

赤ワイン関連ポリフェノール類は、AD における $\text{fA}\beta$ 沈着阻害、分解薬の開発に向け、有力な基本分子となる可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ono K, Yoshiike Y, Takashima A, Hasegawa K, Naiki H, Yamada M. Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols *in vitro*: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 87: 172-181, 2003
- 2) Yamada M. Senile dementia of the neurofibrillary tangle type (tangle-only dementia): neuropathological criteria and clinical guidelines for diagnosis. *Neuropathology* 23:311-317, 2003
- 3) Ono K, Hasegawa K, Naiki H, Yamada M. Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's beta-amyloid fibrils *in vitro*. *J Neurosci Res*, in press
- 4) 山田正仁：脳の老化と神経変性疾患—アルツハイマー型痴呆を中心に—。老年精神医学 14:999-1007, 2003
- 5) 山田正仁：アルツハイマー病の臨床診断の問題点と治療法の開発。Geriatr Med 41:1684-1692,

2003

- 6) 小野 賢二郎、山田正仁：エンドセリン変換酵素 (ECE)。日本臨床 62 (増刊号) [痴呆症学 (1)]:46-48, 2003
- 7) 小野 賢二郎、山田正仁：アルツハイマー病 β アミロイドに対する赤ワイン関連ポリフェノールの効果。Medical Technology 32:121-122, 2004

2. 学会発表

- 1) Ono K, Hasegawa K, Naiki H, Yamada M. Nicotine breaks down preformed Alzheimer's β -amyloid fibrils *in vitro*. Challenging Views of Alzheimer's Disease-Round 2. Cincinnati, July 24-27, 2003
- 2) 小野賢二郎、長谷川一浩、内木宏延、山田正仁：ニコチンによるアルツハイマー病 β アミロイド線維の分解作用。第 44 回日本神経学会総会、横浜、5 月 15-17 日、2003 年

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
出願中
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)
 アミロイドーシスに関する調査研究 分担研究報告書

Beta-site APP-cleaving enzyme 1 (BACE 1)抗体の作成と ヒト脳における BACE 1 の解析

分担研究者 玉岡 晃 筑波大学臨床医学系神経内科

共同研究者 原田祐嗣¹, 石井一弘¹, 宮 冬樹¹, 庄司進一¹, 亀高 諭², 亀谷富由樹³

¹筑波大学神経内科, ²大阪大学機能形態学講座,

³東京都精神医学総合研究所分子神経生物学研究部門

研究要旨 抗ヒト BACE 1 抗体を作成し, その反応性, 特異性を調べるとともに免疫二重染色法で脳内細胞における BACE 1 の発現の局在を調べた. また, ヒト正常およびアルツハイマー病(AD)の海馬を含む側頭葉における BACE 1 および MAP2 の蛋白量を測定し, 解析した. N 端側の抗体および C 端側の抗体ともに約 70kDa のバンドを認め, 成熟型 BACE 1 を確認した. 免疫二重染色では, 側頭葉皮質での抗 BACE 1 -C 抗体と抗 MAP2 抗体の染色性はよく一致したが, 抗 GFAP 抗体との染色では astrocyte における BACE 1 の発現は明らかではなかった. BACE 1 の蛋白量は N 抗体による測定では正常と比較して AD において 0.84 倍($p<0.01$), C 抗体による測定では 0.76 倍($p<0.01$)といずれにても AD 群で低値であった. MAP2 の蛋白量は AD 群で正常群の 0.29 倍($p<0.001$)と著しい低下をきたしており, 神経脱落を反映しているものと考えられた. 神経細胞あたりの BACE 1 量を示すといえる BACE 1 と MAP2 の比率 (BACE 1 /MAP2)は N 抗体による測定で AD 群は正常の 1.68 倍, C 抗体による測定で 1.38 倍と有意に増加しており, AD の海馬を含む側頭葉では神経細胞あたりの BACE 1 発現量が増加していることが示唆された.

A. 研究目的

アルツハイマー病(AD)の重要な関連蛋白である β アミロイド蛋白($A\beta$)は $A\beta$ 前駆体蛋白質 (APP)が N 末の β -secretase, C 末の γ -secretase で切断されることによって生成される. Beta-site APP-cleaving enzyme 1(BACE 1)は主要な β -secretase であり, その阻害薬は $A\beta$ 産生を抑制し, AD の治療薬となる可能性がある. 我々は抗ヒト BACE 1 抗体を作成し, その反応性, 特異性を調べるとともに対照脳および AD 脳において BACE 1 を解析し, 脳内細胞における発現の局在を調べ, 正常および AD 脳での BACE 1 量を比較した.

B. 研究方法

正常脳8例, AD脳21例を対象とした. 全てのAD例は病理学的に診断を確定し, 各群間で年齢, 性別, 死後剖検までの時間に有意差はなかった.

BACE 1 のN末端側(46-56, ETDEEPEEPGR)およびC末端側(485-501, LRQQHDDFADDISLLK)からなる合成ペプチドを各々ウサギに免疫し, ポリクローナル抗体を作成, それぞれ抗BACE 1 -N抗体 (N抗体), 抗BACE 1 -C抗体 (C抗体)とした.

BACE 1 の全長DNAをヒト脳ライブラリーからクローニングし, pcDNA3 に挿入して pcDNA3-hBACE 1 を作成した. このコンストラクトをHeLa細胞に一過性に強制発現させた膜可溶性画分をポジティブコントロールとした.

凍結された脳の海馬を含む側頭葉を50 μ mに冠状断し, 3倍量のバッファーにてホモジェナイズした後, 遠心10万g x 20分にて上清を分離した. バッファーとしては, 蛋白分解酵素阻害剤を加えた TSE, 1%Triton-X100/TSE, 0.5%SDS/TSEを用いて連続抽出した.

ウェスタンブロット(WB)は以下のように行った. 各画分と沈渣をloading bufferとともに10分間

熱処理し、10-20%Tris-glycine SDS -polyacrylamide gelにて電気泳動した。transfer membraneに転写後、N抗体は2000倍希釈、C抗体は5000倍希釈にて4°C、overnightでインキュベーションした。Membraneを洗浄後、HRP標識抗ウサギIgG抗体にて3時間インキュベーションし、検出試薬を用いて発色した。

BACE 1 の糖鎖修飾を解析するために、ポジティブコントロールをN-Glycosidase F Deglycosylation Kit(Roche社)にて37°Cにて14時間反応後、同様にWBを行った。

正常およびAD脳でのBACE 1 量およびMAP2量の測定は、脳サンプルを0.5%SDS/TSEで抽出し、BCA法にて蛋白定量後、各サンプルの蛋白濃度を統一し、WBを行った。一次抗体としてはN抗体やC抗体の他に、抗MAP2抗体(SIGMA社)を用い、結果はdensitometerにて測定比較した。

