

ヒトプリオン病における新しい診断マーカーによる生化学的診断法の確立

松井 佑貴

福岡大学薬学部薬学疾患管理学教室, 814-0180 福岡市城南区七隈8丁目19-1

The establishment of a laboratory diagnosis of human Creutzfeldt-Jakob disease by using new biomarkers

Yuki Matsui

Department of Pharmaceutical Care and Health Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Fukuoka University, 8-19-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan

Abstract

The gamma-isoform of the 14-3-3 protein (14-3-3 gamma) is expressed in neurons, and could be a specific marker for neuronal damage. This protein has been reported as a detectable biomarker, especially in the cerebrospinal fluid (CSF) of Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) patients by Western blotting (WB) or enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs). Western blotting for 14-3-3 gamma is not sensitive, and the reported data are conflicting among publications. An ELISA specific for 14-3-3 gamma is not available. CJD patients (n = 114 sporadic CJD patients, 7 genetic CJD, and 3 iatrogenic CJD) and 99 patients with other neurodegenerative diseases were examined in this study. The CSF samples obtained were analyzed by Western blotting for 14-3-3 gamma, and by ELISA for total tau protein. We evaluated the sensitivity and specificity of the newly developed sandwich ELISA for 14-3-3 gamma. The cut-off value of the 14-3-3 gamma ELISA was $> 1,683$ AU/ml; and sensitivity was 95.2%, with 72.7% specificity. This specificity was the same for the total tau protein ELISA. Seven CJD cases were negative by WB but positive using the 14-3-3 gamma ELISA, indicating that the ELISA is more sensitive. All 21 cases of early stage CJD could be diagnosed using a combination of the 14-3-3 γ ELISA and diffusion weighted MR imaging (DWI-MRI). The 14-3-3 gamma ELISA was more sensitive than conventional WB, and was useful for laboratory diagnosis of CJD, similar to the ELISA for the tau protein. Using DWI-MRI and these ELISA tests on CSF, diagnosis of CJD will be possible even at early stages of the disease.

【緒言】

ヒトプリオン病, 特に Creutzfeldt-Jakob 病 (CJD) は痴呆症状を中心とした神経症状が急速に進行し, 死に至る神経難病である。原因不明の弧発性CJDは1年間に100万人に1人程度の割合で発症することが知られており, 各国で共通に発病していることが報告されている。現在まで画期的な治療法はなく, 有効性を示唆する候補薬剤が幾つか挙げられているのが現状である。この治療法開発の障壁を克服するためには, 早期診断法の開発と病態特異的な評価マーカーの同定が必要不可欠である。近年, MRI拡散強調画像と髄液中のバイオマーカーによる診断法の確立が検討されてきた。

CJD患者における髄液中の生化学診断マーカーは, 14-3-3蛋白をはじめとしていくつかの報告がなされ, その診断的意義が論じられている。その中でも, 現在まで弧発性CJDでは14-3-3蛋白の報告が最も

多く、WHOによるCJD診断基準にも14-3-3蛋白が補助的診断基準の1つとして加えられている(2)。1996年にHsichらはCJD患者における脳脊髄液中の14-3-3蛋白を診断マーカーとして報告したが(1)、同年Zerrらが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(5)。その後、14-3-3蛋白に関する報告が散見されるようになったが、14-3-3蛋白による判定基準は明確化することがなく、その定量的測定法についても非常に効率が悪く、煩雑であるのが実情である。また、これまでの14-3-3蛋白の測定は全アイソフォームの総量で行っているものが多数であり、さらに感度・特異度を高めるためにはターゲットとなる14-3-3蛋白のアイソフォームの検討が必要である。従って、14-3-3蛋白の特異的かつ迅速な測定法と明確な判断基準の確立が急務となっている。

CJD診断においては14-3-3蛋白、総タウ蛋白、NSE、S-100b蛋白の4つの生化学マーカーが使用されてきた。これらは感度や特異性の観点から診断法として利用可能と考えられるが、確定診断には脳生検などが必要である。そこで、低侵襲的に得られる患者由来の材料からCJDを診断できる検査方法が求められている。血液を用いた侵襲性の低い診断法についても注目されており、最近、ホモシスチンや心臓由来脂肪酸結合蛋白(heart-type fatty acid binding protein: H-FABP)が報告されている(6, 7)。現状では血液より脳脊髄液を用いた検出法が、診断に有用であると考えられており、多くの研究者が診断マーカーの検出を試みている。2003年GuillaumeらはCJD患者の脳脊髄液中で心筋梗塞の早期診断に有用な心筋傷害マーカーであるH-FABPの増加を確認しCJDの早期診断に有用であると報告した(8)。我々はH-FABPに着目し、CJD患者の脳脊髄液中のH-FABPを測定し、CJD診断マーカーとしての有効性を検討した。さらに現在、臨床現場でH-FABPの簡易測定キットとして利用されているラピチェック®を応用したCJD診断キットの検討も行った。本研究で、14-3-3蛋白とH-FABPのCJD診断マーカーとしての可能性を追究したので報告する。

