

20030761

厚生労働科学研究費補助金

こころの健康科学研究事業

即戦力的クロイツフェルト・ヤコブ病治療法の確立に関する研究

平成15年度 総括研究報告書

主任研究者 堂浦 克美

平成16年(2004年) 4月

目 次

| | ページ |
|--|--------|
| I. 総括研究報告書 | |
| 即戦力的クロイツフェルト・ヤコブ病治療法の確立に関する研究 堂浦克美（東北大学大学院医学系研究科） | ・・・ 1 |
| II. 分担研究報告書 | |
| ペントサンポリサルフェート脳室内投与療法の臨床応用に関する研究 堂浦克美（東北大学大学院医学系研究科） | ・・・ 8 |
| クロイツフェルト・ヤコブ病患者における抗マalaria薬、キナクリン、 キニーネ治療の効果と副作用に関する研究 山田達夫（福岡大学医学部） | ・・・ 11 |
| 金属特異的錯体形成能と抗プリオン活性との相関に関する研究 太田 茂（広島大学大学院医歯薬学総合研究科） | ・・・ 23 |
| ドッキング計算による異常型プリオン蛋白産生阻害化合物の3次元 ファーマコファの同定と3次元化合物データベースに対する <i>in silico</i> スクリーニングに関する研究 広野修一（北里大学薬学部） | ・・・ 25 |
| ヘパリン中のプリオン蛋白質の異常化を阻害する部分構造の推定と リード化合物の探索に関する研究 隅田泰生（鹿児島大学大学院理工学研究科） | ・・・ 27 |
| 抗プリオン化合物の特徴と <i>in vitro/in vivo</i> での作用に関する研究 堂浦克美（東北大学大学院医学系研究科） | ・・・ 29 |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | ・・・ 32 |
| IV. 研究成果の刊行物・印刷 | ・・・ 36 |

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
「即戦力的クロイツフェルト・ヤコブ病治療法の確立に関する研究」班
平成15年度班会議および総括会議

平成15年12月19日（火）14時～17時
北里大学薬学部1号館5階 1507号室

プログラム

1. はじめに

堂浦克美
（東北大学大学院医学系研究科）

2. ペントサンポリサルフェート脳室内投与療法の臨床応用

堂浦克美
（東北大学大学院医学系研究科）

3. クロイツフェルト・ヤコブ病患者におけるキナクリン治療の効果と安全性

坪井義夫、山田達夫
（福岡大学医学部）

4. 銅選択的キレート能を有する抗プリオン薬の開発

太田 茂
（広島大学大学院医歯薬学総合研究科）

5. ドッキング計算による異常型プリオン蛋白産生阻害化合物の3次元ファーマコファ
の同定と3次元化合物データベースに対する *in silico* スクリーニング

山乙教之、李 洪濤、広野修一
（北里大学薬学部）

6. ヘパリン中のプリオン蛋白質の異常化を阻害する部分構造の推定とリード化合物の
探索

隅田泰生、堂浦克美*
（鹿児島大学大学院理工学研究科、*東北大学大学院医学系研究科）

7. 抗プリオン化合物の特徴と *in vitro/in vivo* での作用

川竹悟史、西村有起、石川健介、久保郁子*、岩城 徹*、堂浦克美
（東北大学大学院医学系研究科、*九州大学大学院医学研究院）

総括研究報告

厚生科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
平成15年度 総括研究報告書

即戦力的クロイツフェルト・ヤコブ病治療法の確立に関する研究

主任研究者：堂浦克美 東北大学大学院医学系研究科・教授

研究要旨

硬膜移植後のクロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) が多発し、変異型 CJD 発生の脅威が迫っている本邦の現況では、即戦力的なプリオン病治療法が求められている。そこで治療法開発に関する研究を継続実施した。本年度は、(1) 抗プリオン化合物の条件として、Cu²⁺錯体となることで SOD 活性を持つことを明らかにした。(2) 強力な抗プリオン化合物である硫酸化多糖の抗プリオン活性を発揮する最小単位を明らかにした。(3) 抗プリオン化合物が正常型プリオン蛋白の代謝・分解に影響しないことを明らかにした。また、抗プリオン活性が感染因子株や感染細胞の種類によって大きく影響を受けることを明らかにした。(4) ペントサンポリサルフェート脳室内持続投与療法の治療効果と安全性を、英国の変異型ヤコブ病患者で確認した。(5) キノリン環含有化合物であるキナクリンとキニーネについて、それぞれ 31 症例と 6 症例での治療研究を分析し、両薬剤とも症例の約 3 割に一過性の効果が、約 5 割に肝障害などの副作用が認められることを明らかにした。(6) プリオン阻害活性のための 3 次元ファーマコフォアを解明し、*in silico* スクリーニングを行った。

分担研究者

山田達夫 福岡大学医学部・教授
広野修一 北里大学薬学部・教授
太田 茂 広島大学大学院医歯薬学総合
研究科・教授
隅田泰生 鹿児島大学大学院理工学研究科
・教授

研究は疾患モデル動物による *in vivo* 薬効評価の成果を踏まえたものであり、同薬効評価にて有効性を確認した臨床薬剤を患者に応用する。なお、脳血液関門を通りにくい臨床薬剤は CJD の標的臓器である脳に直接持続投与する方法を確立する。

(3) (1) の知見を元に次世代型の治療薬候補化合物を開発する。より強力な抗プリオン作用を持ち脳移行の良い医薬分子をコンピュータを使った合理的医薬分子設計技術を駆使して開発する。これらの研究を遂行し、最終年度としてまとめた。

A. 研究目的

クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) は稀少な神経難病であるが、不幸にも本邦では多数のヒト乾燥硬膜移植後の CJD 患者が発生しており潜在的に危険な硬膜移植患者は 10 万人を越える。また、本邦でもウシ海綿状脳症が発生し変異型 CJD 勃発の脅威が迫っている。このような急迫した状況にあり CJD の即戦力的治療法が至急に必要である。本研究では CJD の発症予防と発症患者の生命予後改善をめざし、即戦力的治療法の確立に関する以下の 3 点の研究を行う。

(1) 他の目的に使用されている臨床薬剤の中で抗プリオン作用を持つものを探索し、その作用機序を解明する。

(2) (1) の薬剤による第 1 世代型 CJD 治療法を確立するための臨床研究を行う。この

B. 研究方法

(1) 薬物スクリーニングと *in vitro/in vivo* 薬効評価 (担当：堂浦) および抗プリオン化合物の作用機序解明 (担当：太田、隅田、堂浦)

in vitro 実験系 (各種プリオン持続感染培養細胞) や *in vivo* 実験系 (ハムスター型プリオン蛋白過剰発現マウス (Tg7) と 263K 株病原因子、あるいはマウス型プリオン蛋白過剰発現マウス (Tga20) と福岡 1 株病原因子/RML 株病原因子よりなる動物疾

患モデル) を用いて新規治療薬候補の探索を継続するとともに、作用機序解明を行った。抗プリオン化合物の構造より錯体形成能が示唆されたため、錯体形成能と SOD 活性を測定した。

また、強力な抗プリオン化合物である硫酸化多糖の中で抗プリオン活性を発揮する最小単位を明らかにするため、多種の低分子化ヘパリンを調整し、抗プリオン活性を測定し構造特異性を推定した。さらにその構造を合成し、合成化合物を用いて構造特異性を検証した。

一方、抗プリオン化合物の正常型プリオン蛋白代謝・分解への影響を代謝標識法+免疫沈降法や、分解酵素を含む画分との反応実験にて解析した。また、病原因子株や細胞種が異なる 4 種類のプリオン持続感染培養細胞を用いて、感染因子株や感染細胞の種類の違いによる抗プリオン活性への影響を調べた。

(2) 患者における臨床研究 (担当: 山田、堂浦)

発症後 1 年 4 ヶ月の 18 歳の変異型ヤコブ病の男性で体内埋め込み型持続注入器具を用いてペントサンポリサルフェート (11 μ g /kg /日) の脳室内持続投与療法を開始し、継続した。患者は、在宅看護を受けており、月に 1 度は薬液の交換・充填と頭部 CT 検査・髄液検査・血液凝固系検査・血液生化学検査のため近隣の病院に通院している。