正常およびAD 脳側頭葉の6 μ m厚パラフィン切片を用い、一次抗体にC抗体(x500)使用、二次抗体は抗ウサギ IgG(H+L) Fluor488(Alexa 社)で染色した。その後、一次抗体として抗MAP2抗体および抗GFAP抗体(Progen 社)を使用し、二次抗体に抗マウス IgG(H+L)Fluor633(Alexa 社)を用いて免疫二重染色を行なった。

C. 研究結果

正常脳およびAD脳において連続抽出した各画分と沈渣をN抗体、C抗体および供与された抗BACE 1 ウサギポリクローナル抗体にてWBを行ったところ、沈渣を除くいずれの抽出画分においても約70kDaのバンドが認められた。そのため、0.5%SDS/TSEにて直接抽出したサンプルを用いてWBを行ったところ、いずれの抗体でも約70kDaのバンドが認められた。N抗体およびC抗体がともに70kDaのバンドを認識し、分子量も一致することから、これが従来報告におけるアミノ酸基46-501の成熟型BACE 1の全長を示すものと考えられた。

また正常脳、AD脳のWBにてN抗体、C抗体ともに約50kDaのバンドも認められた。そのためポジティブコントロールをN-Glycosidase Fにて脱糖鎖処理し、N抗体およびC抗体にてWBを行ったところ、ともに約70kDaのバンド消失と約50kDaのバンド出現をみとめた。成熟型BACE

1が脱糖鎖型BACE 1に変換されることを確認するとともに生体内にも脱糖鎖型BACE1の存在していることが示唆された。

免疫二重染色では、側頭葉皮質と海馬でのC抗体と抗MAP2抗体の染色性はよく一致した。C抗体と抗GFAP抗体との二重染色ではastrocyteにおけるGFAPとBACE 1のcolocalizationは明らかではなかった。

免疫二重染色でBACE 1が主に神経由来であることが示唆されたため、BACE 1とともにMAP2のWBを行った。BACE 1量は正常と比較してN抗体による測定で0.84倍($p<0.01$)、C抗体による測定では0.76倍($p<0.01$)といずれもAD群で低値であった。MAP2はAD群で正常群の0.29倍($p<0.001$)と著しい低下をきたしており、神経脱落を反映していると考えられた。神経細胞あたりのBACE 1量を示すと考えられるBACE 1とMAP2の比率(BACE 1/MAP2)はN抗体による測定でAD群は正常の1.68倍、C抗体による測定で1.38倍と有意に増加していた。

D. 考察

BACE 1は501個のアミノ酸からなる一回膜貫通蛋白質として合成され、最終的にアミノ酸基46-501の成熟型BACE 1になり、分子量は70kDaとされている。BACE 1の46-501からなるアミノ酸基から予想される分子量は50kDであり、ポジティブコントロールの脱糖鎖試験で出現したバンドの分子量がこれに相当すると考えられた。免疫二重染色における検討では、BACE 1の発現は主に神経細胞で認められ、astrocyteでの発現は明らかでなく、過去の報告と一致していた。

WBにてBACE 1の発現量を検討した結果、海馬を含む側頭葉においてADではBACE 1発現の総量は減少していたが、神経細胞あたりのBACE 1発現量は増加していることが見いだされた。これはADにおける神経細胞あたりのA β 産生増加を示唆する所見である。

FukumotoらはADの新皮質においてBACE 1の総量及び活性が増加していたことを報告している(Arch Neurol 59: 1381-9, 2002)。YangらもADの側頭葉皮質において同様の結果を確認している(Nat Med 9:3-5, 2003)。本研究でもADにお

いて神経細胞あたりの BACE 1 発現量は増加していたが、BACE 1 の総量は減少していた。これは神経脱落の著しい海馬周辺を試料としたため、BACE 1 発現の総量としては見かけ上低下していたものと考えられた。

APP の C 末側切断酵素である γ -secretase は Notch 1 などの生体内の重要な蛋白質の切断にも関与している。Notch 1 は免疫細胞の分化にも関与し、その切断を阻害すると免疫異常が生じることが知られている。一方、BACE 1 のノックアウトマウスでは A β 産生が認められなくなるが、形態・組織的異常、血液や生化学的検査における異常は確認されていない。従って、BACE 1 を阻害することは γ -secretase を標的にするよりも副作用が少ないと考えられている。そのため BACE 1 阻害薬は A β 産生を抑制し、AD の新しい治療薬となる可能性があるといえる。

E. 結論

AD の海馬を含む側頭葉において神経細胞あたりの BACE 1 発現量の増加していることが示された。AD の病態において BACE 1 が重要な意

義を有しており、また BACE 1 の阻害薬が AD の新しい治療薬となる可能性があることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Beta-site APP-cleaving enzyme 1 (BACE-1)抗体の作成とヒト脳における BACE-1 の解析。神経内科学会総会、横浜、5月16日、2003年。

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)
 アミロイドーシスに関する調査研究 分担研究報告書

実験的頭部外傷ラット脳の慢性期におけるアミロイドβ蛋白の定量
 - 対照群との比較検討を含めて -

分担研究者 玉岡 晃 筑波大学臨床医学系神経内科

共同研究者 松野佐好子*、石井一弘*、庄司進一*、星野 茂**

筑波大学臨床医学系神経内科*、日本医科大学脳神経外科**

研究要旨 頭部外傷はアルツハイマー病 (AD) の危険因子の一つであり、AD 患者は一瞬意識を失う程度の頭部外傷の既往が多いと言われている。また、ボクサー脳症の剖検脳では老人斑や神経原線維変化、アミロイドアンギオパチーなどの AD 病変が確認されている。本研究では fluid percussion 法による実験的頭部外傷を与えたラット脳におけるアミロイドβ蛋白 (Aβ) を定量し、対照群と比較検討することにより、頭部外傷が慢性期において脳内 Aβ を有意に増加させることを明らかにした。頭部外傷は脳内 Aβ を増加させるとことにより、AD を促進させる可能性が示唆された。

A. 研究目的

頭部外傷は AD の危険因子の一つとして知られており、ボクサー脳症と AD との関係に注目が集められているが、これらの病態機序についての詳細は明らかではない。本研究では、ラットの fluid percussion injury model における脳内 Aβ 分子種を分別定量し、対照群と比較検討することによって、頭部外傷の脳内 Aβ に対する影響を生化学的に解析した。

B. 研究方法

3 か月齢の Sprague-Dawley 系雄性ラットに対し、4% 抱水クロラール 0.9 ml/kg の腹腔内投与による麻酔下に右側頭部に fluid percussion injury による打撃を加え (Hoshino S et al: NeuroReport 9: 1879-1883, 1998)、外傷前、2、4、6 ヶ月後に断頭して大脳を摘出した。また、対照ラットとしては、側頭骨より開頭し、その後再び閉じたシャム群を用意した。凍結保存した摘出脳を RIPA バッファーと 5 M 塩酸グアニジンを順次用いて抽出し、それぞれ可溶性画分、不溶性画分とし、それらに含まれる Aβ 分子種をサンドイッチ ELISA 法にて分別定量し、シャム群と比較検討した。