脳脊髄液中における14-3-3蛋白 γ アイソフォームの同定

【方法】

Western blot (WB) 法の統一プロトコール(3, 9)を作成し、CJD患者(112例: Table 1-a)と他の神経疾患群(100例: Table 1-b)の脳脊髄液中における14-3-3蛋白の検出を行った。そのプロトコールに準拠し、市販されている4種類の抗体を使用して検出特性について検討した。さらに、イメージアナライザーのLAS 3000を使用し、共同実験施設先から提供された既知濃度の14-3-3蛋白 γ アイソフォームのリコンビナント蛋白を基準として14-3-3蛋白を定量した後、cut-off値を決定した。

【結果】

14-3-3蛋白の標準化に最も適したアイソフォームは、 β 及び γ アイソフォームであったが、 γ アイソフォームの方が再現性において優れていた。また、 γ アイソフォームの方が β よりも安定していることが確認された(Figure 1)。

市販の γ アイソフォームを認識する抗体の中で最も感度と特異度が高かった抗体は18647 (IBL, 日本)であった(Figure 2)。18647を用いた14-3-3蛋白 γ アイソフォームのcut-off値は39.8 $\mu\text{g}/\text{lane}$ 、感度は88.4%であり、特異度は81.2%であった(Figure 3)。

Table 1. Profiles of (a) 112 CJD patients and (b) profiles of patients in disease control group (N= 100 cases)

(a)		Definite cases	Probable cases	Possible cases	Total cases
Sporadic cases	Male	4	48	0	52
N=99	Female	3	44	0	47
Familiar cases	Male	0	2	2	4
N=8	Female	3	0	1	4
Iatrogenic cases	Male	0	3	0	3
N=5	Female	1	1	0	2

(b)	Disease	Male (cases)	Female (cases)	Total cases
	ATD	33	21	54
	CVD	5	2	7
	Pick's disease	1	0	1
	Parkinson disease	4	1	5
	CBD	2	0	2
	Huntington's disease	1	0	1
	FTD	1	0	1
	PSP	2	1	3
	MCI	1	2	3
	ALS	2	1	3
	temporal epilepsy	3	2	5
	limbic encephalitis	2	1	3
	MELAS	1	1	2
	PCD/LEMS	1	1	2
	undifferentiated encephalopathy	1	4	5
	healthy subjects	2	2	4

ATD: Alzheimer-type dementia, CVD: Cerebral Vascular Disorder, ALS: amyotrophic lateral sclerosis, MCI: mild cognitive impairment, CBD: corticobasal degeneration, FTD: frontotemporal dementia, PSP: progressive supranuclear palsy, MELAS: Mitochondrial myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis, Stroke-like episodes, PCD: paraneoplastic cerebellar degeneration, LEMS: Lambert-Eaton myasthenic syndrome

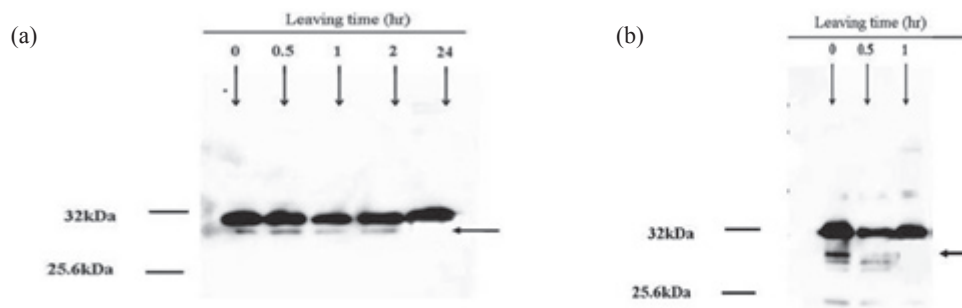


Figure1. Resolving power of the β -isoform and γ -isoform of 14-3-3 protein by time course

(a) Resolving power of the recombinant γ -isoform of 14-3-3 protein with western blot method (0, 0.5 hr, 1 hr, 2hr, 24 hr). (b) Resolving power of the recombinant β -isoform of 14-3-3 protein by antibody with western blot method (0, 0.5 hr, 1 hr).