一方、キノリン環含有化合物であるキナクリンとキニーネの治療効果および副作用の検討を、この 3 年間に実施した全ての症例で行った。キナクリンは孤発性 CJD 22 例、医原性(硬膜移植後発症) CJD 5 例、遺伝性プリオン病 4 例の計 31 症例に、300 mg /日を経口または経管投与を行った。キニーネは孤発性 CJD 6 例に対し、1.5 g /日を経口または経管投与を行った。両者とも副作用出現により中止・中断しない限り 12 週間連日投与した。

(3) 次世代型治療薬の開発 (担当: 広野、堂浦)

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と市販のドッキングプログ

ラムを用いたモデリング実験にて抗プリオン活性に必要な 3 次元ファーマコフォアを求めた。このデータを元に ChemACX-SC2000 データベースに登録されている約 51 万化合物について SYBYL FlexX を用いて、正常型プリオン蛋白に対するドッキングを行い、S ポケットに結合しうる化合物の探索を行った。

(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われた。患者に対する臨床試験は、英国症例では英国連邦政府高等裁判所などで審議され認められた。本邦症例では、患者が入院中の各施設における倫理審査委員会の承認を得て行われた。治療の施行にあたっては、患者および家族に対し研究の目的・内容・危険性および得られたデータの取り扱いについて十分な説明を行い、書面での同意を得た。

C. 研究結果

(1) 今年度新たに、複数の抗ウイルス製剤に疾患動物モデルで治療効果を認めた。その薬効成分や作用機序については、さらに詳細な解析が必要である。

一方、有効な抗プリオン化合物の構造解析より、有効な化合物の条件は、Cu²⁺のみに共通した選択的キレート作用が認められること、Cu²⁺錯体となることで非常に強い SOD 活性を持つことが示された。また、抗プリオン化合物は適度な脂溶性を持つことが構造より推定されたが、抗プリオン活性及び SOD 活性と分配係数の間にわずかながら負の相関が認められ、抗プリオン活性及び SOD 活性に化合物の脂溶性が関与していることが示唆された。一方、分配係数と細胞毒性、細胞毒性の組織選択性に相関は認めなかった。

強力な抗プリオン作用を持つ硫酸化多糖についてヘパリンを例に抗プリオン活性を持つ最小単位を調べた。その結果、ヘパリン中のある二糖構造が抗プリオン活性に重要であることを見出した。次いでこの二糖構造を複数(4-8 単位)有する化合物を合成し、プリオン持続感染細胞で調べたところ抗プリオン活性が検証できた。

ところで、硫酸化多糖やコンゴレッドな

どの抗プリオン化合物は正常型プリオン蛋白への結合親和性が極めて高いが、これらは正常型プリオン蛋白代謝やターンオーバーに影響しなかった。さらに、ライソゾーム活性やラフト上に存在する PrPase(s) 活性にも影響しなかった。

一方、*in vitro* で極めて有効な抗プリオン化合物の中で、脳内に容易に移行し異常プリオン蛋白と結合することが確認できる化合物であるにもかかわらず、*in vivo* では有意な潜伏期間の延長が観察されなかった。この原因を *in vitro* で調べたところ、同一の抗プリオン化合物で同じ種類の細胞であっても感染している病原因子株によって抗プリオン活性は異なっていた。また、同一化合物で同じ病原因子株が感染していても細胞の種類が異なると抗プリオン活性は異なっていた。

(2) ベントサンポリサルフェート脳室内持続投与療法について、変異型 CJD 症例では病期がかなり進行してから治療を開始したため、すでに脳高次機能の障害がひどく脳高次機能の改善を判定するのは困難であったが、治療開始後は明らかな神経症状の増悪はなく、人や物への固視回復、日内リズム回復、簡単な指示動作への対応改善、単語レベルの発語出現、嚥下機能改善による誤嚥性肺炎消失、体重増加が確認された。副作用は発生していない。

一方、キナクリン治療については、臨床症状に部分的改善を認めた症例は 12 例 (39%) で、効果の平均持続期間は 3.2 ± 3.5 週 (1~12 週) であった。効果はキナクリン投与が継続されていたにもかかわらず消退した。効果の内容は覚醒度の改善、自発語の増加、固視反応の改善などであった。孤発性 CJD 症例においては、治療開始時に自発語や聴覚・視覚刺激に反応を認めた 10 例中の 8 例 (80%) に部分的改善を認めたが、無動性無言状態で治療を開始した 12 例では 1 例 (8%) にのみ効果を認めた。一方、医原性 CJD 症例では 5 例中 2 例 (40%) に覚醒度の改善を認めた。遺伝性プリオン病症例では 4 例のうち長期経過の 1 例 (GSS¹⁰²) において効果を認めたが、他の 3 例 (いずれも CJD²⁰⁰) では無効であった。治療中止を余儀なくされた副作用とし

て、肝機能障害を 16 例 (52%) に、溶血性貧血、発熱、誤嚥、偽膜性大腸炎、および皮疹をそれぞれ 1 例に認めた。副作用症状はキナクリン投与中止後に全例で改善した。キナクリン投与中の死亡例として、投与開始 10 日目に誤嚥・窒息が疑われ死亡した 1 例と、12 週間を過ぎて継続投与中に突然死した 1 例を認めた。前者はキナクリン投与前から認めていた出血性胃潰瘍と嘔吐が死因に関与したと考えられた。後者は突然死の原因は不明であった。

キニーネ治療では、1 例は投与 3 週後に笑顔が見られるなどの変化があり、もう 1 例は投与後一過性に聴覚、視覚に対する反応性の増加を認めた。他の 4 例は明らかな変化を認めなかった。副作用は肝機能障害、肝機能障害+血小板減少、皮疹をそれぞれ 1 例に認め、そのために治療を中断した。副作用は全例キニーネ中止後に改善した。

(3) ChemACX-SC2000 データベースに登録されている約 51 万化合物の内、抗プリオン活性を持つことが期待される化合物数は、309 化合物であった。現在、71 化合物についてドッキング計算が終わったところであるが、既存の化合物と同等かそれ以上の抗プリオン活性を持つと予測される化合物が、6 化合物ヒットしている。これらの化合物についてプリオン持続感染細胞で抗プリオン活性を測定したところ既存の化合物と同等かそれ以上の活性が確認できた。

D. 考察

(1) 複数の抗ウイルス製剤に *in vivo* で治療効果を認めたことに関しては、作用機序などはまったく不明であるが、この研究の進展しただけではプリオン仮説が覆り、当該分野の研究の方向が 180 度反転する可能性がある。

一方、キノリン環含有化合物の研究から有効な抗プリオン化合物の条件は、Cu²⁺ 選択的キレート能を有すること、さらに Cu²⁺ 錯体となることで SOD 活性を持つこと、そして適度な脂溶性を持つことで治療における有効域を広く保つことであると示唆された。これらの条件をすべて満たし細胞毒性が低い 2,2'-biquinoline の誘導体である 6,6'-dinitirobiquinoline を合成し、作用

機序について検討したところ、6,6'位のニトロ置換基はより強いCu²⁺選択的キレート作用を持ち有効であることが示唆された。

強力な抗プリオン活性を持つ硫酸多糖の活性部位解析では、ヘパリン中の抗プリオン活性を持つ最小部分構造が判明した。この構造に基づいて血液脳関門の透過性を向上させた新薬開発に向けての研究展開が可能となった。また、この最小部分構造をチップ上に貼り付けたシュガーチップを用いて、異常型プリオン蛋白を表面プラズモン共鳴法によって迅速、簡便に測定する系を確立することも可能となった。

正常型プリオン蛋白に強い親和性を持つ抗プリオン化合物でも、正常型プリオン蛋白の代謝やターンオーバーに影響しないということが明らかとなった。したがって、抗プリオン化合物は異常型プリオン蛋白の前駆体である正常型プリオン蛋白の寿命などに影響を及ぼし効果を発揮しているわけではなく、正常型から異常型への変換を阻害するように直接正常型と相互作用していることが推定された。