C. 研究結果

脳の可溶性画分では外傷 4 ヶ月後で Aβ 40、Aβ 42 ともに対照群に比して有意に増加しており、不溶性画分では外傷 4 ヶ月後、6 ヶ月後で Aβ 40、Aβ 42 ともに対照群に比して有意に増加していた。

D. 考察

Corsellis JA ら (Psychol Med 3: 270-303, 1973) の報告以来、頭部外傷と AD との関係に注目が集められてきたが、Tokuda ら (Acta Neuropathol 82: 280-285, 1991) によるボクサー脳症の詳細な免疫組織化学的検討によって、頭部外傷によって老人斑、神経原線維変化、アミロイドアンギオパチーなどの AD 病変が促進されることが明らかにされた。また実験的には、ラット脳に fluid percussion 法により外傷を与えたラット脳において、Aβ やその前駆体 (APP)、リン酸化タウの蓄積がみられることが免疫組織化学的に明らかにされてきた。本研究では頭部外傷後慢性期における脳内 Aβ を生化学的に解析したが、脳の可溶性画分では外傷 4 ヶ月後において、不溶性画分では外傷 4 ヶ月後、6 ヶ月後において Aβ 40、Aβ 42 の両者が対照群に比して有意に増加していた。この結果は頭部外傷が脳内 Aβ の増加を促進すること、頭部外傷後痴呆脳においてもまず可溶性画分に Aβ が増加し、

それが不溶化して老人斑やアミロイドアンギオパチーを形成していくことを示唆するものと考えられた。

E. 結論

頭部外傷は慢性期に脳内 A β を増加させることによって AD 発症の促進因子となる可能性が示唆された。また、頭部外傷後痴呆脳においても、まず可溶性画分から A β が増加し、それが不溶化して老人斑やアミロイドアンギオパチーを形成していく可能性が予想された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ishii K, Tamaoka A, Shoji S: MRI of idiopathic lumbosacral plexopathy. Neurology (on line) in press
- 2) Kalara RN, Thomas A, Oakley A, Ince P, Tamaoka A, Mori H, Kenny RA and Ballard C: Cerebrovascular amyloidosis and dementia. Curr Med Chem - Immun Endoc & Metab Agents, 2003, 3, 317-27.
- 3) Ishii K, Tamaoka A, Matsuno S, Shoji: Isolated peroneal nerve palsy complicating weight loss due to anterior pituitary hypofunction. Eur J Neurol. 2003 Mar;10(2):187-8.
- 4) Ishii K, Tokuda T, Matsushima T, Miya F, Shoji S, Ikeda S, Tamaoka A: Pravastatin at 10 mg/day does not decrease plasma levels of either amyloid-beta (Abeta) 40 or Abeta 42 in humans. Neurosci Lett 350(3):161-4, 2003.
- 5) Akira Tamaoka: Paramyotonia congenital and skeletal sodium channelopathy. Intern Med 42(9): 769-70, 2003.
- 6) Saido TC, Takeda M, Urakami K, Shoji M, Ito N, Iwatsubo T, Tamaoka A, and Kanemaru K: Discussions on role of neprilysin and degrading system. Psychogeriatrics 2004;4:13-8.
- 7) Matsuda K, Takeda M, Urakami K, Hasegawa M, Ishiguro K, Saido TC, Shoji M, Kanemaru K, Tamaoka A, Iwatsubo T, Okamura N and Ito N:

Discussions on laminin as possible biomarkers for neurodegenerative dementia. Psychogeriatrics 2004;4:39-44.

- 8) Urakami K, Ishiguro K, Saido TC, Iwatsubo T, Okamura N, Ito N, Kanemaru K, Tamaoka A, Hasegawa M, Shoji M, Takashima A, Hamamoto M, Matsuda K, Arai H, and Takeda M: Discussions on phosphorylated tau and other biochemical markers. Psychogeriatrics 2004;4:45-50.
 - 9) 玉岡 晃: アルツハイマー病治療薬. 薬事日報、9820:20、2003.
 - 10) 石井一弘、玉岡 晃、庄司進一: Down 症候群. 日本臨床(別冊)領域別症候群シリーズ39、427-30、2003.
 - 11) 玉岡 晃: 知の螺旋. 茨城県医師会報 589:47-48、2003.
 - 12) 玉岡 晃: 痴呆症状. CLINICAL NEUROSCIENCE 21(4):382-7、2003.
 - 13) 玉岡 晃: 脳脊髄への転移. Modern Physician 23(3):353-355, 2003
 - 14) 玉岡 晃: Insulin-degrading enzyme (IDE). 日本臨床 61(増刊号9):54-61、2003.
- ### 2. 学会発表
- 1) 玉岡 晃、松野佐好子、石井一弘、庄司進一、山本和央、永田博司: ラット慢性脳虚血モデルにおける脳内アミロイド β 蛋白の解析. 第38回日本成人病(生活習慣病)学会、1月10日(東京)、2004.
 - 2) 玉岡 晃: アルツハイマー病- 最近の治療薬と臨床現場が求める新薬像-. 情報機構セミナー、12月15日、2003.
 - 3) Tamaoka A, Matsuno S, Ishii K, Shoji S, Yamamoto N, Nagata H: Amyloid β protein species in rat brains with bilateral occlusion of common carotid arteries - in comparison with sham rats -. The 7th Asia/Oceania Regional Congress of Gerontology, November 27 (Tokyo), 2003. (Geriatrics Gerontology International 3(supplement 1): S69, 2003)
 - 4) Tamaoka A, Matsuno S, Ishii K, Shoji S,

Yamamoto N, Nagata H: Amyloid β protein species in rat brains with bilateral occlusion of common carotid arteries - in comparison with sham rats -. Society of Neuroscience 33rd Annual Meeting(New Orleans), November 11, 2003.

5) 松野佐好子、玉岡 晃、石井一弘、庄司進一、星野 茂: 実験的頭部外傷ラット脳の慢性期におけるアミロイド β 蛋白の定量- 対照群との比較検討を含めて- . 第22回日本痴呆学会、10月3日(東京)、2003.

6) 原田祐嗣、石井一弘、宮 冬樹、亀高 諭、亀谷富由樹、庄司進一、玉岡 晃: Beta-site APP-cleaving enzyme 1 (BACE1) 抗体の作成とヒト脳における BACE1 の解析. 第22回日本痴呆学会、10月3日(東京)、2003.