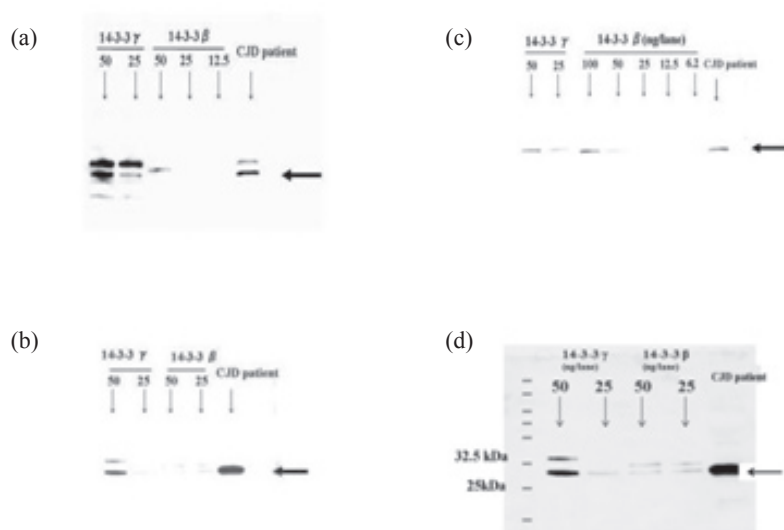


Figure 2. Staining of recombinant 14-3-3 protein (β -isoform and γ -isoform) by four antibodies (Sc-629 (Santa Cruz, Calif. USA), 18641 (Immuno-Biological Laboratories (IBL) Gunma, Japan), 18647 (IBL Gunma, Japan) and K0203-3 (Medical & Biological Laboratories C.O. (MBL), Japan)) (a) Sc-629 (Santa Cruz, Calif. USA) antibody. (b) 18641 (IBL Gunma, Japan) antibody. (c) 18647 (IBL Gunma, Japan) antibody. (d) K0203-3 (MBL, Japan)

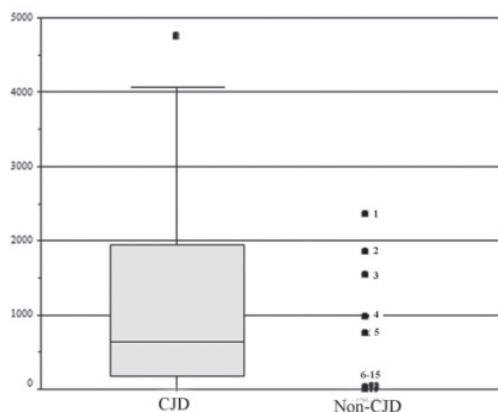


Figure 3. The results of semi-quantitative analysis of Western blots of the γ -isoform of 14-3-3 protein in the CSF of CJD and control disease patients. The γ -isoform of 14-3-3 protein was detected in the CSF of 15 CJD patients by Western blot. (1, 3 and 4; limbic encephalopathy, 2 and 5; PCD/LEMS, 6 -15; MELAS, encephalopathy owing to unknown etiology and dementia of Alzheimer type (DAT)).

14-3-3蛋白 γ アイソフォームにおけるELISA法の評価

14-3-3蛋白 γ アイソフォームはCJD診断の上で有効であるが、検出方法はWB法による定性反応で手技による誤差が生じる可能性が高く、測定効率も良くない。これらの問題点を克服し、さらに診断精度の向上を目的として、Sandwich ELISA法を原理としたELISAキットの開発を試みた。

【方法】

14-3-3蛋白 γ アイソフォームに特異的な抗体を作成し、測定可能な抗体を組み合わせるELISAキットを作成した。本法によりCJD患者124例（弧発性CJD114例，家族性7例，医原性3例）とCJD以外の神経変性疾患群99例を対象とした脳脊髄液中の14-3-3蛋白 γ アイソフォームを測定した（Table 2）。検出結果をWB法とELISAキットで比較検討し、さらにDWI-MRI検査とCJD診断において100%の特異度を示すRT-QUIC法（10）を含めて有効性について総合的に評価した。