*in vitro*では一桁ナノモルオーダーで抗プリオン活性を発揮し、末梢血管からの投与で高い脳移行性があり、脳内の異常プリオン蛋白とも強力に結合するにもかかわらず治療効果が見られない抗プリオン化合物があることが判明した。これは、4種の持続感染細胞での実験結果で見られたような病原因子株による効果の差や同じ神経細胞でも種類による効果の差が関係しているのかもしれない。異常型プリオン蛋白産生にかかわる宿主因子がまったく解明されていないため、これらの分子メカニズムについてはまったく不明であり、今後の検討課題である。

(2) 患者におけるペントサンポリサルフェート脳室内投与療法最大の課題は、どのようにして患者での最適な投与量を探っていくかということである。現在の維持投与量は、マウスを用いた動物実験で得られた最適投与量の20分の1である。動物実験からだけではヒトの最適投与量を予想することは困難であり、しかもペントサンポリサルフェートは弱いながらもヘパリンと同様な抗凝血作用(ヘパリンの15分の1の効果)がある

ため、まずマウスでの最適投与量と同量を患者に投与してみてその後量の調整を図っていくということは危険である。英国では、ペントサンポリサルフェート脳室内持続投与が本症例のような進行例でもある程度の有効性を示したことから、心配された重篤な副作用が見られなかったことより、存命中の変異型CJD患者や遺伝性プリオン病患者(特に発症早期例)で同治療法が実施されており、複数の患者で同治療法の効果と安全性が確認されることになる。

多施設における調査の結果、キナクリンはプリオン病患者において臨床的に短期間の部分的改善をもたらすことが明らかになった。肝障害による中止例が多かったが、肝障害は血中キナクリン濃度と関連しており、他の副作用と同様に可逆的な障害と考えられた。検討を行った限りにおいて、副作用の出現を治療開始前に予測できる因子の存在を確認できず、キナクリンの吸収・代謝の個体差が考えられる。早期例での治療効果の発現率が高いことと、キナクリン投与中の死亡例が進行例で全身状態が安定していなかったことより、キナクリン治療の適応症例を絞込む必要がある。また、注意深い経過観察と血中濃度モニターにより重篤な副作用は十分に防げると考えられる。また、ベラパミルがキナクリンの脳移行を高めること、シメチジンが肝臓へのキナクリンの取り込みを抑えることが報告されており、これらの薬物を併用することでより安全性と効果を高めることが可能かもしれない。さらに、今回認められた効果は、キナクリンの血中濃度が比較的低い治療早期であったことから、低用量での使用を検討する必要がある。キニーネもキナクリンと同様な機序で作用している可能性があるが、さらに症例数を重ねて血中濃度モニターを含め詳細に検討する必要がある。

(3) *in silico*スクリーニングでヒットした化合物について検討した結果、正常型プリオン蛋白のSポケット近傍に存在するフリーの水素結合性残基(Gln160、Tyr162)や疎水性残基(Leu130、Pro158、Val161)と更なる相互作用を付加することでSポケットに対する結合能や選択性を増強する分子設計も可能であると考えられた。

E. 結論

(1) 抗プリオン化合物の条件として、Cu²⁺錯体となることでSOD活性を持つことと適度な脂溶性を持つことを明らかにした。また、強力な抗プリオン化合物である硫酸化多糖の中で抗プリオン活性を発揮する最小単位を明らかにした。さらに、抗プリオン化合物は、正常型プリオン蛋白代謝に影響しないことを明らかにした。脳移行性で異常プリオン蛋白高親和性であってもin vitroとin vivoで治療効果にギャップのある化合物があることを明らかにした。さらに、抗プリオン作用が感染因子株や感染細胞の種類に影響を受けることを明らかにした。

(2) 変異型CJD患者においてペントサンポリサルフェート脳室内持続投与療法を実施し、患者での治療効果と安全性を確認した。また、抗マラリア薬キナクリンとキニーネの治療効果および副作用を分析し、いずれも約3割の患者で約3週間持続する一過性の効果が見られ、約5割の患者で副作用が出現することを明らかにした。

(3) 抗プリオン活性に必須な3次元ファーマコフォアを持ち、Sポケットに結合しうる化合物について、*in silico*スクリーニングを行い6種の新たな抗プリオン化合物を発見した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Doh-ura K, Ishikawa K, Murakami-Kubo I, Sasaki K, Mohri S, Race R, Iwaki T. Treatment of transmissible spongiform encephalopathy by intraventricular drug infusion. *J Virol* (in press), 2004

Furukawa H, Doh-ura K, Okuwaki R, et al. A pitfall in diagnosis of human prion diseases using detection of protease-resistant prion protein in urine: contamination with bacterial outer membrane proteins. *J Biol Chem* (in press), 2004

Ishikawa K, Doh-ura K, Kudo Y, Murakami-Kubo I, Ando Y, Sawada T, Iwaki T. Amyloid imaging probes are useful for evaluation and treatment of transmissible spongiform encephalopathies. *J Gen Virol* (in press), 2004

Furukawa H, Doh-ura K, Sasaki K, Iwaki T. Accumulation of prion protein in the degenerated muscle fibers of experimental chloroquine myopathy: *in vivo* model for deposition of prion protein in non-neuronal tissues. *Lab Invest* (in press), 2004

Murakami-Kubo I, Doh-ura K, Ishikawa K, Kawatake S, Sasaki K, Kira J, Ohta S, Iwaki T. Quinoline derivatives are therapeutic candidates for transmissible spongiform encephalopathies. *J Virol* 78:1281-1288, 2004

Tsuji Y, Kanamori H, Murakami G, Yokode M, Mezaki T, Doh-ura K, Taniguchi K, Matsubayashi K, Fukuyama H, Kita T, Tanaka M: Heidenhain variant of Creutzfeldt-Jakob disease: diffusion-weighted MRI and PET characteristics. *J Neuroimaging* 14:63-66, 2004

Jin K, Shiga Y, Shibuya S, Chida K, Sato Y, Konno H, Doh-ura K, Kitamoto T, Itoyama Y. Clinical features of Creutzfeldt-Jakob disease with V180I mutation. *Neurology* 62:502-505, 2004

Ando Y, Haraoka K, Terazaki H, Tanoue Y, Ishikawa K, Katsuragi S, Nakamura M, Sun X, Nakagawa K, Sasamoto K, Takesako K, Ishizaki T, Sasaki Y, Doh-ura K. A novel tool for detecting amyloid deposits in systemic amyloidosis in vitro and in vivo. *Lab Invest* 83:1751-1759, 2003

Sasaki K, Doh-ura K, Furuta A, Nakashima S, Morisada Y, Tateishi J, Iwaki T: Neuropathological features of a case with schizophrenia and prion protein gene P102L mutation before onset of

- Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. *Acta Neuropathol* 106: 92-96, 2003
- Nishida T, Tokumaru AM, Doh-ura K, Hirata A, Motoyoshi K, Kamakura K: Probable sporadic Creutzfeldt-Jakob disease with valine homozygosity at codon 129 and bilateral middle cerebellar peduncle lesions. *Intern Med* 42:199-202, 2003
- Kikuchi H, Yamada T, Furuya H, Doh-ura K, Ohyagi Y, Iwaki T, Kira J: Involvement of cathepsin B in the motor neuron degeneration of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 105:462-468, 2003
- Nakajima M, Yamada T, Kusuhara T, et al. Results of quinacrine administration to patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 17:158-163, 2004
- Akifumi Oda and Shuichi Hirono. Geometry-dependent atomic charge calculations using charge equilibration method with empirical two-center Coulombic terms. *Journal of Molecular Structure: (THEOCHEM)*, 634, 159-170 (2003)
- Suda Y, Arano A, Kusumoto S, Sobel M. Advanced Sugar Chips Immobilized with Clustered Heparin-derived Oligosaccharides and their Application for Surface Plasmon Resonance. Conference Abstract for IUMR-ICAM 2003, 135, 2003
- Suda Y, Arano A, Hayashi H, Kusumoto S, Sobel M. Advanced Analytical System for the Biological Function of Oligosaccharides. Conference Abstract for IUMR-ICAM2003, 136, 2003
- Suda Y, Arano A, Hayashi H, Kusumoto S, Sobel M. Sugar Chip: Advanced Analytical System for the Biological Function of Oligosaccharides. Conference Abstract for 9th International Kyoto Conference of Organic Chemistry, 99, 2003
- Suda Y. Sugar Chip: Advanced Analytical System for the Elucidation of Biological Function of Oligosaccharides. Symposium Abstract for 2nd 21st Century COE, 7th SANKEN international Symposium, 34-35, 2004
- 堂浦克美: プリオン病治療薬の開発. *神経研究の進歩*, 47:109-118, 2003
- 堂浦克美: プリオン病研究の進歩. *脳科学研究の現状と課題* 杉田秀夫、高橋清久編集、311-315 頁、平成 15 年 9 月、じほう社、東京
- 中島雅士、山田達夫: Creutzfeldt-Jakob 病治療の可能性- 最近の知見からみた治療への展望- . *神経内科*. 57(5):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):94-98, 2003
- 藤木富士夫、山田達夫: プリオン病. *臨床神経科学*. 21(8):926-928, 2003
- 小林由佳、平田幸一、田中秀明、山田達夫: 硬膜移植歴のあるクロイツフェルト・ヤコブ病患者に対するキナクリン投与の影響. *臨床神経学*. 43(7)403-408, 2003
2. 学会発表
- 堂浦克美: 「プリオン病の治療戦略」 第 26 回日本医学会総会学術講演会、痴呆の克服、シンポジウム、福岡、2003 年 4 月
- 堂浦克美: 「プリオン病の治療」 第 44 回日本神経学会総会、シンポジウム、横浜、2003 年 5 月
- 堂浦克美: 「ヒトプリオン病の現況」 第 51 回日本輸血学会総会、シンポジウム、北九州、2003 年 5 月
- 堂浦克美: 「BSE とヒトプリオン病」 第 24 回衛生微生物技術協議会総会、シンポジウム、福岡、2003 年 7 月
- Doh-ura K: "Experimental animal studies on pentosan polysulphate." Case conference on Jonathan Simms. An inter-disciplinary meeting. Belfast, UK, September 2003
- Kawatake S, Doh-ura K, Murakami-Kubo I, et al: "Interaction of anti-prion chemicals with prion protein analyzed by surface plasmon resonance." International prion conference.

- Munchen, Germany, October 2003
- Doh-ura K: "Interaction of prion protein and anti-prion chemicals." 第76回日本生化学会大会、シンポジウム、横浜、2003年10月
- 堂浦克美:「抗プリオン作用を持つ化合物の性質」生体分子ダイナミクスと機能立体構造形成研究会、岡崎、2003年12月
- 福内友子ら:プリオン病治療薬候補物質の金属選択的キレート作用 日本薬学会年会長崎 2003年3月
- Fukuuchi, T. et.al: Metal chelations of candidate compounds for prion disease treatments AIMECS 2003 Kyoto Oct., 2003
- 古川ひさ子、高橋三津雄、中島雅士、楠原智彦、堂浦克美、片岡泰文、山田達夫:尿中プリオン蛋白解析によるヒト・プリオン病早期診断の試み. 第44回日本神経学会総会. 横浜 2003, 5. 15-17
- 古川ひさ子、調 漸、堂浦克美、高橋三津雄、山田達夫、辻畑光宏、片峰茂、丹羽正美:プリオン病早期診断における尿中プロテアーゼ抵抗性蛋白解析の有用性に関する検討. 第22回日本痴呆学会. 東京 10. 3-4, 2003
- Tsuboi Y: Effects and Safety of Quinacrine Treatment for Creutzfeldt-Jakob Disease. CASE CONFERENCE ON JONATHAN SIMMS, An Inter-disciplinary Meeting. Belfast UK. 2003, 9. 26.
- 山乙教之、李 洪涛、広野修一:疎水性ポテンシャルを用いたプリオン蛋白質上のリガンド結合部位の同定と複合体立体構造の構築 第47回日本薬学会関東支部大会(東京) 日本薬学会関東支部 2003. 10. 4
- 山乙教之、李 洪涛、広野修一:疎水性ポテンシャルを用いたプリオン蛋白質上のリガンド結合部位の同定と FlexX を用いた複合体構造の構築 2003年度 TRIPOS ユーザー会(東京) 2003. 11. 21
- Suda Y, Arano A, Kusumoto S, Sobel M: Advanced Sugar Chips Immobilized with Clustered Heparin-derived Oligosaccharides and their Application for Surface Plasmon Resonance, IUMRS-ICAM2003, Yokohama, Oct. 2003
- Suda Y, Arano A, Hayashi H, Kusumoto S, Sobel M: Advanced Analytical System for the Biological Function of Oligosaccharides, IUMRS-ICAM2003, Yokohama, Oct. 2003
- Suda Y, Arano A, Sato M, Uetani M, Kato Y, Kubo M, Teng H-H, Iwata H, Hayashi H, Kusumoto S, Sobel M: Sugar Chip: Advanced analytical system for the binding interaction of oligosaccharides at nanometer scale, 第76回日本生化学会大会、Yokohama, Oct. 2003
- Suda Y, Arano A, Hayashi H, Kusumoto S, Sobel M: Sugar Chip: Advanced Analytical System for the Biological Function of Oligosaccharides, 9th International Kyoto Conference of Organic Chemistry, Kyoto, Nov. 2003
- Suda Y: Sugar Chip: Advanced Analytical System for the Elucidation of Biological Function of Oligosaccharides, 2nd 21st Century COE, 7th SANKEN international Symposium, Osaka, Jan. 2004.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- 工藤幸司、澤田徹、堂浦克美:プリオン蛋白蓄積性疾患の診断プローブおよび治療薬ならびにプリオン蛋白の染色剤。PCT/JP03/11056 2003年8月
- 隅田泰生、荒野明男、楠本正一、マイケル ソーベル:リンカー化合物及びリガンド、並びにそれらの製造方法。PCT/JP03/11417、特願 2003-190568
- 隅田泰生、荒野明男、林秀樹、楠本正一、マイケル ソーベル:多岐用途型リンカー化合物及びリガンド、並びにそれらの製造方法。PCT/JP03/09973、特願 2003-190637
- 隅田泰生:2鎖又は3鎖の炭化水素誘導鎖から成る多岐構造を有するリガンド、リガンド担持体、および、そのリガンドを用いたタンパク質の分析方法。特願 2004-041994
- 隅田泰生、荒野明男、楠本正一、マイケル ソーベル:リンカー化合物及びリガンド、並びにそれらの製造方法。特願 2004-029562

分 担 研 究 報 告

ペントサンポリサルフェート脳室内投与療法の臨床応用に関する研究

主任研究者：堂浦克美 東北大学大学院医学系研究科・教授

研究要旨

動物実験でのペントサンポリサルフェート脳室内持続投与療法の効果と安全性を踏まえ、英国の変異型ヤコブ病患者で臨床試験を行った。進行期での治療開始であったが、ある程度の効果が観察された。これまでにこの治療法による副作用はまったく出現していない。患者で最大効果が期待できる安全投与量を如何に見つけるかが課題である。

A. 研究目的

昨年度報告した動物実験で得られたペントサンポリサルフェート(PPS)脳室内持続投与療法の効果と安全性の結果を踏まえ、英国の変異型ヤコブ病患者1名でPPS脳室内持続投与療法を実施した。PPS脳室内持続投与療法の実際と患者の臨床経過を詳しく報告し、同治療法の問題点について考察する。

B. 研究方法

〔症例と治療の実際〕

19歳男性。2年4ヶ月前(17歳時)に大好きなサッカーへの関心の低下、巧緻運動障害、軽度の構音障害で発症した。近隣の病院でMRI所見より変異型ヤコブ病が疑われた。脳波、脳脊髄液は正常であった。発症2ヵ月後には歩行障害が顕著となりミオクローヌスが出現した。発症4ヶ月目に扁桃生検で変異型ヤコブ病が確定し、キナクリン治療が行われたが無効であった。発症8ヶ月頃に嚥下障害が出現し、一過性の呼吸停止をきたした。その後神経症状は急速に増悪し臥床状態。会話は困難で唾液の頻回な誤嚥による肺炎を繰り返した。嚥下障害のため胃ろうより栄養補給が開始された。