7) 玉岡 晃、石井一弘、宮 冬樹、松野佐好子、原田祐嗣、望月昭英、庄司進一、原田勝二: アルツハイマー病におけるミトコンドリア型アルデヒド脱水素酵素の多型と過酸化脂質. 第22回日本痴呆学会、10月3日(東京)、2003.

8) 玉岡 晃: 痴呆④薬物療法は今. 第1070回医食同源、7月27日(東京)、2003.

9) 玉岡 晃: 高齢者の神経疾患(アルツハイマー病を中心に). 水郷医師会学術講演会、7月15日(行方郡麻生町)、2003.

10) 玉岡 晃: アミロイド β 蛋白から見たアルツハイマー病の分子病態研究. 第21回昭和大学神経研究会、7月5日(東京)、2003.

11) 原田祐嗣、石井一弘、宮 冬樹、亀高 諭、亀谷富由樹、庄司進一、玉岡 晃: Beta-site APP-cleaving enzyme 1 (BACE1) 抗体の作成とヒ

ト脳における BACE1 の解析. 第44回日本神経学会総会、5月16日(横浜)、2003.

12) 石井一弘、玉岡 晃、徳田隆彦、松島照彦、原田祐嗣、宮 冬樹、池田修一、庄司進一: 血漿 A β 蛋白分子種に及ぼす Pravastatin の効果. 第44回日本神経学会総会、5月15日(横浜)、2003.

13) 玉岡 晃、石井一弘、宮 冬樹、松野佐好子、原田祐嗣、望月昭英、庄司進一、原田勝二: アルツハイマー病脳における過酸化脂質とミトコンドリア型アルデヒド脱水素酵素の多型. 第44回日本神経学会総会、5月16日(横浜)、2003.

14) 金丸和富、山之内博、玉岡 晃、松野佐好子、村山繁雄: A β 42 と tau の CSF gradient. 第44回日本神経学会総会、5月16日(横浜)、2002.

15) 松野佐好子、玉岡 晃、石井一弘、庄司進一、星野 茂: 実験的頭部外傷ラット脳の慢性期におけるアミロイド β 蛋白の定量と対照群との比較. 第44回日本神経学会総会、5月15日(横浜)、2003.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)
アミロイドーシスに関する調査研究 分担研究報告書

ヒト血液中に抗脳アミロイド抗体が存在する

分担研究者 東海林幹夫 岡山大学大学院医歯学総合研究科神経病態内科学
共同研究者 松原悦朗*、瓦林毅*、徐武華*、永野功*、阿部康二*、針谷康夫**、
池田将樹***

*岡山大学大学院医歯学総合研究科神経病態内科学、**前橋日赤病院神経内科、
***群馬大学医学系研究科神経内科

研究要旨 Tissue amyloid plaque immunoreactivity (TAPIR)を用いてのヒト血液中の抗 Aβ 抗体の検討を行った。AD 群では TAPIR の陰性 42 例(37.2%)、20 例(17.8%)が±、44 例(38.9%)が陽性+、7 例 (6.2%) が強陽性++であった。正常者では陰性 54 例(34.8%)、37 例(23.9%)が±、44 例(28.4%)が陽性+、20 例 (12.9%) が強陽性++であった。強陽性群と陽性群を抗 Aβ 抗体出現群とすると AD 群では 45.1%、対照群では 41.2%で、抗 Aβ 抗体は疾患の有無にかかわらず、ヒトでは高頻度に出現していた。出現率は加齢によって変化するが、疾患発症・抑制における役割は今後の検討課題と考えられた。

A. 研究目的

脳アミロイドの根本的治療法として Aβ ワクチンや抗 Aβ 抗体受動免疫療法が注目されている。動物モデルでは Aβ amyloidosis と記憶障害の著明な改善がみられたが、ヒトでは Phase II study で髄膜脳炎が出現し、治験自体が中止となった。また、症状改善の evidence は得られていない。この間、ヒト血中抗 Aβ 抗体の出現が明らかとなったが、その役割と意義については不明である。従って、どの様な人に、どの様な抗 Aβ 抗体が存在し、どの様な役割をしているのか？血液抗 Aβ 抗体はどの様な方法で確認できるかは早急に明らかにすべき課題と考えられる。今回、我々は Tissue amyloid plaque immunoreactivity (TAPIR)を用いてのヒト血液中の抗 Aβ 抗体の検討を行った。

B. 研究方法

113 例の AD と 155 例の正常対照の計 268 例の血漿を用いた。AD 群は男性 32 例、女性 81 例で、平均年齢 75 歳、平均 MMS 検査得点は 15 点、平均罹病期間は 44 か月であった。年齢補正された正常対照群は男性 59 例、女性 96 例で、平均年齢 76 歳、平均 MMS 検査得点は 30 点であった。書面によるインフォームドコンセントのもとに採

血を行った。脳アミロイドを再現する 16 か月から 18 か月齢の Aβ transgenic mouse (Tg2576)の脳パラフィン切片を採取血漿を用いて、ABC 法で免疫染色した。

TAPIR の判定は、対照として抗 Aβ 抗体 Ab9204 を用いて染色した Tg2576 脳のアミロイド斑と同程度染色するもの強陽性++、5 個以上の明瞭なアミロイド斑を染色するもの陽性+、僅かのアミロイド斑を弱く染色するもの弱陽性±、染色しないものを陰性-とした。

TAPIR 陽性血漿が実際にどの様な Aβ 種を認識しているかを決定するため、Alzheimer 病患者脳の蟻酸抽出分画 (脳アミロイド分画: FAB)、合成 Aβ40 と Aβ42 を用いてヒト血漿で免疫沈降し、ウエスタンブロットを行い、抗 Aβ 抗体ヒト血中抗 Aβ 抗体が認識する Aβ 分子種を同定した。

C. 研究結果

AD 群では TAPIR の陰性 42 例(37.2%)、20 例 (17.8%)が±、44 例(38.9%)が陽性+、7 例 (6.2%) が強陽性++であった。正常者では陰性 54 例 (34.8%)、37 例(23.9%)が±、44 例(28.4%)が陽性+、20 例 (12.9%) が強陽性++であった。強陽性群と陽性群を抗 Aβ 抗体出現群とすると AD 群では

45.1%, 対照群では41.2%で, 抗A β 抗体は疾患の有無にかかわらず, ヒトでは高頻度に出現するものと考えられた。

強陽性群と陽性群, 弱陽性群と陰性群を組み合わせた場合と各群に分けてMann-WhitneyのU検定を起行したが, AD群と正常対照群間に抗A β 抗体の出現率に有意差はなかった。抗体出現率は加齢に伴って増加した。