【結果】

ELISA キットの cut-off 値は 1,683 AU/ml で、感度と特異度はそれぞれ 95.6% と 71.4% であった (Figure 4)。早期 CJD 21 例において、t-tau 蛋白と 14-3-3 蛋白の感度は、それぞれ 95.2% 及び 76.2% であったが、ELISA 法では 21 例全てで 1,683 AU/ml を超えていた (Table 3)。また、WB 法で陰性と判定された 7 例中 5 例が CJD と診断されたが、ELISA 法では 7 例全てが 1,683 AU/ml 以上を示した (Table 4)。さらに、WB 法で陰性と判定された 7 例中 2 例が CJD と判定されたが、ELISA 法では全て 1,683 AU/ml 以下を示した (Table 5)。一方、CJD 以外の神経変性疾患群 99 例のうち 23 例が ELISA 法で 1,683 AU/ml 以上を示した (Table 6)。

Table 2. Analysis of Western blots method and ELISA of 14-3-3 protein of CSF in 124 CJD patients and 99 patients with other neurological disorders and rapid progressive dementia

Disease	Number	Male	Female	ELISA of 14-3-3 protein				Positive rate of 14-3-3 protein in the detection of WB	
				Average	SD	Min	Max	14-3-3	14-3-3 all iso forms
CJD	124	69	55	26,354.9	21,525	135	75,373	108/124	114/124
DAT	54	33	21	1,537.0	751.2	0	2,410	3/54	7/54
CVD	7	5	2	975.9	332.4	521	1,512	0/7	2/7
PD	5	4	1	542.2	20.3	521	565	0/5	0/5
PSP	3	2	1	223.3	226.6	38	476	0/3	0/3
FTLD	2	1	1	425.0	236.2	258	592	0/2	0/2
HD	1	1	0	556.0	0	556	556	0/1	0/1
CBD	2	2	0	449.5	245.4	276	623	0/2	0/2
ALS	3	1	2	303.7	184.8	179	516	0/3	0/3
limbic encephalitis	2	1	1	4,440.5	1,935.4	3,072	5,809	2/2	2/2
MELAS	4	2	2	5,069.5	222.7	4,912	5,227	4/4	4/4
PCD/LEMS	2	1	1	4,387.0	217.8	4,233	4,541	2/2	2/2
temporal epilepsy	4	1	3	3,356.8	1,332.4	1,530	4,696	4/4	4/4
MCI	3	1	2	603.0	20.8	591	627	0/3	0/3
Dementia, etiology unknown	3	1	2	410.3	150.5	258	559	0/3	0/3
healthy subject	4	2	2	0.0	0.0	0	0	0/4	0/4

CJD: Creutzfeldt-Jakob disease, DAT: Dementia of Alzheimer's type, CVD: Cerebral Vascular Disorder, PD: Parkinson's disease, PSP: progressive supranuclear palsy, FTLD: frontotemporal lobular degeneration HD: Huntington's disease, CBD: corticobasal degeneration, ALS: amyotrophic lateral sclerosis, MELAS: Mitochondrial myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis, Stroke-like episodes, PCD: paraneoplastic cerebellar degeneration, LEMS: Lambert-Eaton myasthenic syndrome, MCI: mild cognitive impairment

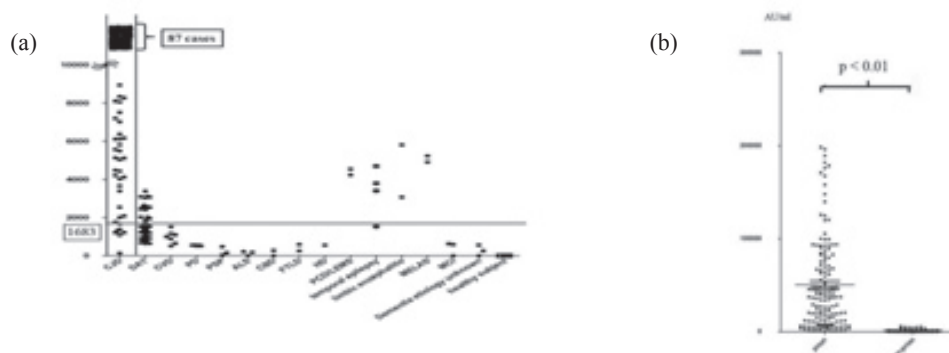


Figure 4. ELISA analysis of 14-3-3 protein in CSF from patients with CJD and other neurological disorders. (a) Results of the 14-3-3 ELISA analysis in CSF from patients with CJD and other forms of dementia. (b) Comparison of CJD patients and no-prion patients.