発症1年4ヶ月目(1年前)に右側脳室前角部へのカテーテル留置手術が行われた。その約2週間後よりOmmaya reservoirに外部より微量注入ポンプを接続し、PPS(SP54、Bene Arzneimittel GmbH社製を0.9% NaClで希釈して使用)を $1\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ (5ml/日)20時間かけて投与が開始された。翌日より $1\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ づつ増量されて、11日

目に予定の維持量($11\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$)に達した。この間に副作用は出現しなかった。その後、患者は体内埋め込み型持続注入器具(SynchromedR、Medtronic社製)を右上腹部の皮下に埋め込み脳室カテーテルに接続する手術を受けた。術後2週目より維持量($11\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$)が再開された。患者は、在宅看護を受けており、月に1度はPPS薬液の交換・充填と頭部CT検査・髄液検査・血液凝固系検査・血液生化学検査のため近隣の病院に通院している。

(倫理面への配慮)

本患者へのPPS脳室内投与療法の実施は、英国連邦政府高等裁判所、北アイルランド高等裁判所、さらにはLREC(ローカル・リサーチ倫理審査会)で審議され、患者の権利として認められている。

C. 研究結果

〔経過と治療効果〕

体内埋め込み型注入器具による脳室内PPS持続注入が開始されて7ヶ月目に、右頭頂部に硬膜下水腫が確認され、先頭術にて吸引除去されたが、明らかにPPSによると考えられる副作用(高濃度PPS投与群の動物で観察されたような痙攣や脳出血など)は出現していない。

本症例は病期がかなり進行してからPPS治療が開始されたため、すでに脳高次機能の障害がひどく、脳高次機能の改善を判定するのは困難であったが、PPS治療開始後は明らかな神経症状の増悪はなく、ミオクローヌス

の減少、人や物への固視の回復、日内リズムの回復、簡単な指示動作への対応の改善、単語レベルの発語の出現、嚥下機能改善による誤嚥性肺炎の消失、体重の増加が確認されている。特に嚥下機能の改善は目覚しく、PPS開始以前には24時間体制で唾液吸引処置を必要としたのが、PPS開始後は唾液吸引処置を全く必要としなくなった。

他覚的には、髄液所見やCTなどの画像所見に明らかな変化を認めず、脳幹機能の改善を示す heart rate variability の所見が指摘されている。

D. 考察

患者における PPS 脳室内投与療法の最大の課題は、どのようにして患者での最適な投与量を探っていくかということである。現在の維持投与量は、マウスを用いた動物実験で得られた最適投与量の20分の1である(1)。マウスとヒトでは薬物代謝効率が違うのは明らかであり、脳室内に投与した際の薬物の分布動態が異なる可能性も否定できないため、動物実験からだけではヒトの最適投与量を予想することは困難である。しかし、PPSは弱いながらもヘパリンと同様な抗凝血作用(ヘパリンの15分の1の効果)があり、PPS脳室内投与の副作用として脳出血などの致死性の重篤なものが想定されるだけに、まずマウスでの最適投与量と同量を患者に投与してみてその後には量の調整を図っていくということではできない。英国では、PPS脳室内持続投与が本症例のような進行例でもある程度の有効性を示したことから、心配された重篤な副作用が見られなかったことより、存命中の変異型ヤコブ病患者や遺伝性プリオン病患者(特に発症早期例)にも同治療法が実施されており、複数の患者で同治療法の効果と安全性が確認されることになる。

なお、本症例で経過中に出現した硬膜水腫の原因として、内容物が血性でなかったことよりPPSの副作用とは考えられない。本症例において、月一度の髄液検査で15~20mlの多量の髄液が脳室内カテーテルから吸引されていること、脳萎縮による脳室拡大があること、カテーテル留置のために前頭部経皮質的手術アプローチが取られたことなどは、術

後の硬膜水腫発生のリスクファクターとして報告されている要因に合致するものである。

E. 結論

変異型CJD患者においてペントサンポリサルフェート脳室内持続投与療法を実施し、患者での効果と安全性を確認した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Doh-ura K, Ishikawa K, Murakami-Kubo I, Sasaki K, Mohri S, Race R, Iwaki T. Treatment of transmissible spongiform encephalopathy by intraventricular drug infusion. *J Virol* (in press), 2004
- 2) Furukawa H, Doh-ura K, Okuwaki R, et al. A pitfall in diagnosis of human prion diseases using detection of protease-resistant prion protein in urine: contamination with bacterial outer membrane proteins. *J Biol Chem* (in press), 2004
- 3) Ishikawa K, Doh-ura K, Kudo Y, Murakami-Kubo I, Ando Y, Sawada T, Iwaki T. Amyloid imaging probes are useful for evaluation and treatment of transmissible spongiform encephalopathies. *J Gen Virol* (in press), 2004
- 4) Furukawa H, Doh-ura K, Sasaki K, Iwaki T. Accumulation of prion protein in the degenerated muscle fibers of experimental chloroquine myopathy: *in vivo* model for deposition of prion protein in non-neuronal tissues. *Lab Invest* (in press), 2004
- 5) Murakami-Kubo I, Doh-ura K, Ishikawa K, Kawatake S, Sasaki K, Kira J, Ohta S, Iwaki T. Quinoline derivatives are therapeutic candidates for transmissible spongiform encephalopathies. *J Virol* 78:1281-1288, 2004
- 6) Tsuji Y, Kanamori H, Murakami G, Yokode

M, Mezaki T, Doh-ura K, Taniguchi K, Matsubayashi K, Fukuyama H, Kita T, Tanaka M: Heidenhain variant of Creutzfeldt-Jakob disease: diffusion-weighted MRI and PET characteristics. *J Neuroimaging* 14:63-66, 2004

7) Jin K, Shiga Y, Shibuya S, Chida K, Sato Y, Konno H, Doh-ura K, Kitamoto T, Itoyama Y. Clinical features of Creutzfeldt-Jakob disease with V180I mutation. *Neurology* 62:502-505, 2004

8) Ando Y, Haraoka K, Terazaki H, Tanoue Y, Ishikawa K, Katsuragi S, Nakamura M, Sun X, Nakagawa K, Sasamoto K, Takesako K, Ishizaki T, Sasaki Y, Doh-ura K. A novel tool for detecting amyloid deposits in systemic amyloidosis in vitro and in vivo. *Lab Invest* 83:1751-1759, 2003

9) Sasaki K, Doh-ura K, Furuta A, Nakashima S, Morisada Y, Tateishi J, Iwaki T: Neuropathological features of a case with schizophrenia and prion protein gene P102L mutation before onset of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. *Acta Neuropathol* 106: 92-96, 2003

10) Nishida T, Tokumaru AM, Doh-ura K, Hirata A, Motoyoshi K, Kamakura K: Probable sporadic Creutzfeldt-Jakob disease with valine homozygosity at codon 129 and bilateral middle cerebellar peduncle lesions. *Intern Med* 42:199-202, 2003

11) Kikuchi H, Yamada T, Furuya H, Doh-ura K, Ohyagi Y, Iwaki T, Kira J: Involvement of cathepsin B in the motor neuron degeneration of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 105:462-468, 2003

12) 堂浦克美: プリオン病治療薬の開発. *神経研究の進歩*, 47:109-118, 2003

13) 堂浦克美: プリオン病研究の進歩. *脳科学研究の現状と課題* 杉田秀夫、高橋清久編集、311-315頁、平成15年9月、じほう社、東京

2. 学会発表

1) 堂浦克美: 「プリオン病の治療戦略」 第26回日本医学会総会学術講演会、痴呆の克服、シンポジウム、福岡、2003年4月

2) 堂浦克美: 「プリオン病の治療」 第44回日本神経学会総会、シンポジウム、横浜、2003年5月

3) 堂浦克美: 「ヒトプリオン病の現況」 第51回日本輸血学会総会、シンポジウム、北九州、2003年5月

4) 堂浦克美: 「BSE とヒトプリオン病」 第24回衛生微生物技術協議会総会、シンポジウム、福岡、2003年7月

5) Doh-ura K: "Experimental animal studies on pentosan polysulphate." Case conference on Jonathan Simms. An inter-disciplinary meeting. Belfast, UK, September 2003