抗A β 抗体による臨床的重症度の軽減や進行抑制における作用を検討したが, 各群において平均MMS検査値, 罹病期間に有意な差は認められなかった。

TAPIRで同定したヒト血漿中の抗マウス脳アミロイド斑抗体が, 実際にA β を認識するかどうか免疫沈降法で検討すると, いずれの群の強陽性および陽性ヒト血漿はAlzheimer病患者脳の前駆抽出分画のFAB分画と合成A β 40のmonomerとdimerを沈降させたが, A β 42の沈降は弱く, monomerのみを認識した。を免疫沈降した。

次に, これらの各群における血漿A β 40, A β 42を特異的ELISAで測定した。血漿A β 40は40歳台から上昇し, 加齢と共に増加した。血漿A β 42は30歳台から減少し, 加齢とともに漸減した。A β ratio (A β 40/A β 42)は40歳代から, 増加を示した。AD群と対照群で比較すると, A β 40は増加, A β 42は低下, A β ratioは増加と有意な変化がみられた。正常対照の平均+2SD (15.9)をカットオフ値とすると, 感度24%, 特異性96%であった。これらの変化はADの発症早期から変化していた。診断感度はCSFに較べて低い, ADにおいても血液A β の測定が意義あるものと考えられる。抗A β 抗体の有無によって, 血漿A β 40, A β 42およびA β ratioの有意な変化はAD群, 正常対照群のどちらにもみられなかった。

D. 考察

TAPIRは抗A β 抗体を迅速・簡便に同定する有用な方法である。ヒトではAD患者脳A β アミロイド, A β 40, A β 42 monomer, dimerを認識する抗A β 抗体を有する者が一定の比率で存在していることが明らかとなった。しかし, これらの抗A β 抗体の出現には疾患特異性はなく, また, 臨床症状や血液A β との相関も現在のところみ

られていない。

血漿A β 40, A β 42およびA β ratioは加齢に伴って変動しており, ADにおいてその変化が著しく, 有意であることが明らかとなった。従来のCSFで明らかとなった変化と同様の変化を来しており, CSFより感度は低いものの, 診断マーカーとしての意義を有するものと考えられた。血液脳アミロイド自己抗体のAD発症・抑制における役割は今後の検討が必要とかがえられた。

E. 結論

ヒト血漿中に抗A β 抗体が高頻度で存在する。加齢によって変化するが, 疾患発症・抑制における役割は今後の検討課題と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Moreira MC, Klur S, Watanabe M, Nemeth AH, Ber IL, Moniz JC, Tranchant C, Aubourg P, Tazir M, Schols L, Pandolfo M, Schulz JB, Pouget J, Calvas P, Shizuka-Ikeda M, **Shoji M**, Tanaka M, Izatt L, Shaw CE, M'Zahem A, Dunne E, Bomont P, Benhassine T, Bouslam N, Stevanin G, Brice A, Guimaraes J, Mendonca P, Barbot C, Coutinho P, Sequeiros J, Durr A, Warter JM, Koenig M. Senataxin, the ortholog of a yeast RNA helicase, is mutant in ataxia-ocular apraxia 2. *Nature Genetics* 2004 Feb 8 [Epub ahead of print]
- 2) Murakami T, **Shoji-M**, Imai Y, Inoue H, Kawarabayashi T, Matsubara E, Harigaya Y, Sasaki A, Takahashi R and Abe K, Pael-R is accumulated in Lewy bodies of Parkinson's disease. *Annals of Neurology* 55: 439-442, 2004
- 3) Kawarabayashi T, **Shoji M**, Younkin L, Wen-Lang L, Dickson DW, Murakami T, Matsubara E, Abe K, Ashe KH and Younkin SG, Dimeric A β Rapidly Accumulates in Lipid Rafts Followed by ApoE and Phosphorylated Tau as Memory is Impaired in the Tg2576 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Neuroscience* (in Press)

- 4) Matsubara E, Sekijima Y, Tokuda T, Urakami K, Amari M, Shizuka-Ikeda M, Tomidokoro Y, Ikeda M, Kawarabayashi T, Harigaya Y, Ikeda S, Murakami T, Abe K, Otomo E, Hirai S, Frangione B, Ghiso J, **Shoji M**, Soluble A β homeostasis in AD and DS: impairment of anti-amyloidogenic protection by lipoproteins, **Neurobiology of Aging** (in press)
- 5) Ikarashi Y, Harigaya Y, Tomidokoro Y, Kanai M, Ikeda M, Matsubara E, Kawarabayashi T, Kuribara H, Younkin SG, **Shoji M**, Decreased level of brain acetylcholine and memory disturbance in APPsw mice, **Neurobiology of Aging** (in press)
- 6) Imai Y, Soda M, Murakami T, **Shoji M**, Abe K, Takahashi R, A product of the human gene adjacent to parkin is a component of Lewy bodies and suppresses Pael receptor-induced cell death, **Journal of Biological Chemistry**, 278: 51901-910, 2003
- 7) Matsubara E, Bryant-Thomas T, Pacheco J, Henry TL, Poeggeler B, Manjon M, Herbert D, Cruz-Sanchez F, Chyan Y-J, **Shoji M**, Abe K, Leone A, Grundke-Ikbal I, Wilson G, Ghiso J, Williams C, Refolo LM, Pappolla MA, Melatonin increases survival and inhibits oxidative and amyloid pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease, **Journal of Neurochemistry** 85, 1101~1108, 2003
- 8) Kamada H, Sato K, Zhang WR, Omori N, Nagano I, **Shoji M**, Abe K, Spatiotemporal changes of apolipoprotein E immunoreactivity and apolipoprotein E mRNA expression after transient middle cerebral artery occlusion in rat brain, **Journal of Neuroscience Research**, 73, 545~556, 2003
- 9) Ilieva H, Nagano I, Murakami T, Shiote M, **Shoji M**, Abe K, Sustained induction of survival p-AKT and p-ERK signals after transient hypoxia in mice spinal cord with G93A mutant human SOD1 protein, **Journal of the Neurological Sciences**, 215, 57~62, 2003
- 10) Wang SJ, Omori N, Li F, Jin G, Hamakawa Y, Sato K, Nagano I, **Shoji M**, Abe K, Functional improvement by electro-acupuncture after transient middle cerebral artery occlusion in rats, **Neurological Research**, 25, 516~521, 2003
- 11) Murakami T, Ilieva H, Shiote M, Nagata T, Nagano I, **Shoji M**, Abe K, Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor is selectively impaired in mice carrying the mutant SOD1 gene, **Brain Research**, 989, 231~237, 2003
- 12) Manabe Y, Wang JM, Shiote M, Murakami T, Nagano I, **Shoji M**, Abe K, Glutamate enhances caspase-3 immunoreactivity in cultured spinal cord neurons of newborn rats, **Neurological Research**, 25, 312~316, 2003
- 13) Omori N, Maruyama K, Jin G, Li F, Wang SJ, Hamakawa Y, Sato K, Nagano I, **Shoji M**, Abe K, Targeting of post-ischemic cerebral endothelium in rat by liposomes bearing polyethylene glycol-coupled transferring, **Neurological Research**, 25, 275~279, 2003
- 14) Jin G, Omori N, Li F, Nagano I, Manabe Y, **Shoji M**, Abe K, Protection against ischemic brain damage by GDNF affecting cell survival and death signals, **Neurological Research**, 25, 249~53, 2003
- 15) Manabe Y, Nagano I, Gazi MS, Murakami T, Shiote M, **Shoji M**, Kitagawa H, Abe K, Glial cell line-derived neurotrophic factor protein prevents motor neuron loss of transgenic model mice for amyotrophic lateral sclerosis, **Neurological Research**, 25, 195~200, 2003
- 16) Iwai M, Sato K, Kamada H, Omori N, Nagano I, **Shoji M**, Abe K, Temporal profile of stem cell division, migration, and differentiation from subventricular zone to olfactory bulb after transient forebrain ischemia in gerbils, **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, 23, 331~341, 2003
- 17) Sato K, Iwai M, Nagano I, **Shoji M**, Abe K, Temporal and spatial changes of highly polysialylated neural cell adhesion molecule immunoreactivity in amygdala kindling development, **Neurological Research**, 25, 79~82, 2003
- 18) Li F, Omori N, Jin G, Wang SJ, Sato K, Nagano I, **Shoji M**, Abe K, Cooperative expression of survival p-ERK and p-Akt signals in rat brain neurons after transient MCAO, **Brain Research**, 962, 21~26, 2003
- 19) Ohta K, Iwai M, Sato K, Omori N, Nagano I, **Shoji M**, Abe K, Dissociative increase of oligodendrocyte progenitor cells between young and

