討をおこなっている。その179症例中で、プリオン病患者は62%、非プリオン病は38%を示していた。非プリオン病患者の中で約39%は神経変性疾患で、22%は自己免疫関連性脳症で、6%は悪性疾患・感染症であった。

その後Josephs<sup>3)</sup>はMayo Clinicを受診し認知機能障害を呈し剖検になった神経変性疾患の中で、罹病期間が4年以内の症例であった22症例について検討をおこなった。すべての症例について剖検をおこない、病理学的診断のもとでおこなっている。約36%はクロイツフェルト・ヤコブ病

(Creutzfeldt-Jakob disease; CJD)であった。

Stoeckら<sup>4)</sup>が急速進行性認知症について約10年間(1998年～2007年)の追跡調査した10,731症例の検討では、プリオン病では約35%、神経変性疾患は28%、炎症性疾患は約7%、傍腫瘍症候群は約3%、脳血管関連疾患は約5%であった。神経変性疾患の中では、アルツハイマー型認知症が37%、脳血管性認知症が7%、レビー小体型認知症が14.4%、前頭側頭型皮質変性症が約6%であった(Fig. 1)。

上記の研究・検討結果により急速進行性認知症を来す疾患でプリオン病と鑑別すべき疾患は、アルツハイマー型認知症や前頭側頭葉変性性認知症などの神経変性疾患、橋本脳症をふくめた自己免疫関連性脳症、limbic encephalitisなどの傍腫瘍症候群や血管内悪性リンパ腫・glioblastomaなどの悪性疾患、感染症などである。

#### 髄液検査

髄液の概観・細胞数・蛋白について

プリオン病は基本的に概観・細胞数については正常である。血液のコンタミがないかぎり、獲得性プリオン病を除き、細胞数が10個以上の症例は経験がない(Table 2a)。細胞数が多いケースは感染症や傍腫瘍症候群・悪性疾患をうたがうべきである。

髄液中の総蛋白量であるが、現在までの283症例のまとめを示す(Table 2b)。多くの症例は15～60 mg/dlであり、ミオクローヌスのコントロールがひどい症例などはやや総蛋白量が高い症例が多い。獲得性プリオン病はやや総蛋白量が高

<sup>1)</sup> 長崎大学医歯薬学総合研究科感染分子解析学〔〒852-8501 長崎県長崎市坂本1丁目7-1〕  
(受付日：2013年6月1日)

いが硬膜移植例のプリオン病患者で 100 mg/dl 以上の症例を経験する。以上の結果より孤発性プリオン病患者で総蛋白量 (>60 mg/dl) が高い症例では別の疾患を鑑別疾患として挙げる必要がある。

バイオマーカーについて

#### 14-3-3 蛋白

14-3-3 蛋白は Hsich ら<sup>2)</sup> が孤発性プリオン病患者の中で孤発性 CJD 患者と正常人の脳組織を二次元電気泳動で比較・検討し、14-3-3 蛋白を同定し、CJD 患者での脳組織・脳脊髄液での特異性を示した。同年 Zerr ら<sup>5)6)</sup> が CJD 患者の脳脊髄液を Hsich と同様な方法で解析し 14-3-3 蛋白を同定し、脳脊髄液中での 14-3-3 蛋白の有用性を示した。

Stoeck ら<sup>3)</sup> が急速進行性認知症患者における 14-3-3 蛋白陽性の神経疾患・神経変性疾患を示す疾患・感度について検討されている。(Table 3, 4) 日本における髄液検査では MRI 拡散強調画像において大脳皮質で高信号領域を示す際には鑑別疾患としてプリオン病が挙げられ、検査を依頼するために、脳症や痙攣後症候群が多く、14-3-3 蛋白の感度は下がる。

#### 総タウ蛋白

1998 年 WHO の診断基準の拡大診断基準では、髄液検査では 14-3-3 蛋白が補助的診断基準項目の一つとして加えられている。日本とヨーロッパ CJD サーベイランスグループは、CJD 患者の髄液中の 14-3-3 蛋白と総タウ蛋白が診断に有効であると報告した。

一方 2002 年に Otto ら<sup>7)</sup> は 297 人の CJD 患者の脳脊髄液の 14-3-3 蛋白と総タウ蛋白の比較検討をおこなった。これらの報告では総タウ蛋白が感度 94%・特異度 90%であることを示し、14-3-3 蛋白より特異度・感度においてすぐれていることを確認した。

われわれ<sup>8)</sup> は 2004 年急速進行性認知症の中で非典型的なアルツハイマー型認知症があり、総タウ蛋白が 1,300 pg/ml を超えるような急速進行性アルツハイマー型認知症が存在する事を示した。そのため孤発性プリオン病と急速進行性アルツハイマー型認知症と鑑別が必要であると考え、リン酸化タウ蛋白と総タウ蛋白の比で鑑別することが可能であることを示した。

以上により CJD 患者の髄液中の総タウ蛋白が診断に有効であるが、急速進行性アルツハイマー型認知症ではリン酸化タウ蛋白と総タウ蛋白の比で鑑別することが可能である。

#### Real-time quaking-induced conversion (RT-QUIC) 法による異常プリオン蛋白の検出

RT-QuIC 法による異常プリオン蛋白の検出を理解するためにはプリオン病の一般的な概念を理解する必要がある。

近年<sup>9)</sup> 正常 PrP を反応基質として、試験管内で微量の異常型 PrP を検出が容易なレベルまで増幅することが可能なが報告され、それをもちいた新たな診断法の開発が検討されてきた。しかしそれぞれの動物種やプリオン株により増幅効率がことなることもあり、ヒトプリオン病での高効率の