Table 3. Summary of the detection of ELISA of 14-3-3 protein, the detection of WB method of 14-3-3 protein and in CSF for 21 patients with early-stage CJD

Age	Sex	CJD type	D.W.	CSF			MRI	
				ELISA of 14-3-3 protein AU/ml	the detection of WB method of 14-3-3a protein	the detection of WB method of 14-3-3 γ protein	Real-time QUIC	DWI
71	m	sp	probable	0	4,157	-	-	+
77	m	sp	probable	2	10,812	+	+	+
64	f	sp	probable	4	11,812	+	+	+
73	m	sp	probable	4	3,850	+	+	+
67	m	sp	probable	4	10,814	+	+	+
76	m	sp	probable	4	6,772	+	+	+
80	f	sp	probable	4	9,850	+	+	+
63	f	sp	probable	4	2,987	-	-	+
67	m	sp	probable	4	3,553	+	+	+
70	f	sp	probable	4	3,729	-	-	+
63	m	sp	probable	4	6,133	+	+	+
63	m	sp	probable	4	8,297	+	+	+
67	f	sp	probable	5	3,372	+	-	-
74	m	sp	probable	5	7,184	+	+	+
69	f	sp	definite	6	5,600	+	+	+
54	f	sp	definite	6	1,897	-	-	+
70	f	ia	probable	6	9,460	+	+	-
70	f	fa	probable	6	4,417	+	+	+
64	f	sp	probable	6	3,888	+	+	+
51	f	ia	probable	6	6,313	+	+	+
74	f	sp	probable	6	6,133	+	+	+

sp = Sporadic CJD; ia = iatrogenic CJD; fa = familial CJD; d.l. = diagnostic level based on the WHO and the Masters criteria; d.w. = duration from the onset of the disease to the diagnostic examination. In all 21 cases, codon 129 of PRNP was Met/Met homozygous, whereas codon 219 was Glu/Glu homozygous. Total protein contents of all the patients stayed within the normal range. All patients in this study were Asian.

Table 4. Analysis of CJD patients that were not detected in 14-3-3 γ protein of WB methods but were beyond the cut-off level (1,683 AU/ml) in 14-3-3 protein ELISA.

Age	Sex	type	Polymorphism of codon129 in PRNP gene	Mutation of PRNP gene	ELISA of 14-3-3 protein (AU/ml)	Real-time QUIC
69	male	sp	MM	-	2,101	+
33	female	sp	MM	-	1,852	+
70	female	sp	MM	-	2,452	+
73	female	sp	MM	-	2,531	+
64	male	sp	MM	-	5,493	+
65	male	fa	MM	E200K	4,621	+
79	female	sp	VV	-	2,342	+

sp: sporadic type, ge: genetic type, MM: methionine homozygotes, VV: valine homozygotes, +: positive, -: negative

Table 5. Analysis of CJD patients that were not detected in 14-3-3 γ protein of WB methods and were below the cut-off level (1,683 AU/ml) in 14-3-3 protein ELISA.

Age	Sex	type	Polymorphism of codon129 in <i>PRNP</i> gene	Mutation of <i>PRNP</i> gene	ELISA of 14-3-3 protein (AU/ml)	Real-time QUIC
85	female	ge	MM	V180I	1.086	-
84	female	ge	MM	V180I	1.222	-
84	male	ge	MM	V180I	1.313	-
84	female	ge	MM	V180I	1.383	-
75	male	ge	MM	M232R	1.676	+
78	male	sp	MM	-	135	-
66	male	sp	MM	-	1,224	+

sp: sporadic type, ge: genetic type, MM: methionine homozygotes, VV: valine homozygotes, +: positive, -: negative

Table 6. The summary of non-CJD patients in the positive cases of ELISA of 14-3-3 γ protein.

Age	Sex	diagnosis	WB (14-3-3 protein)		ELISA	Real-time QUIC
			all isoforms	γ -specific isoform	γ -specific isoform	
79	male	PCD/LEMS	+	+	4,233	-
69	male	PCD/LEMS	+	+	4,541	-
51	female	temporal epilepsy	+	+	3,405	-
59	female	temporal epilepsy	+	+	3,796	-
62	male	limbic encephalitis	+	+	3,072	-
78	male	limbic encephalitis	+	+	5,809	-
42	female	MELAS	+	+	4,912	-
25	female	MELAS	+	+	5,227	-
78	male	DAT	+	+	3,110	-
62	female	DAT	+	+	3,386	-
69	female	DAT	+	+	3,892	-
57	male	DAT	+	-	3,092	-
59	male	DAT	+	-	3,074	-
61	male	DAT	+	-	3,038	-
66	female	DAT	+	-	2,941	-
67	female	DAT	-	-	2,569	-
70	female	DAT	-	-	2,534	-
78	female	DAT	-	-	2,445	-
83	female	DAT	-	-	2,410	-
89	female	DAT	-	-	2,025	-
72	male	DAT	-	-	1,949	-
59	female	DAT	-	-	1,852	-
63	male	DAT	-	-	1,709	-