6) Kawatake S, Doh-ura K, Murakami-Kubo I, et al: "Interaction of anti-prion chemicals with prion protein analyzed by surface plasmon resonance." International prion conference. Munchen, Germany, October 2003

7) Doh-ura K: "Interaction of prion protein and anti-prion chemicals." 第76回日本生化学会大会、シンポジウム、横浜、2003年10月

8) 堂浦克美: 「抗プリオン作用を持つ化合物の性質」生体分子ダイナミクスと機能立体構造形成研究会、岡崎、2003年12月

H. 知的財産権の出願・登録状況

工藤幸司、澤田徹、堂浦克美: プリオン蛋白蓄積性疾患の診断プローブおよび治療薬ならびにプリオン蛋白の染色剤。

PCT/JP03/11056 2003年8月

厚生科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
平成15年度 分担研究報告書

クロイツフェルト・ヤコブ病患者における抗マラリア薬、
キナクリン、キニーネ治療の効果と副作用に関する研究

分担研究者：山田達夫 福岡大学医学部・教授
研究協力者：坪井義夫、中島雅士、藤木富士夫 福岡大学医学部
山内淳史、片岡泰文 福岡大学薬学部
堂浦克美 東北大学大学院医学系研究科

研究要旨

クロイツフェルト・ヤコブ病（CJD）に対する抗マラリア薬、キナクリン、キニーネの効果および副作用の検討を行った。キナクリンを孤発性CJD 22例、医原性（硬膜移植後発症）CJD 5例、遺伝性プリオン病4例の計31症例に、300 mg/日を経口または経管投与を行った。キニーネは孤発性CJD 6例に対し、1.5 g/日を経口または経管投与をなした。両者とも副作用出現により中止・中断されない限り原則として12週間連日投与とした。キナクリンは12例（39%）のプリオン病患者に、短期間（平均持続期間 3.2±3.5 週）ではあるが臨床的に部分的改善を示すことが明らかになった。肝機能障害による中止例（16例（52%））が多かった。早期例での治療効果の発現率が高いことより、キナクリン治療の適応症例を絞込む必要がある。効果は、キナクリンの血中濃度が比較的低い治療早期であったことから、低用量での使用を検討する必要がある。キニーネは症例数は限られていたが、臨床的效果はキナクリンと同様に2例（33%）で一過性の部分的改善を認め、副作用は3例（50%）に認められたが重篤ではなかった。両治療薬とも投与量や投与方法をさらに検討する必要がある。

A. 研究目的

クロイツフェルト・ヤコブ病（CJD）に代表されるプリオン病は致死性のヒト海綿状脳症である。孤発性（特発性）CJDに加えて、近年では汚染硬膜の移植による医原性CJDが国内で多発している。また、若年層に好発する変異型CJDが発生する脅威にわが国も曝されており、有効な治療法の開発が急務となっている。抗マラリア薬であるキナクリン、キニーネはプリオン持続感染細胞を用いた研究で抗プリオン作用が報告された薬物（1, 2）で、変異型CJD患者での効果が報告されている（3）。プリオン病患者において行われたキナクリン、キニーネ治療について、その効果と安全性について検討した。

B. 研究方法

臨床的にプリオン病と診断された症例をキナクリン治療研究の対象とした。診断基準としてはWHOを参考にしたプリオン病臨床診断基準（表1）に基づいた。研究に用いられたキナクリン、キニーネ製剤は、試薬を福岡大学薬学部薬学疾患管理学教室においてカプセルあるいは粉末に製剤化したものが使用された。

キナクリン治療は300 mg/日を1日3回に分けて経口投与または経管栄養患者では20 mlの温水に溶解して経管投与された。キナクリン投与は連日行われ、12週間の投与が原則とされた。痙攣の出現、骨髄抑制（白血球数 $<2,000/\mu\text{L}$ または顆粒球数 $<1,000/\mu\text{L}$ 、血小板数 $<50,000/\mu\text{L}$ 、ヘモグロビン濃度 $<8.0\text{ g/dL}$ ）、高度肝機能障害（AST, ALT）正常上限の5倍）、感染症、電解質異常、消化管症状の出現時には、キナクリン投与は中断あるいは中止された。これらの異常が改善した後にキナクリン投与を再開するかどうかは、患者の全身状態より各担当医が判断した。

キニーネ治療は1.5 g/日を1日3回に分けて経口投与された（または経管栄養患者では20 mlの温水に溶解して経管投与された）。連日投与で行われ、12週間の投与が原則とされた。溶血の徴候（尿ウロビリノーゲン強陽性、間接型高ビリルビン血症、I型LDH高値、黄疸）、全身痙攣、骨髄抑制（白血球数 $<2,000/\mu\text{L}$ または顆粒球数 $<1,000/\mu\text{L}$ 、血小板数 $<50,000/\mu\text{L}$ 、ヘモグロビン濃度 $<8.0\text{ g/dL}$ ）、肝機能障害（AST, ALT）正常上限の5倍）を中止基準とし、アステ

ミゾール（抗ヒスタミン剤）、ワルファリン、リトナビルはキニーネとの相互作用の可能性から併用禁忌とした。

抗マラリア薬の効果の分析には、各症例の診断、年齢、性、発症から治療開始までの期間、治療開始時の認知機能レベル（レベル1：自発開眼、運動を認める、レベル2：聴覚・視覚刺激に追視、驚愕反応を認める、レベル3：無動性無言）、などの臨床データを抽出した。効果の有無は、各担当医の意見及び調査票の具体的な変化の記載から判断した。抗マラリア薬の安全性に関しては、副作用の内容、中止の有無、中止後の転帰、血算・生化学の開始時から投与後可能な時期までの追跡、死亡症例ではキナクリン、キニーネ投与との因果関係を出来る限り詳細に検討した。臨床データは各研究協力施設の患者担当医（研究協力者）から送られた調査票の記載内容に基づいているが、不明な点は直接担当医に確認を行った。

（倫理面への配慮）

本研究は患者が入院中の各施設における倫理審査委員会の承認を得て行われた。患者・家族にインフォームドコンセントを行い、同意を得た場合にのみ治療研究が開始された。また患者・家族の同意に基づきプリオン蛋白遺伝子解析が行われた。

C. 研究結果

キナクリン治療を行った 31 症例の内訳は、男性 10 例、女性 21 例で、平均年齢は 61 ± 12 歳、発症から治療開始までの平均期間は 11 ± 16 ヶ月、キナクリンの平均投与総量は $15,529 \pm 9,516$ mg、平均投与日数は 56 ± 31 日、治療開始時の認知機能は無動性無言（レベル3）が 18 例、視覚・聴覚刺激に追視、驚愕反応が見られるもの（レベル2）が 9 例、自発運動・自発語が認められるもの（レベル1）が 4 例であった。

キニーネ治療を行った 6 症例は、男性 2 例、女性 4 例で、平均年齢は 64.7 ± 4.5 歳、発症から治療開始までの平均期間は 20.3 ± 28.5 ヶ月、キニーネの平均投与総量は 101.8 ± 47.1 g、平均投与日数は 68 ± 31.3 日、治療開始時の認知機能は無動性無言（レベル3）が 3 例、視覚・聴覚刺激に追視、驚愕反応が見られるもの（レベル2）が 3 例、自発運動・自発語が認められるもの（レベル1）は 0 であった。