aged rats after transient cerebral ischemia, **Neuroscience Letters**, 335, 159~162, 2003

20) Kamada H, Sato K, Iwai M, Zhang WR, Nagano I, Manabe Y, **Shoji M**, Abe K, Temporal and spatial changes of free cholesterol and neutral lipids in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion, **Neuroscience Research**, 45, 91~100, 2003

2. 学会発表

1) Matsubara E, **Shoji M**, Murakami T, Kawarabayashi T, Abe K, Brain to CSF clearance of lipoprotein-free A β amyloidogenic A β was impaired in Alzheimer's disease, Society for Neuroscience 33rd Annual Meeting, New Orleans USA, 2003

2) Kawarabayashi T, Samura E, **Shoji M**, Sasaki A, Matsubara E, Murakami T, Ikeda M, Harigaya Y, Abe K, Enhanced tau pathology in TG2576 and Presenilin-1 L286V double transgenic Alzheimer model mice, Society for Neuroscience 33rd Annual

Meeting, New Orleans USA, 2003

3) Nishimura M, Nakaya Y, Yamane T, Wang H, Matsubara E, **Shoji M**, Mutagenesis study for presenilin endoproteolysis and γ -secretase activity, Society for Neuroscience 33rd Annual Meeting, New Orleans USA, 2003

4) **東海林幹夫**, 松原悦朗, 瓦林毅, 村上哲郎, 永野功, 阿部康二, 針谷康夫, 池田将樹, アルツハイマー病の A β ワクチン療法の効果と副作用, 第44回 日本神経学会総会, 2003

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)
 アミロイドーシスに関する調査研究 分担研究報告書

Alzheimer 型痴呆の血液マーカー研究 —血小板アミロイド前駆体蛋白の生化学的分析

分担研究者 葛原茂樹 三重大医学部神経内科
 共同研究者 伊藤伸朗 三重大医学部神経内科

研究要旨 血小板は末梢性アミロイド前駆体蛋白(APP)、 β アミロイド ($A\beta$) の主要な産生源であり、また、 $A\beta$ 代謝に関して脳と関連した変化を示すことが報告されており、ATDの脳の病態を反映する末梢臓器として注目される。今回、アルツハイマー型老年性痴呆症(ATD)の末梢性の診断マーカーとしての血小板APPの組成変化の有用性を検討した。12名のATD患者と11名の非痴呆コントロールの血小板試料を用いたウエスタンブロットを行い、APP120-130kDバンドとAPP106-110kDバンドの濃度比(APP ratio)を測定した。今回の少数例の検討ではATD患者と非痴呆コントロールの間で、血小板APP ratioの有意差は認めなかった。また、血小板APP ratioと血清 $A\beta$ 、ApoE多型、血清コレステロール値との相関も認めなかった。

A. 研究目的

血小板はアミロイド前駆体蛋白(APP)、 β アミロイド ($A\beta$) 代謝に関して脳と関連した変化を示すことが報告されており、アルツハイマー型老年性痴呆症(ATD)の脳の病態を反映する可能性のある末梢臓器として注目される。Di Lukaら、Baskinらなど欧米の研究グループは、ATD患者における血小板膜のアミロイド前駆体蛋白(APP)の組成の変化(APP ratioの変化)を報告しATDの生化学的診断マーカーとしての有用性を報告している。また、ATDの病理には血管障害との関連も考えられており、ATDにおける血小板機能障害や血管内皮障害を示す研究結果も多く報告されている。今回、我々は本邦患者での血小板APP組成の変化を検討した。

B. 研究方法

対象: 抗血小板薬、抗炎症薬、スタチン系薬物、抗コリンエステラーゼ阻害薬の服用歴のない、アルツハイマー型痴呆症(ATD)患者12名(51-78歳、平均66.8歳、MMSE score 0-20、平均18.2)と、年齢相関させた11名(50-78歳、平均67.2歳)の非痴呆コントロールを用いた。
方法: 空腹時のATD患者、非痴呆コントロールから、駆血帯を用いて肘静脈から全血15mlをEDTA採血。血小板試料の調整は、全血9mlにbuffer A (38mmol/l citric acid、

75mmol/l trisodium citric acid、136mmol、glucose、PH6) 1mlを加えて、200g10分間遠心して上清を分離。上清(platelet rich plasma)を1500g15分間遠心した血小板pelletをbuffer B (10mmol/l Tris hydrochloride、1mmol/l EGTA、0.1mmol PMSF、protease inhibitor cocktail (Complete, Boehringer Mannheim), PH7.4)にて洗浄、1500g15分間遠心した洗浄血小板pelletにbuffer B 125 μ lを加えて懸濁し、0 $^{\circ}$ C20秒のsonicationを行った。各例につき血小板試料5 μ gを使用し、抗APP抗体(MAB348:22C11、Chemicon)を用いたWestern blotを行い、120-130kD APPバンドと106-110kD APPバンドをNIH imageにて取り込み、半定量測定により血小板APP ratio (120-130kD APPバンド濃度/106-110kD APPバンド濃度)を測定した。さらに、複数の他部位を認識するAPP抗体を用いたwestern blotを行ってAPPバンドの組成を検討した。