増幅は達成されていなかった。一方、われわれは QUIC 法 (Quaking-Induced Conversion) という、ヒトプリオン病に対して非常に感度の高い異常型 PrP 増幅法を開発することに成功し、これをもちいたヒトプリオン病における髄液診断が可能であることを示した。われわれは、最近異常型 PrP 高感度増幅法 (Real-time QUIC 法, RT-QUIC 法) を開発し、ヒトプリオン病患者由来脳脊髄液中の異常型 PrP を検出することに成功した。この方法は、異常型 PrP を増幅反応の核 (シード) としてもちいて、リコンビナント PrP (rPrP) の凝集 (フィブリル形成) 反応を連続的に試験管内でおこなわせ、脳脊髄液中の異常型 PrP を増幅して検出するという方式である。感度を上げ、疑陽性反応をなくすためには、シード (異常型 PrP) 依存的な反応は抑制せず、自然発生的なフィブリル形成反応のみを可能なかぎり抑制する条件をみい出すことが必要であったが、成功しえた。

Real-time QUIC 法では、rPrP フィブリルの増幅過程を、アミロイドフィブリルに特異的に結合し、蛍光を発する、チオフラビン T (ThT) の蛍光強度を測定することによりサンプル中にふくまれる異常型 PrP の存在の有無を判定する。この方法をもちい、サンプルが多数のばあいでも非常に簡便に、かつ real-time に測定可能なシステムを構築することが可能となった。

#### おわりに

ヒトプリオン病の確実例における髄液中のバイオマーカーと RT-QUIC 法による異常プリオン蛋白の検出を正確なデータで出す必要がある。さらに多数例の検討により、孤発性ヒトプリオン病のサブタイプごとの髄液中のバイオマーカーと RT-QUIC 法による異常プリオン蛋白の感度を検討する必要がある。

一方 RT-QUIC 法による異常プリオン蛋白は特異度 100% を目指してきた方法ではあるが、偽陽性があることがわかってきた。とくに痙攣を生じる症例において、偽陽性を示すことがわかってきた。これを改善させるために、抗体を利用した免疫沈降法を利用し、RT-QUIC 法による異常プリオン蛋白を試みる方法をおこなっている。感度・特異度を徐々に改善させる方法を試みている。

※本論文に関連し、開示すべき COI 状態にある企業、組織、団体はいずれも有りません。

#### 文 献

- 1) Geschwind MD, Shu H, Haman A, et al. Rapidly progressive dementia. *Ann Neurol* 2008;64:97-108.
- 2) Hsich G, Kenney K, Gibbs CJ, et al. The 14-3-3 brain protein in cerebrospinal fluid as a marker for transmissible spongiform encephalopathies. *N Engl J Med* 1996;335:924-930.
- 3) Josephs KA, Ahlskog JE, Parisi JE, et al. Rapidly progressive neurodegenerative dementias. *Arch Neurol* 2009;66:201-207.

- 4) Stoeck K, Sanchez-Juan P, Gawinecka J, et al. Cerebrospinal fluid biomarker supported diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease and rapid dementias: a longitudinal multicentre study over 10 years. *Brain* 2012;135:3051-3061.
- 5) Zerr I, Bodemer M, Otto M, et al. Diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease by two-dimensional gel electrophoresis of cerebrospinal fluid. *Lancet* 1996;348:846-849.
- 6) Zerr I, Bodemer M, Gefeller O, et al. Detection of 14-3-3 protein in the cerebrospinal fluid supports the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* 1998;43:32-40.
- 7) Otto M, Wiltfang J, Cepek L, et al. Tau protein and 14-3-3 protein in the differential diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 2002;58:192-197.
- 8) Satoh K, Shirabe S, Eguchi H, et al. 14-3-3 protein, total tau and phosphorylated tau in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease and neurodegenerative disease in Japan. *Cellular and molecular neurobiology* 2006;26:45-52.
- 9) Atarashi R, Satoh K, Sano K, et al. Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluid by real-time quaking-induced conversion. *Nat Med* 2011;17:175-178.

#### Abstract

### CSF analysis of patients with prion disease by biomarkers and Real-time quaking-induced conversion (RT-QUIC) method

Katsuya Satoh, M.D.<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Molecular Microbiology and Immunology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences

Hsich et al reported 14-3-3 protein in CSF supports a diagnosis of human prion disease, and 14-3-3 protein is one of supportive diagnostic criteria on WHO (1998). In the presence of 14-3-3 protein and total tau protein is widely used as a surrogate marker in the pre-mortem diagnosis of human prion disease and other rapidly progressive dementia. Most recent research report that the sensitivity of 14-3-3 protein was 43%–100%, and the specificity of 14-3-3 protein was 47%–97%. And the sensitivity of total tau protein was 43%–100%, and the specificity of total tau protein was 47%–97%. In other hand we recently developed a new *in vitro* amplification technology, designated “RT-QUIC assay”, for the detection of PrP<sup>Sc</sup> in CSF of sCJD. Other group reported that CSF RT-QUIC method analysis has the potential to be a more specific diagnostic test for sCJD than current CSF tests, but their method is different from our method and their study was not enough. Now we are analyzing for the sensitivity and specificity of biomarkers and RT-QUIC method in CSF of definite cases of human prion disease, the number of definite cases of human prion disease is larger than that of other studies.

(*Clin Neurol* 2013;53:1252-1254)

**Key words:** prion disease, CSF, 14-3-3 protein, total tau protein

---