I. キナクリン治療—効果

表 2-4 に孤発性 CJD 22 例、医原性（硬膜移植後発症）CJD 5 例、GSS 1 例、家族性 CJD 3 例の計 31 症例においてキナクリン治療結果を示した。効果を認めたと考えられる 12 例における改善の内容を表 5 にまとめた。覚醒度の改善や聴覚・視覚・痛覚刺激に対する反応の出現あるいは増加を 12 例に、発語の増加を 4 例に、感情表出の増加を 3 例に認めた。自発運動の改善・増加やミオクローヌス減少などの運動機能の変化は 7 例に認めた。脳波の変化は 2 例において報告があり、いずれも基礎波の出現と周期性同期性放電（PSD）の消失などが一過性に認められ、経過と共に元に戻った。

1. 孤発性 CJD（表 2）

孤発性 CJD 22 例には男性 7 例、女性 15 例が含まれる（表 4）。治療開始時に無動性無言（レベル3）が 12 例、視覚・聴覚刺激への追視や驚愕反応が見られるもの（レベル2）が 9 例、自発運動・自発語が認められるもの（レベル1）が 1 例であった。キナクリン治療が有効であった症例は 9 例（男性 3 例、女性 6 例）で平均年齢は 63.2 ± 8.6 歳で、効果の平均持続期間は 3.2 ± 3.5 週（1～12 週）であった。無効であった症例は 12 例（男性 4 例、女性 8 例、平均年齢 64.6 ± 10.1 歳）であり、両者で性、年齢に有意差はなかった。発症から治療開始までの期間は有効群で 9.1 ± 11.1 ヶ月、無効群で 7.3 ± 6.3 ヶ月であり両者に有意差はなかった。一方、治療開始時の認知機能レベルは、有効群の 9 例では認知機能レベル1あるいはレベル2の症例が 8 例あり、レベル3であった症例は 1 例のみであった。これに対し、無効群の 12 例では 10 例がレベル3であり、両群間には明らかな有意差が認められた（ $p < 0.001$ ）。

2. 医原性（硬膜移植後発症）CJD（表 3）

硬膜移植歴を有する医原性症例は 5 例で男性 2 例（年齢 20、72 歳）、女性 3 例（37、66、67 歳）であった。いずれも 1980 年代に脳外科手術歴があり硬膜移植を受けたことが確認されている。プリオン蛋白遺伝子解析が行われた 5 例中 4 例は治療開始時に無動性無言であったが、うち女性 2 例（症例 3 と 13）ではキナクリン治療により周囲刺激に対する反応の増加が 1 ヶ月ほど持続して認められた。

3. 遺伝性プリオン病（表 4）

4 例の遺伝性プリオン病患者の内訳は、男

性が1例(64歳:CJD²⁰⁰)、女性が3例(54歳:CJD²⁰⁰、64歳:CJD²⁰⁰、59歳:GSS¹⁰²)であった。なお、症例20は1991年に脳外科手術歴があり硬膜移植を受けている。プリオン蛋白遺伝子多型は3例で検討されており、すべて129番コドンがMet/Met、219番コドンがGlu/Gluであった。脳脊髄液14-3-3蛋白はGSS¹⁰²の症例20を除いてCJD²⁰⁰の3例は陽性であった。症例20は投与開始時の認知機能レベルは2であり、キナクリン治療開始後には意味のある発語の増加がみられた。CJD²⁰⁰の3例では無効であった。特に症例23は、運動失調で発症し発症3.5ヶ月で治療を開始した。開始時は失調性構音障害、失調性歩行を認めるも、認知機能はMMSEで23点であった。しかしながら、キナクリン投与にて明らかな症状の改善を示さずに認知機能、運動機能とも増悪した。

II. キナクリン治療—安全性

1. 治療中止の原因と転帰

予定されていた12週間の治療プロトコールを完了したのは31例の中で10例(32%)であった(図1)。中止された21例のうち16例は肝機能障害が原因であり、溶血性貧血、発熱、誤嚥、偽膜性大腸炎、および皮疹が原因となったのがそれぞれ1例であった(図2)。肝機能障害の16例は投与中止後には全例で改善を認めた。溶血性貧血、発熱、偽膜性大腸炎、および皮疹の各1例も中止後に症状は改善した。症例15は誤嚥が原因で死亡したと考えられるが、キナクリン投与との因果関係は後述する。

2. 肝機能障害の特徴

12週間の治療プロトコールを完了した症例の中にもASTあるいはALTの異常をきたした症例が8例あり、肝機能障害のため中止となった16例を加えた合計24例(77%)に何らかの肝機能障害を認めた。一方、全く肝機能障害を示さない症例も存在した(図3)。肝機能障害は投与開始後2週~6週に出現することが多く、それ以降に出現する頻度は比較的低い。キナクリンの血中濃度と肝機能障害の関連を検討したところ、肝機能障害でキナクリン治療を中止した5例では中止した2週間以内のキナクリン血中濃度は $1,157 \pm 480$ ng/mLであった。この値は予定通り治療を完了した5例の $486 \pm$

194 ng/mL(治療経過中の最大血中濃度)に比べ有意に高かった($p=0.01$)。一方、肝機能障害はキナクリン投与中止後・終了後あるいは中断後には、全例で改善した。

3. 皮膚の黄染

キナクリンの組織親和性の結果として皮膚の黄染はほぼ必発した。副作用として報告されたものは25例(81%)に及んだ。皮膚の黄染もキナクリン投与中止後あるいは終了後に、全例で改善した。

4. その他の副作用

キナクリンの副作用として知られている痙攣、骨髄抑制、顆粒球減少症は、今回の検討症例には出現しなかった。報告のあった白血球数、顆粒球数、ヘモグロビン濃度、血小板数が今回設定した中止基準(白血球数 $<2,000/\mu\text{L}$ または顆粒球数 $<1,000/\mu\text{L}$ 、血小板数 $<50,000/\mu\text{L}$ 、ヘモグロビン濃度 <8.0 g/dL)に達した症例はなかった。1例は原因不明の発熱があり投与2日目に中止となったが、キナクリン投与との関連は不明であった。1例はキナクリン投与中にヘモグロビン濃度が8.1 g/dLとなりT-bilの上昇、直接Coombs試験が陽性で溶血性貧血が疑われた。キナクリン投与は中止され、貧血は改善した。別の1例はキナクリン投与中に炎症反応の上昇、便検査にて*Clostridium difficile*の抗原が陽性であったため偽膜性大腸炎と診断された。キナクリン投与が中止され、抗生剤による治療が行われて改善した。頸部の水泡性皮疹が出現したため中止した症例は、Acyclovirの投与で改善した。

5. キナクリン投与中の死亡例

症例15は孤発性CJD、57歳の女性。2000年3月に運動失調で発症。進行性の痴呆、ミオクローヌス、脳波PSDが出現した。7月に経管栄養開始。12月ほぼ無動性無言状態となった。2000年12月、誤嚥性肺炎と出血性胃潰瘍。2001年8月、誤嚥性肺炎、10月出血性胃潰瘍、11月頻回に嘔吐が見られた。12月、誤嚥性肺炎と出血性胃潰瘍。2002年2月、4月に出血性胃潰瘍。5月13日よりキナクリン300mg/日が経管投与で開始された。8日目に喀痰の増加、発熱、喘鳴が見られた。9日目に口角より黄色の液体流出があった。10日目の午後6時過ぎに急変し30分後に死亡。死亡の直接原因として誤嚥・窒息が疑われた。

症例 16 は孤発性 CJD, 72 歳の女性。2001 年 12 月 18 日 (発病後 16 ヶ月) よりキナクリン治療が開始された。開始時には無動性無言状態であったが、治療後約 1 ヶ月間は痛覚刺激にて逃避反応が見られた。投与 5 ヶ月後の 2002 年 5 月 16 日午前 10 時にモニター上の心拍数が 25/分でチアノーゼ、呼吸停止が見られたため心肺蘇生が行われたが、11 時 20 分に死亡した。死亡日の午前 7 時 30 分は血圧 146/70 でチアノーゼなく体温も正常であった。5 月 13 日の血液検査では白血球 9,480/ μ L, Hb 12.5, AST 78, ALT 80, BUN 7.7, Cr 0.33, Na 132, K 4.7 であった。死亡の直接原因は明らかでなく剖検されなかったが、担当医の死亡原因に関する見解は、(1)キナクリンによる臓器障害、(2)CJD としての自然経過、あるいは (3)痰による窒息の可能性であった。