PCD: paraneoplastic cerebellar degeneration, LEMS: Lambert-Eaton myasthenic syndrome, MELAS: Mitochondrial myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis, Stroke-like episodes, DAT: Dementia of Alzheimer's type

H-FABP に着眼した CJD 簡易型診断キットの開発

【方法】

2次元電気泳動法により CJD 患者と健常者の脳脊髄液中の解析を行った。その結果、CJD 患者の脳脊髄液中から H-FABP が特異的に確認された。CJD 患者（124 症例）と他の神経疾患群（87 症例）における脳脊髄液中の H-FABP を ELISA 法で測定し、CJD 診断のバイオマーカーである 14-3-3 蛋白及び t-tau 蛋白と比較検討した。さらに H-FABP を簡易的に測定できるラピチェック®を応用し、脳脊髄液中の H-FABP を測定し、ラピチェック®による診断の有効性を検討した。また、これまで H-FABP の脳組織での局在を確認した報告はなかったため、CJD 患者の海馬組織の免疫染色を行い病理学的に検討した。

【結果】

ELISA 法による H-FABP の cut-off 値は 6,200 pg/ml, 感度は 90.3%, 特異度が 92.9% であった (Figure 5)。従って, H-FABP の感度と特異度は, 14-3-3 蛋白や t-tau 蛋白と同程度であった (Figure 6)。ラピチェック® による測定結果は, 感度が 87.9%, 特異度が 96.0% であった。また, H-FABP は脳内に存在しており, その局在は神経細胞, グリア細胞, 血管周囲部に認められ, CJD 患者の脳で初めて H-FABP の分布に関する知見を得た (Figure 7)。

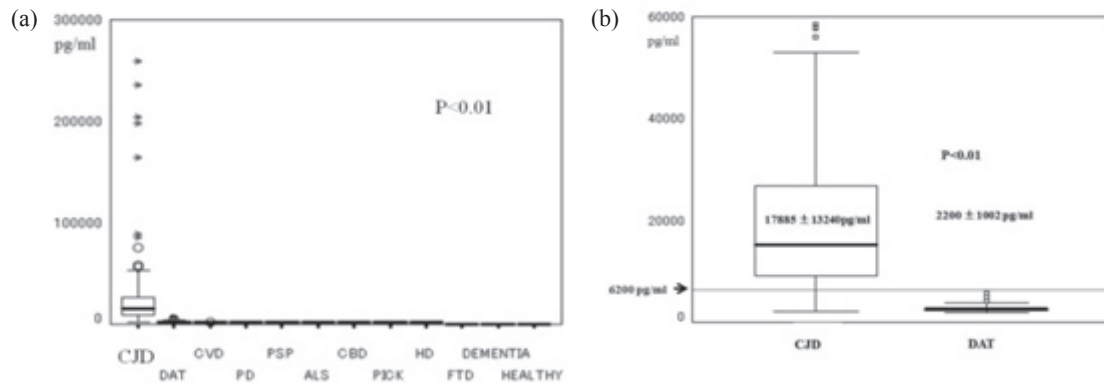


Figure 5. ELISA analysis of CSF from patients with CJD and other forms of dementia.

(a) Results of ELISA analysis of CSF from patients with CJD and other forms of dementia.

CJD: Creutzfeldt-Jakob disease; DAT: dementia of Alzheimer's type; CVD: cerebrovascular disorders; PD: Parkinson's disease; PSP: progressive supranuclear palsy; ALS: amyotrophic lateral sclerosis; CBD: corticobasal degeneration; PICK: Pick's disease; HD: Huntington's disease; FTD: frontotemporal dementia (b) Comparison of CJD patients and DAT patients.

