

他の5症例では、症例1と2で一過性の下痢、嚥下性肺炎、または尿路感染症による中断があったものの12週間の投与を完了した。この5症例において投与開始後2週間以内に覚醒度または認知機能の改善を認めた。しかしこの改善は全症例において一過性で、2週間から8週間続いた後に、キナクリンを継続しているにも関わらず治療前の状態に戻った。副作用は皮膚の黄染を全例に認め、ALT、ASTの正常上限5倍以下の上昇を4例に認めた。この肝機能障害は治療中止基準を越えるものではなく、キナクリン投与終了後に正常化した。血中キナクリン濃度を測定できた一例では、キナクリン血中濃度は投与総量依存的に増加し、認知機能などの改善は1 μ M以下の濃度で観察され、その濃度を超えると効果の消失と肝機能障害などの副作用の出現が見られた。

D. 考察

堂浦らはPrP^{Sc}の蓄積を阻害する化合物を研究する過程で、ライソゾーム好性物質であるキナクリンがその効果を持つことを示した。過去に報告されたPrP^{Sc}阻害物質の多くがPrP^{Sc}の感染が既に成立した実験動物では治療効果を示さないのに対して、キナクリンは感染成立後の投与において実験動物の延命効果を示した。培養細胞系(ScNB cells)でのPrP^{Sc}蓄積阻害のキナクリン有効濃度(IC₅₀)は300 nMから400 nMであり、これはヒト血漿において今回の治療用量で到達し得る濃度である。またキナクリンには組織蓄積性があり、組織/血漿比はきわめて高い。さらにキナクリンは血液脳関門を通過し、慢性投与では脳にも蓄積することが知られている。今回の研究で認められた臨床的改善がキナクリンの抗プリオン効果によるものであるかは明らかでない。キナクリンの副作用として精神症状があり、その発生頻度は1,000人あたり0.9から4と報告されている。初期には精神運動興奮が起こるとされており、今回の研究でみられた覚醒度と発動性

の上昇はキナクリンの直接作用と考えることもできる。しかし家族や医療スタッフにたいする疎通性の回復は精神運動興奮だけでは説明できず、またキナクリン精神障害の発生頻度も低いことから抗プリオン効果も否定できない。

E. 結論

進行したCJD患者6症例にキナクリンを経腸管的に投与し、5症例に一過性ではあるが認知機能の改善を認めた。副作用として1例は嘔気のため投与を中断した。他の5症例では全例に皮膚横染を、4症例に肝機能障害を認めた。今回認められた臨床効果がキナクリンの中枢神経作用によるものか、抗プリオン効果によるものかは明らかではない。

F. 健康危険情報

キナクリンは組織蓄積性が高く、また肝機能障害の頻度は高い。われわれがキナクリンを提供した施設からは治療中止基準を満たす高度の肝機能障害が報告されている。またキナクリンとの因果関係は明らかでないものの死亡例も2例報告されている。

G. 研究発表

1. 論文発表

Nakajima M., Yamada T., Kusuhara T., Furukawa H., Takahashi Y., Kataoka Y., Doh-ura K: Returned cognition after quinacrine in patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol.* 52 (suppl):S68, 2002

中島雅士、山田達夫: Creutzfeldt-Jakob病治療の可能性: 最近の治験からみた治療への展望. *神経内科.* 57:413-418, 2002

中島雅士、山田達夫. プリオン病治療の現状と今後の展望. *最新医学* 58(5), 2003 (in press).

2. 学会発表

Nakajima M., Yamada T., Kusuhara T., Furukawa H., Takahashi Y., Kataoka Y., Doh-ura K: Restored cognition after quinacrine administration in

disease. International Conference on Transmissible Spongiform Encephalopathies. Edinburgh, September 15-18, 2002

Nakajima M., Yamada T., Kusuhara T., Furukawa H., Takahashi Y., Kataoka Y., Doh-ura K: Restored Cognition in Patients with Creutzfeldt-Jakob Disease after Quinacrine Treatment. 127th Annual Meeting of the American Neurological Association. New York, October 12-16, 2002

Nakajima M., Yamada T., Kusuhara T., Furukawa H., Takahashi Y., Kataoka Y., Doh-ura K: Restored cognition after quinacrine administration in patients with Creutzfeldt-Jakob disease. New Perspectives for Prion Therapeutics. Paris, December 1-3, 2002

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
平成14年度 分担研究書

ペントサン硫酸脳室内投与療法の効果と安全性に関する研究

分担研究者： 吉良潤一 九州大学大学院医学研究院・教授
研究協力者： 村井弘之、佐々木健介、堂浦克美
九州大学大学院医学研究院

研究要旨

第一世代型プリオン病治療法として脳血液関門を通過しないペントサン硫酸を用いた脳室内投与療法の臨床試験実施に向けて、昨年度の成果を踏まえ動物実験でさらに詳細な効果の検証と安全性の確認を行った。その結果、効果を病理学的に裏付けることができ、効果の普遍性（検討した3種の病原因子株の全てで有効）を確認できた。さらに、防腐剤を除いたペントサン硫酸製剤での有効濃度域での安全性を確認することができ、臨床応用への基盤は整った。