III. キニーネ治療—効果

孤発性 CJD 6 例の中、2 例に投与後の変化を認めた (表 6)。症例 1 は投与開始前に無動性無言であったが投与 4 週間後から 3 週間、発語 (意味は不明)、表情表出が見られた。症例 6 は投与前には触覚刺激のみで驚愕反射が認められたが聴覚には反応を示さなかった。投与後約 2 週間後から 4 週間、聴覚、視覚刺激に鋭敏に反応が認められたがその後消失した。

IV. キニーネ治療—副作用

治療中止の原因と転帰

予定されていた 12 週間の治療プロトコールを完了したのは 6 例の中で 3 例 (50%) であった (表 7)。中止された 3 例のうち 2 例は肝機能障害が原因であり、そのうち 1 例に血小板減少症を合併した。残る 1 例は全身性の中毒疹のため中止となった。これらはキニーネ中止後に改善した。

D. 考察

今回、同一プロトコールのもとに抗マラリア薬 (キナクリン—31 例、キニーネ—6 例) による治療の臨床情報を分析したところ、キナクリン投与は孤発性 CJD 症例、医原性 CJD 症例、GSS 症例などにキニーネは孤発性 CJD 症例で短期間ではあるが効果を示す例があることが確認された。効果がみられた症例は、孤発性 CJD 症例においては治療開始時の認知機能レベルが比

較的に保たれている症例に多かった。孤発性 CJD 症例におけるキナクリン治療の有効率は 40%であったが、このうち外界刺激に反応が認められる状態からの治療開始では有効率は 75%、無動性無言状態になってからでは有効率は 8%であった。明らかに有効率は治療開始時の認知機能レベルに相関していた。今回の分析結果から、治療開始時の認知機能レベルは唯一の治療効果予測の因子であると言える。一方、医原性 CJD では 5 例中 2 例 (40%) に効果が見られたが、孤発性とは異なり認知機能低下が進んだ症例で効果が見られた。また、遺伝性プリオン病の 4 例では、GSS の 1 例で効果が見られたが遺伝性 CJD では認知機能の良かった 1 例においても明らかな効果を認めなかった。

キナクリン治療の副作用に関しては、肝機能障害が最も頻発した。肝機能障害の見られた症例はキナクリン投与開始後 2 週～6 週目に肝機能検査に異常を示す例が多く、特にこの期間中の注意深いモニターが必要である。キナクリンの血中濃度は重度の肝機能障害出現例で有意に高く、今回の検討より血中濃度が 700～800 ng/mL 以上になると肝機能障害が出現しやすいと言える。今後、キナクリンを用いた治療を行う際には血中濃度のモニターが望まれる。肝機能障害は致死的ではなく、CJD 患者におけるキナクリン治療で細胞融解性肝障害を認めた海外の報告 (4)でも、今回の調査でも肝機能障害は可逆性の変化と考えられる。その他の副作用も、肝機能障害と同様に可逆性の変化と考えられる。今回の検討では、キナクリン血中濃度の分析が一部の症例に限られていたことに加えて、髄液中濃度や組織蓄積に関する分析が行えなかった。副作用出現を抑えより一層安全で有効なキナクリン治療法を確立するためには、これらを検討する必要もある。

キナクリン投与中に死亡した症例の中で、キナクリン投与以前から出血性胃潰瘍と誤嚥性肺炎を繰り返していた 1 例は、キナクリンが直接の死亡原因となった可能性は考え難いが、進行例で全身状態が不安定な患者へのキナクリン投与は慎むべきである。もう 1 例は、今回の調査症例の中でキナクリン投与総量が 2 番目に多い症例であり、キナクリンが突然死に関与した可能性を 100%否定することは出来ない。効果消退後も投与を継続することの危険性を十分に認識する必要があり、キナクリンは組織蓄積性が強いいため投与総量にも十分配慮する必要

がある。また、患者・家族にもキナクリン治療の安全性について死亡を含めた重篤な副作用の出現する可能性を十分に説明し、投与中止や中断への理解を十分に得ておく必要がある。

キニーネ投与中に認められた副作用は肝機能障害が2例に見られ、そのうち1例は血小板減少を併発し、血小板輸血およびステロイド治療の後軽快した。他の1例は中毒疹であり、キニーネ中止後速やかに改善した。

今回認められた抗マラリア薬キナクリン、キニーネの治療効果発現の機序は明らかではない。プリオン持続感染細胞を用いた研究では300~400nMのキナクリンが異常型プリオン蛋白の産生を50%阻害することが報告されている(1, 2)。一方、疾患モデル動物での研究では、キナクリンに有意な生命予後改善効果は観察されなかったとの報告がある(5, 6)。また、キナクリン自身に中枢神経の刺激作用があることが知られている。今回観察されたプリオン病患者での効果が、抗プリオン作用よりもむしろ中枢神経刺激作用が前景に立っていた可能性が十分に考えられる。なお、効果は治療早期に見られ、一定の期間持続(1ヶ月以内がほとんど)した後には治療継続にもかかわらず効果は消退した。この治療効果消退の原因として、キナクリンの組織蓄積性の関与が一つの可能性として考えられる。キナクリンは組織蓄積性が強く、組織/血漿比はきわめて高く(7)、血液脳関門を通過し易く、脳にも蓄積することが知られている(8)。低濃度におけるキナクリンの治療効果が、組織に蓄積していくキナクリンにより阻害される可能性が考えられる。この可能性を検証するためには、低濃度間欠投与などの投与方法を検討する必要がある。また、頻発する肝機能障害の出現を抑え効果を持続させるためには、低容量の投与に加えて、肝臓へのキナクリン取り込みを抑制するような薬物の併用やキナクリンの脳への取り込みを制御するような薬物の併用を行うなどの工夫も検討する必要がある。

[参考文献]

- 1) Doh-Ura K, Iwaki T, Caughey B. Lysosomotropic agents and cysteine protease inhibitors inhibit scrapie-associated prion protein accumulation. *J Virol* 74:4894-4897, 2000
- 2) Murakami-Kubo I, Doh-ura K, Ishikawa K, Kawatake S, Sasaki K, Kira J, Ohta S, Iwaki

T. Quinoline derivatives are therapeutic candidates for transmissible spongiform encephalopathies. *J Virol* 78:1281-1288, 2004

3) Josefson D. Drugs for malaria and psychosis may offer hope to people with CJD. *BMJ* 323(7310):416, 2001

4) Scoazec JY, Krolak-Salmon P, Casez O, Besson G, Thobois S, Kopp N, Perret-Liaudet A, Streichenberger N. Quinacrine-induced cytolytic hepatitis in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* 53(4):546-547, 2003

5) Barret A, Tagliavini F, Forloni G, Bate C, Salmona M, Colombo L, De Luigi A, Limido L, Suardi S, Rossi G, Auvre F, Adjou KT, Sales N, Williams A, Lasmezas C, Deslys JP. Evaluation of quinacrine treatment for prion diseases. *J Virol* 77(15):8462-8469, 2003

6) Collins SJ, Lewis V, Brazier M, Hill AF, Fletcher A, Masters CL. Quinacrine does not prolong survival in a murine Creutzfeldt-Jakob disease model. *Ann Neurol* 52:503-506, 2002

7) Shannon JA, Earle DP, Brodie BB, et al. The pharmacological basis for the rational use of atabrine in the treatment of malaria. *J Pharmacol Exp Ther* 81:307-330, 1944

8) Rolls IM. Drugs used in the chemotherapy of helminthiasis. In: Goodman LS, Gillman A, eds. *Pharmacological basis of therapeutics*. 5th ed. New York: Macmillan. pp1080-1094, 1975

E. 結論

クロイツフェルト・ヤコブ病に対する抗マラリア薬キナクリンとキニーネの効果および副作用の検討を行った。いずれも、約3割の患者で約3週間持続する一過性の効果が見られた。しかし、約5割の患者で肝機能障害などの副作用が出現し投与を中止した。効果を持続させ、副作用の出現を抑えるため両治療薬とも投与量や投与方法をさらに検討する必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表