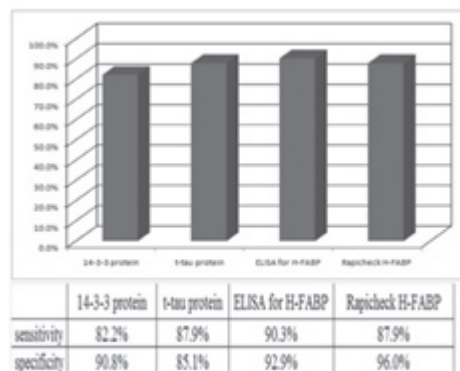


Figure 6. Correlation analysis of positive CJD rate with 14-3-3 protein and total tau protein, according to ELISA of H-FABP and Rapicheck® H-FABP methods.

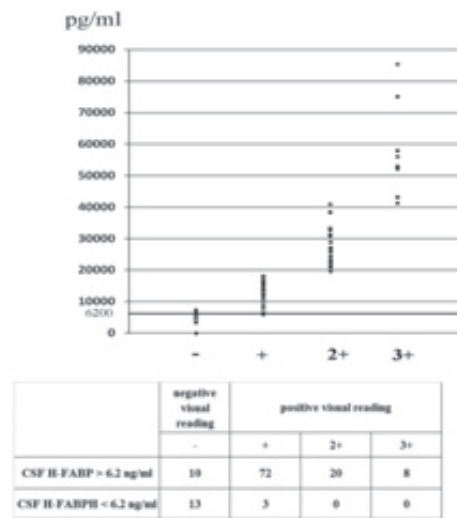


Figure 8. The relationships between H-FABP levels detected by ELISA and Rapicheck[®] H-FABP methods in the CSF of CJD patients. The appearance of an indicator test line (in addition to the quality control line) within 5 minutes was graded +3 (strongly positive); appearance of a test line within 15 minutes was graded +2 (moderately positive); and the appearance of a weak test line within 15 minutes was graded +1 (weakly positive). The absence of a test line at 15 minutes was reported as 0 (negative) (Sup Figs1). We clarified the relationships between H-FABP levels detected by ELISA and Rapicheck[®] H-FABP methods in the CSF of CJD patients. Both methods showed similar levels, and we identified similar abilities to accurately measure CSF H-FABP levels in the range 0-86,000 pg/ml.

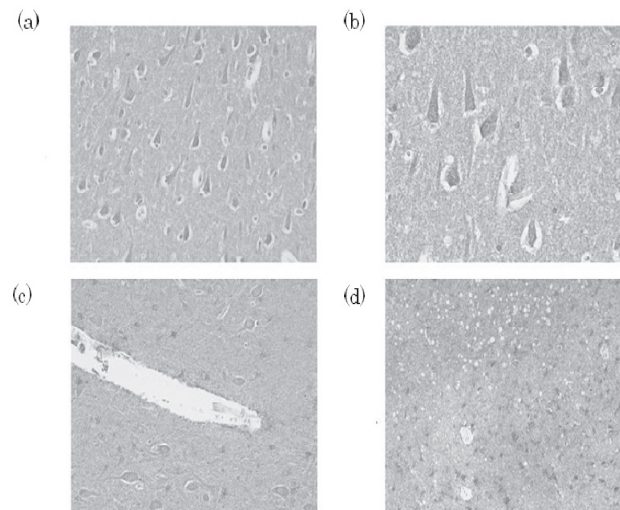


Figure 7. Neuropathology of H-FABP immunostaining in brain sections from CJD patients.

(a) H-FABP immunostaining in brain sections from CJD patients. (b) Strong immunostaining of neurons surrounding the disease lesion. There was a lot of neuronal loss in cerebral cortex of CJD patients and immunostained the survival neuron in H-FABP, but H-FABP immunostaining was stronger in the lesion of abundant accumulation of abnormal prion protein. (c) Reactive astrocytes surrounding spongiform changes were positive for H-FABP. (d) The distribution pattern of H-FABP matches that of abnormal prion protein.

【考察及び結論】

14-3-3蛋白 γ アイソフォームは感度・特異度においてCJD診断法として有用であることが判った。ヘルペス脳炎や結核性髄膜炎のPCR法と比べてもその感度・特異度において遜色はない。しかし、生前確定診断に至るには脳生検により、最も確実なプリオン病のマーカーである異常型プリオン蛋白の直接的な証明に頼らざるを得ない。従って、非侵襲的な診断法としてなるべく低侵襲的に得られる患者由来材料からの異常プリオンの検出が焦眉の課題であり、現在の研究の中心はCJD患者の髄液や血液などの検体から異常型プリオン蛋白そのものを検出することが課題となっている。現状では血液からの検出より脳脊髄液からの検出の可能性が高いと考えられ、多くの研究者が異常型プリオン蛋白の検出を試みており、Atarashiらは、CJDに対して非常に感度の高い異常型プリオン蛋白増幅法（Real-time QUIC法）を開発することに成功し、これを用いたCJD髄液診断が可能であることを示した(10)。