また、sandwich ELISAによる血清 $A\beta$ 40,42値(Biosource International)、血管内皮障害性マーカーである血清Endothelial leukocyte adhesion molecule-1(sE-selectin)値、さらにMMSE score、ApoE4 allele数、血清T-Chol値との関係を検討した。

C. 研究結果

N端抗体(MAB348)とKunitz domain部(AB5302)を認識する抗体で、120-130kDのmajor bandと106-110kD

のバンドがみられた。MAB1560 (A β 1-17) では120-130kDバンドのみ認められた。106-110kDバンドは、細胞膜—細胞内domainの認識抗体(MAB1560 (A β 1-17)、MAB1561 (A β 17-24)、AB5352 (C端))にはごく弱くしか反応しなかった (Figure 1)。血小板APP ratioは、ATD患者6.1 \pm 7.1、非痴呆コントロール7.7 \pm 5.6であった。ATD患者で低値を示す傾向はみられたが、統計的に正常対象者との間で有意差は認めなかった (Figure 2)。また、血小板APP ratioと血清A β 、sE-sectin値、MMSE score、ApoE4 allele数、血清T-Chol値との相関も認めなかった。

D. 考察

今回、調整した血小板APP試料で認められた120-130kD APPはA β の1-17アミノ酸残基までが存在しており、 α 切断部位でC端側が切断された分泌型APPであり、106-110kD APPはさらにN端よりまで切断された分泌型APPであると考えられた。この結果は、Baskinらが報告する結果と合致していたが、Di Lukaらの120-130kD APPは全長型であるという報告とは異なっていた。この血小板APPのWBのバンドパターンおよび組成は、他の複数のグループの血小板APP研究報告でも若干の違いがあり、採血—サンプル調整段階の条件の相違によるものと考えられる。APP ratio低下についてはこれまで、その機序は明らかにされていないが、いずれもATDの病態に関連して、120-130kD APPの血中での増加がみられることから120-130kD APPの血小板からの分泌が増加するため、もしくは、ATD脳で γ セクレターゼ活性の亢進が報告されているように、血小板においてもAPP代謝—切断動態が変化するためと推測されている。今回の結果からは、106-110kD APPは120-130kD APPのさらにC端切断が進んだものと考えられ、ATDで106-110kD APPの絶対値が高い傾向がみられることから、その比の低下はC端切断機序の亢進が疑われた。しかし、今回の

本邦症例での少数例の検討では、一例の著しい高値を示す症例を除けば全体にATDで低い傾向はみられたが、統計学的には有意差は認められなかった。この欧米の研究グループから提唱されているATD診断マーカーの評価については、今後さらに様々な採血—処理条件の検討、多数例での検討を必要とすると考えられた。

E. 結論

今回の少数例の検討ではATDにおける血小板APP ratio変化を認めなかった。今後さらに多数例の検討を行って、このマーカーの有用性を検討することが必要である。また、ATD脳と関連したAPP-A β 代謝に関する病態が生じているか検討するため、血小板中のAPP—A β セクレターゼの動態、APP代謝物—C terminal fragmentなどの検討が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

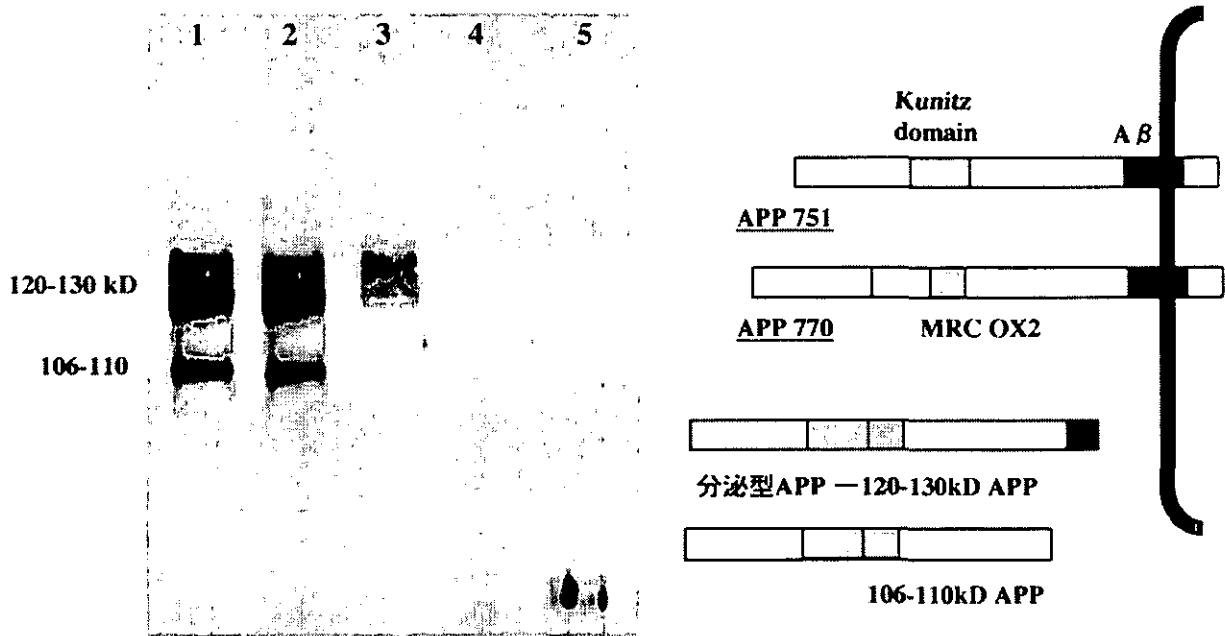


Figure 1. 各種抗体によるAPP バンド

Lane1. MAB348 (N端) , 2. AB5302 (Kunitz domain) , 3. MAB1560 (Aβ 1-17) ,
4. MAB1561 (Aβ 17-24) , 5. AB5352 (C端)

APP ratio : MAB348による120-130kDバンド濃度 / 106-110kDバンド濃度。
120-130kD APPはMAB1560まで、106-110kD APPはAB5302まで反応している。
血小板APPはKunitz domainを含むisoformが主体である。

