

高月 英恵 論文内容の要旨

主 論 文

Rapid and quantitative assay of amyloid-seeding activity in human brains affected with prion diseases

プリオン病患者脳組織におけるプリオン活性の迅速かつ定量的評価

高月 英恵、佐藤 克也、佐野 和憲、布施 隆行、中垣 岳大、
森 剛志、石橋 大輔、美原 盤、高尾 昌樹、岩崎 靖、吉田 眞理、
新 竜一郎、西田 教行

(PLoS ONE・10 巻 6 号 e0126930, DOI:10.1371, 2015年6月12日)
[ページ数 12]

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・新興感染症病態制御学系専攻
(主任指導教員：西田 教行 教授)

緒 言

プリオン病は異常型プリオン蛋白質（以下 PrP^{Sc}）が中枢神経系に蓄積し、認知症や運動障害を呈する致死性神経変性疾患である。ヒトのプリオン病であるクロイツフェルト・ヤコブ病（以下 CJD）はその発症要因に従って、①孤発性、②遺伝性、③感染性に分類される。そのいずれにおいても、高い感染性が中枢神経系に認められる。これまで孤発性 CJD 患者では感染性は神経系組織に限局しているとされてきたが、変異型 CJD 患者ではリンパ組織、虫垂、消化管、血液などにも感染価が認められ、手術や移植だけでなく輸血や消化管内視鏡を介した感染リスクがあることが報告されている。感染リスクを正しく認識するために、体内のプリオン分布を明らかにすることは重要であるが、動物試験による感染価の測定では、長期に及ぶ観察が必要なため、感染価を迅速に測定する新たな方法が求められている。我々は脳脊髄液中の超微量のヒトプリオンを検出する方法（Real-time quaking induced conversion assay; 以下 RT-QUIC 法）の開発に成功し、今回この方法を用いて CJD 患者組織中のアミロイド形成活性（シード活性）の定量的評価を試みた。

対象と方法

プリオン病患者 10 症例より剖検時に採取された脳組織を用いた。10 症例の内訳は孤発性 CJD が 9 症例、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病 GSS-P102L が 1 症例であった。脳乳剤を 10 倍段階希釈し、リコンビナントヒト PrP を基質として、エンドポイント RT-QUIC を行い、Spearman-Karber 法を用いて 50% seeding dose (SD₅₀) を算出した。検体中のタンパク分解酵素(Proteinase K)抵抗性の PrP をドットブロット法によって定量した。また、脳乳剤を 121°C で 20 あるいは 60 分間オートクレーブ処理を行った後、シード活性をエンドポイント RT-QUIC にて再評価した。

結 果

エンドポイント RT-QUIC により脳組織中のシード活性を SD₅₀ として算出できた。孤発性 CJD の脳組織 1 グラム換算の SD₅₀ は 10^{8.79}~10^{10.64} と高く、遺伝性プリオン病である GSS においても 10^{10.13}/g と算出された。SD₅₀ はドットブロット法にて推定した異常 PrP 量と正の相関を示し(R²=0.8173)、1SD₅₀ は 0.12 フェムトグラムの PrP に相当することが示された。RT-QUIC では、反応開始からアミロイド形成が観察されるまでの潜時 (lag time) が認められ、各サンプルの lag time について SD₅₀ との相関性を検討したところ、高い負の相関性を認めた ($y = -1.733\ln(x)+6.3538$; R² = 0.9596; $x = \text{lag time(h)}$, $y = \log[\text{SD}_{50}/\text{well}]$)。熱処理後のサンプルを用いてのエンドポイント RT-QUIC で SD₅₀ は、2.25~3.88 log の低下が観察された。

考 察

ハムスタープリオンを用いて検討している報告では、SD₅₀ とバイオアッセイで求めた 50%致死量 (LD₅₀) には高い相関性があり、LD₅₀ の代用指標として扱うことが可能であるとしている。今回解析に用いた CJD 患者脳 LD₅₀ は、現在ヒト化マウスを用いて実験中で、経過観察中のため未算出であるが、SD₅₀ は LD₅₀ よりも 10 倍ほど高いと予想される。我々が知る限り、これほど高い感度でかつ迅速にヒトプリオンの活性定量化に成功した報告はない。Lag time と SD₅₀ の高い相関性が見られることから、アミロイドシーディング反応の可視化までの時間は、QUIC 反応開始時のシード量をもっとも重要な決定因子であることを意味する。しかし、データの誤差範囲のオーバーラップが大きいことから、単純に lag time から SD₅₀ を算出することは正確性に問題があると言える。

孤発性 CJD 患者の脾臓 (1 症例) を用いてエンドポイント RT-QUIC を行ったところ 10^{7.5} SD₅₀/g の活性が認められたことから、孤発性 CJD においても感染性プリオンが非神経系臓器にも分布している可能性が考えられ、今後全身臓器の再評価が必要と思われる。オートクレーブ処理によるシード活性の低下率は、動物実験での検証結果とほぼ一致しており、この SD₅₀ 算出による定量評価法が様々な生体試料や提供された臓器の安全性を直接評価する手段となる可能性がある。