本研究で開発した14-3-3蛋白 γ アイソフォームの測定法は、その簡易性と迅速性からCJDの一次スクリーニング法として最も適した測定方法と考えられ、ラピチェック[®]によるH-FABP測定はCJDの早期簡易診断法となる可能性がある。キットによる測定法の簡便性を考慮すれば、その有用性は高いと考えられる。

本研究で示した14-3-3蛋白 γ アイソフォームのELISA法及び髄液中の生化学的マーカー測定法さらにはMRI検査や異常型プリオン蛋白の直接的な検出が期待されるReal-time QUIC法(10)を組み合わせることで、CJDを中心としたヒトプリオン病の早期発見・早期確定診断が可能となる日は近いだろう。

【謝辞】

終わりに臨み、本研究の機会を与えて頂き、終始懇切な御指導と御鞭撻を賜りました福岡大学薬学部薬学疾患管理教室 片岡泰文教授に心より深甚なる謝意を表します。

本研究に際し、御指導と御鞭撻を賜りました長崎大学病院へき地病院再生支援・機構の調漸教授、長崎大学大学院医歯薬総合研究科感染分子解析学分野感染分子解析学教室の佐藤克也講師に深謝します。

また、本論文を査読して頂き、貴重な御意見と御校閲を賜りました福岡大学薬学部生化学教室の添田泰司教授、福岡大学薬学部臨床心身治療学教室の美根和典教授ならびに福岡大学薬学部薬学疾患管理学教室道具伸也准教授に感謝の意を表します。

【参考文献】

1. Hsich G, Kenney K, Gibbs CJ et al. The 14-3-3 brain protein in cerebrospinal fluid as a marker for transmissible spongiform encephalopathies. *New England Journal of Medicine*. 1996; 335: 924-930.
2. Brandel JP, Delasnerie-Laupretre N, Laplanche JL et al. Diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease: effect of clinical criteria on incidence estimates. *Neurology*. 2000; 54: 1095-99.
3. Satoh K, Tobiume M, Shirabe S, et al. Establishment of a standard 14-3-3 protein assay of the cerebrospinal fluid as a diagnostic tool for Creutzfeldt-Jakob disease. *Laboratory and Investigation*. 2010 Nov; 90 (11):1637-44.
4. Hiura M, Nakajima O, Mori T, Kitano K. Performance of a semi-quantitative whole blood test for human heart-type fatty acid-binding protein (H-FABP). *Clinical Biochemistry*. 2005; 38: 948-50.
5. Zerr I, Bodemer M, Otto M et al. Diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease by two-dimensional gel electrophoresis of cerebrospinal fluid. *Lancet*. 1996; Vol. 348: 846-849.
6. Bleich S, Otto M, Zerr I, Kropp S, Kretschmar HA, Wiltfang J. Creutzfeldt-Jakob disease and homocysteine

- levels in plasma and cerebrospinal fluid. *Gerontology*. 2005 Mar-Apr; 51(2): 142-4.
7. Zerr I, Bodemer M, Kaboth U, Kretzschmar H, Oellerich M, Armstrong VW. Plasminogen activities and concentrations in patients with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci Lett*. 2004 Nov 23;371(2-3):163-6.
 8. Guillaume E, Zimmermann C, Burkhard PR, Hochstrasser DF, Sanchez JC. A potential cerebrospinal fluid and plasmatic marker for the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Proteomics* 2003; 3(8): 1495-99.
 9. Satoh K, Shirabe S, Eguchi H et al. Chronological changes in MRI and CSF biochemical markers in Creutzfeldt-Jakob disease patients. *Dementia and geriatric cognitive disorders*. 2007; 23: 372-381
Guillaume E, Zimmermann C, Burkhard PR et al. (2003) A potential cerebrospinal fluid and plasmatic marker for the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Proteomics* 3:1495-1499.
 10. Atarashi R, Satoh K, Sano K, Fuse T, Yamaguchi N, Ishibashi D, Matsubara T, Nakagaki T, Yamanaka H, Shirabe S et al. Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluid by real-time quaking-induced conversion. *Nature medicine* 2011; 17 (2) :175-78.