A. 研究目的

ペントサン硫酸（PPS）を用いた第一世代型プリオン病治療法を確立する上で、脳血液関門を透過しない PPS をプリオン病の標的臓器である脳へ移行させるためには脳内に直接投与する方法の確立が必要である。PPS の延命効果については、すでに明らかにしているものの、その病理学的な検証は十分ではなかった。また、プリオン病原因子株によって治療効果が異なる可能性があるが、この点についての検討も十分ではなかった。今年度は、このような点について明らかにした。また、昨年度の研究で、有効濃度と毒性濃度がかなり近いことを明らかにしたが、PPS 製剤中に含まれる防腐剤の毒性の影響が考えられたため、今年度は防腐剤を除いた PPS 製剤で再び安全性を検証した。

B. 研究方法

I. 効果の病理学的検証

脳内接種により罹患させた早発系マウスに浸透圧ポンプを用いて PPS を4週間連続投与を行い、潜伏期間への影響、異常型プリオン蛋白沈着への影響を解析した。異常型プリオン蛋白沈着は免疫組織学的方法と Western blot 法で調べた。

II. 他の病原因子株での効果の検証

ハムスターで継代されているプリオ

ン株 263K 以外に、マウスで継代されているプリオン株である福岡 1 と RML の 1%脳乳剤を、Tg20 マウスの脳内に接種して検討した。

III. 安全性の再検討

非げっ歯類として雑種犬（10～15 kg、雌雄を問わず）を用いて、脳室内に防腐剤を除いた PPS 製剤を浸透圧ポンプを用いて8週間投与を行った。投与開始前・投与開始後1ヶ月・同2ヶ月に血液を採取し、一般血液・凝固系・血清生化学検査を行った。投与開始2ヶ月後に屠殺して脳を病理学的に検索した。

（倫理面への配慮）

動物実験は、九州大学大学院医学研究院動物実験委員会の指針の範囲内で行った。

C. 研究結果

I. 効果の病理学的検証

異常型プリオン蛋白沈着への影響を調べたところ、投与群では非投与群に比べて新たな異常型プリオン蛋白の沈着が PPS 投与側の脳半球で著明に抑制されていた。しかしながら、投与を開始する時点ですでに沈着している異常型プリオン蛋白に対しては影響が明らかではなかった。一方、PPS 投与側とは反対側の脳半球では、PPS 投与により罹患マウスの潜伏期間が長くな

るにつれて、粗大顆粒状の異常プリオン蛋白沈着やグリアの反応が目立つ傾向が認められた。また、PPS の投与側に関係せず、血管や髄膜への異常プリオン蛋白沈着が新たに観察されるようになった。しかしながら、脳幹の異常プリオン蛋白沈着は左右差がなく、対照群においても PPS 投与群においても末期においては同程度であった。

II. 他の病原因子株での効果の検証

福岡 1 株と RML 株の 1%脳乳剤を、Tg 20 マウスの脳内に接種すると、9.5 週あるいは 15 週の潜伏期の後に死亡する。これらのマウスに脳内接種後 2 週あるいは 7 週より PPS を脳室内投与したところ、福岡 1 株投与群では対照群に比べて 1.6 倍（2 週より PPS 投与群）あるいは 1.3 倍（7 週より PPS 投与群）の潜伏期間の延長を認め、RML 株投与群では対照群に比べて 2.5 倍（2 週より PPS 投与群）あるいは 1.5 倍（7 週より PPS 投与群）の潜伏期間の延長を認めた。

III. 安全性の再検討

最も治療効果を発揮する PPS 濃度である 230 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ では、各種検査や行動・仕草に異常は見られなかった。しかし、345 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ では投与動物の半数に、460 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ では投与動物の全てに、PPS 投与開始 24 時間以内に痙攣発作が出現した。痙攣発作を起こした動物の 70% は PPS 開始後 1 週間以内に死亡し、残りは数日以内に自然に回復した。死亡した動物の 60% に、脳内に血腫が観察されたが、残りの動物では特に異常を認めなかった。

D. 考察

PPS を脳室内投与したマウス脳の病理学的所見より、PPS の作用として、新たな異常型プリオン蛋白の産生・沈着を阻害し、神経変性を抑制していることが明かとなった。このことは、PPS の効果が、PPS の投与開始時期に相関しており、感染早期に投与を開始した方が効果が高いことを説明できる。一方、モデルマウスでは片側の脳皮質や視床の病変が必ずしも生命予後と相

関せず、脳幹の病変が生命予後と関係していることが明かとなったが、PPS 脳室内投与がより一層の効果を得るためには、プリオン病の標的組織である脳組織への薬物のび漫性の浸達が極めて重要であると考えられた。

これまでに報告されている抗プリオン作用を持つ化合物・薬物には、あるプリオン病原因子株には効果が見られるものの、他の病原因子株には無効あるいは効果が低いものがあることが知られている。今回の実験より、PPS 脳室内投与療法は、これまで検討した 3 種の全く性質の異なるプリオン病原因子株で効果が見られたことより、同治療法は他の病原因子株にも普遍的に有効であると考えられる。

PPS 脳室内投与療法の安全性について、今年度あらためて防腐剤を除いた PPS 製剤により検討を行ったが、その結果はマウスで最も治療効果を発揮する 230 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ では安全であるが、その 1.5 倍量以上の投与では血腫形成等に起因する痙攣発作が生じることが明かとなった。この副作用は PPS 開始早期に出現するものであり、急性期を除き 2 ヶ月間の投与中に異常な所見は観察されなかった。小動物ほど薬物代謝は活発であることが知られており、そのためにマウスとイヌで毒性濃度に差が生じたものと考えられる。

以上の事より、PPS 脳室内投与療法はプリオン病患者、特に硬膜移植に伴う医原性ヤコブ病患者のように脳内感染で発症する患者には有効な治療法であり、効果および安全性が十分に検証できたことより臨床応用への基盤が整った。

E. 結論

ペントサン硫酸脳室内投与療法について、効果の病理学的裏付け、効果の普遍性、防腐剤を除いた PPS 製剤での有効濃度域での安全性を確認した。

F. 健康危険情報

特になし

村井弘之 クロイツフェルト・ヤコブ
病の臨床診断. 臨床検査 46:1509-
1515, 2002

村井弘之 CJDとvCJD. Medical Briefs
in Virus Infection 15:6-7, 2002

2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

Computer-Aided Drug Design 手法によるプリオン蛋白結合分子の探索に関する研究

分担研究者： 広野修一 北里大学薬学部・教授

研究要旨

プリオン蛋白上の薬物結合部位として二ヶ所の結合ポケット（S と L）を同定し、有効な抗プリオン化合物は S ポケットに強い結合能を示すことを明らかにした。このことより *in silico* スクリーニングの基盤が整った。

A. 研究目的

正常型プリオン蛋白質と異常型プリオン蛋白質の結合を阻害すれば正常型から異常型プリオン蛋白質への変換を阻止することができ、プリオンの増殖を押さえられる可能性が高い。そこで、Computer-Aided Drug Design 手法を用いて、正常型プリオン蛋白質に対するリガンド分子の物理・化学的特徴を抽出し、さらに、その情報に基づきプリオン増殖阻害活性のある新規薬物を合理的に分子設計する。

B. 研究方法

正常型プリオン蛋白質から異常型プリオン蛋白質への変換を抑制する新規薬物を設計したり、化合物データベースに対して *in silico* スクリーニングを行うためには、プリオン蛋白質上のリガンド結合部位の位置と結合様式についての情報が必要である。今年度は、疎水性ポテンシャルを用いてプリオン蛋白質上のリガンド結合部位の同定とリガンド化合物のドッキング計算による結合様式の決定を行った。一般に、抗プリオン化合物リガンドには、水素結合性がほとんど無く疎水的なリガンドが多いことから、疎水性ポテンシャルを用いた結合サイト探索プログラム HBOP を開発した。このプログラムを正常型プリオン蛋白質の X 線構造に対して適用して、リガンド結合部位についての情報を得た。得られた結合部位に対して、SYBYL FlexX/CScore を用いて、既知のリガンド化合物をドッキングさせ、結合様式を明らかにした。

C. 研究成果

HBOP プログラムにより、疎水性リガンド結合部位として、Congo red 等が結合する small (S) pocket (図 1) と、berberine 等が結合する large (L) pocket (図 2) があることが推定された。



図 1a) Small Pocket

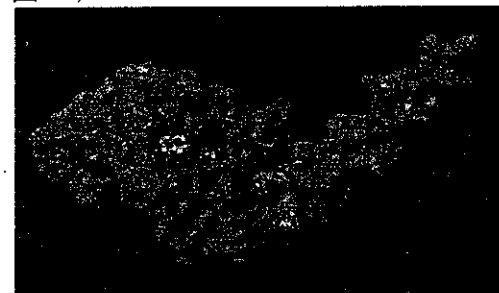


図 1b) Congo Red

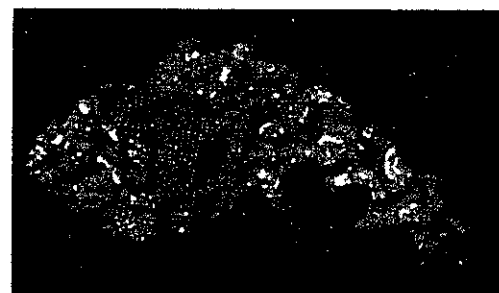


図 2a) Large Pocket

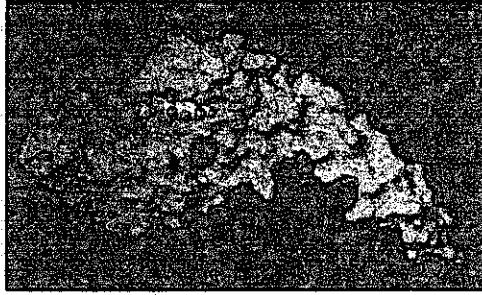


図 2b) Berberine

種々のプリオン結合リガンドについて検討を行った結果、S pocket に強く結合するリガンドは、強いプリオン産生阻害活性を示し、L pocket に結合するリガンドは、強い結合能を持っていても、阻害活性が無いか、もしくは、弱いことが示唆された。S pocket においては、Leu130、Pro158、Val161 との疎水性相互作用、および、Gln160、Tyr162 との水素結合がリガンドとの結合に重要であると予測された。L pocket においては、Phe141、Pro158、Val161、Val180、Ile184 の疎水性アミノ酸残基が結合に関与すると予測された。また、スコアリング関数に基づいた良好なリガンド結合能予測式も得られた。

D. 考察

今後、得られた結合様式と結合能予測式に基づいた合理的な薬物設計や既存の化合物データベースに対する *in silico* スクリーニングが可能である。

E. 結論

正常型プリオン蛋白質に対するリガンド分子の結合サイトが見いだされたことから、正常型プリオン蛋白質と異常型プリオン蛋

白質の結合を阻害する分子設計の実現可能性が高まった。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Masayo Tanaka, Takao Orii, Hiroyoshi Kobayashi, Motoko Kanke and Shuichi Hirono: Clinical estimation of vancomycin measurement method on hemodialysis patient. *YAKUGAKU ZASSHI*, 122, 269-275 (2002)

Akifumi Oda and Shuichi Hirono: The introduction of atom types and calculations of new parameters for charge equilibrium method. *Journal of Computer Chemistry, Japan*, in press (2003)

2. 学会発表

Hirono S: Estimation of the binding conformation of ligand molecules to the transporter cMOAT (MRP2) by conformational analyses and molecular superposition. 14th European Symposium on Quantitative Structure-Activity Relationships (Bournemouth, United Kingdom) September 8-13, 2002

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研 究 成 果 の 刊 行 に 関 す る 一 覧 表

研究成果の刊行に関する一覧表
雑誌

発表者名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	年
Sasaki K, Doh-ura K, Ironsides WJ, Iwaki T	Increased clusterin (apolipoprotein J) expression in human and mouse brains infected with transmissible spongiform encephalopathies.	Acta Neuropathol	103	199-208	2002
Nakajima M, Yamada T, Kusuhara T, Furukawa H, Takahashi Y, Kataoka Y, Doh-ura K	Returned cognition after quinacrine in patients with Creutzfeldt-Jakob disease.	Ann Neurol	52 (suppl)	S68	2002
Tanaka M, Orii T, Kobayashi H, Kanke M, Hirono S	Clinical estimation of vancomycin measurement method on hemodialysis patient.	YAKUGAKU ZASSHI	122	269-275	2002
Oda A, Hirono S	The introduction of atom types and calculations of new parameters for charge equilibrium method.	Journal of Computer Chemistry	in press		2003
堂浦克美	ヒトのプリオン病とその治療薬 剤開発の現状.	ファルマシア	38	635-639	2002
堂浦克美	プリオン病の治療薬開発.	医学のあゆみ	203(10)	923-930	2002
堂浦克美	プリオン病治療薬の開発.	神経研究の進歩	47(1)	109-118	2003
町田郁子, 福田安雄, 重松和人, 堂浦克美, 河野 茂	発症早期に脳病理所見を検討し 得た散発性 Creutzfeldt-Jakob 病の1剖検例.	神経内科	56(6)	517-522	2002
中島雅士, 山田達夫	Creutzfeldt-Jakob 病治療の可 能性：最近の治験からみた治療 への展望.	神経内科	57	413-418	2002
中島雅士, 山田達夫	プリオン病治療の現状と今後の 展望.	最新医学	58(5)	in press	2003
村井弘之	クロイツフェルト・ヤコブ病の 臨床診断.	臨床検査	46	1509- 1515	2002
村井弘之	CJD と vCJD.	Medical Briefs in Virus Infection	15	6-7	2002

20020888

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.23の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。