APP ratio

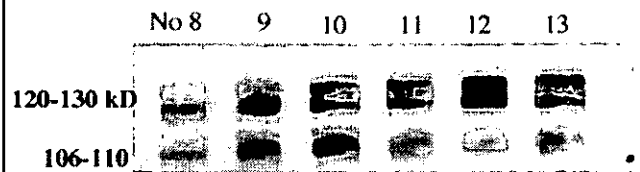
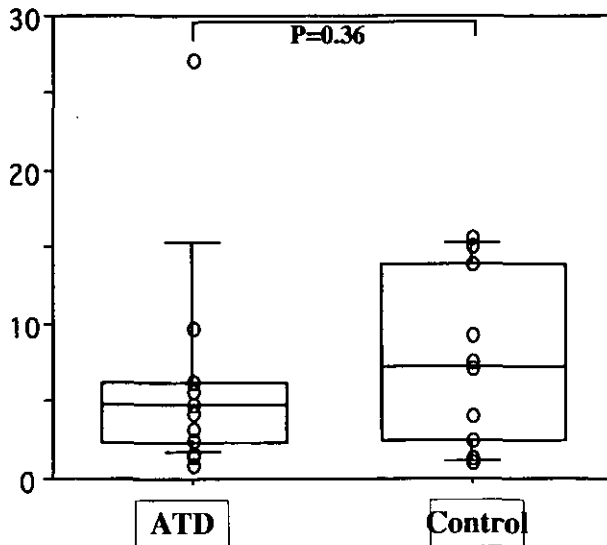


Figure 2. APP ratioと各症例のAPPバンド

No 8-10 : ATD、No11-13 :非痴呆 コントロール

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)
 アミロイドーシスに関する調査研究 分担研究報告書

わが国における脳アミロイドアンギオパチーおよび 中枢神経系限局性血管炎に関する第一次全国調査

分担研究者 山田正仁 金沢大学大学院脳老化・神経病態学(神経内科)
 共同研究者 廣畑美枝*、吉田光宏*、池田修一**、玉岡晃***、葛原茂樹****、
 東海林幹夫*****、安東由喜雄*****、徳田隆彦*****
 *金沢大学大学院脳老化・神経病態学(神経内科)、**信州大学医学部第三内科、
 筑波大学臨床医学系神経内科、*三重大学医学部神経内科、
 *****岡山大学大学院神経病態内科学、*****熊本大学臨床検査医学、
 *****信州大学大学院加齢適応医科学専攻(第三内科併任)

研究要旨 わが国における脳アミロイドアンギオパチー(CAA)、中枢神経系限局性血管炎(IACNS)の疫学病態を明らかにするため、診断基準(案)を作成し、全国調査を初めて行った。対象は、全国の主要な神経内科、脳神経外科、および病理、計884施設1378部門で、郵送によるアンケート方式で行った。回答は、418施設481部門より得た(回答率34.9%)。過去5年間に、CAA関連脳出血症例の経験は、164部門、のべ755例であった。その診断の確実さは、確実27例(3.6%)、ほぼ確実94例(12.5%)、臨床的ほぼ確実227例(30.1%)、疑い397例(52.6%)、不明10例(1.3%)であった。CAAに関連する脳出血以外の病変を示した症例は、6部門、21例であり、内訳は、白質脳症16例(76.2%) (このうち痴呆を合併するもの7例)、痴呆(白質脳症なし)1例(4.8%)、IACNS2例(9.5%)、不明2例(9.5%)であった。IACNSと診断した症例の経験は、47部門、64症例であった。これらの結果をふまえて、次年度、第二次全国調査を行う予定である。

A. 研究目的

脳アミロイドアンギオパチー(cerebral amyloid angiopathy: CAA)は高齢者でしばしばみられ、高齢者の脳血管障害や痴呆と関連する重要な疾患であるが、その疫学調査はこれまで行われていない。一方、中枢神経系限局性血管炎(isolated angitis of the CNS: IACNS)は、時にCAAに合併してみられ、的確に診断すれば治療可能な病態であるが、やはりこれまでに調査されていない。

本研究は、CAA、IACNSの診断基準を作成し、わが国における疫学病態を明らかにし、これにより本症の病態解明、早期診断法や治療法の確立に寄与することを目的とした。

B. 研究方法

CAAおよびIACNSの診断のために、平成15年8月に京都で開催された当研究班の脳アミロイドー

シス分科会において、CAAに関連する脳出血とIACNSの診断基準について検討した。

平成15年10月から12月を調査期間とし、郵送によるアンケート方式で調査を行った。全国の主要な神経内科(日本神経学会教育病院221施設および教育関連病院404施設)、脳神経外科(日本脳神経外科学会A項施設378施設)、および病理(日本病理学会認定施設375施設)、計884施設1378部門を対象とした。

過去5年間に、CAAに関連する脳出血と診断された症例の有無、症例数、その診断の確実さ、CAAに関連する脳出血以外の病態(白質脳症、痴呆、IACNS、その他)と診断された症例の有無と患者数、IACNSと診断された症例の有無とその患者数を調査項目とした。調査は疫学研究に関する倫理指針に基づき、金沢大学・医の倫理審査委員会の審査、承認を得た上で行った。

C. 研究結果

『CAAに関連する脳出血の診断基準(案)』(表1)、『IACNSの診断基準(案)』(表2)を作成した。

アンケート調査の結果、418施設の481部門より回答を得た(回答率34.9%)。アンケート調査の標本数としては、区間推定の統計手法を用いると、精度5%、推定の信頼率99%を確保していた。

CAA関連脳出血例を経験したのは164部門あり、のべ患者数は755例であった。その診断の確実さは、確実27例(3.6%)、ほぼ確実94例(12.5%)、臨床的ほぼ確実227例(30.1%)、疑い397例(52.6%)、不明10例(1.3%)であった。

CAAに関連する脳出血以外の病変を示した症例は、6部門で21例であり、内訳は、白質脳症16例(76.2%)(このうち痴呆を合併するもの7例)、痴呆(白質脳症なし)1例(4.8%)、IACNS2例(9.5%)、不明2例(9.5%)であった。

IACNSと診断した症例の経験は、47部門、64症例であった。IACNS症例でCAAが確認されたのは、2例(3%)であった。

D. 考察

『CAAに関連する脳出血の診断基準(案)』、『IACNSの診断基準(案)』を作成し、CAAと、CAAと関係が深いIACNSの疫学調査を行った。CAA、IACNSの全国調査は、わが国では初めてであり、世界的にみても類例がない。

CAAに関連する脳出血は、のべ755例に見いだされ、CAA関連脳出血例が広く全国に存在していることが明らかになった。しかし、重複例の存在も考えられることから第二次調査でそれをチェックするとともに、臨床症候、検査所見等を詳細に検討する予定である。

また、IACNSと診断された64例を見いだした。そのほとんどがCAAを伴わない症例で、CAAに伴う例は3%にすぎなかった。CAAが見逃されている可能性があり、今後、CAAに関する検索がなされているかどうかを確認し、未検索例に関しては再検討をする必要がある。

これらの点をふまえて、次年度、第二次全国調査を行う予定である。

E. 結論

『CAAに関連する脳出血の診断基準(案)』、『IACNSの診断基準(案)』を作成した。第一次全国調査にて、CAA関連脳出血のべ755例、CAAに関連する他の病態病変(白質脳症、痴呆、IACNS、他)21例、IACNS64例を見出した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamada M, Sodeyama N, Itoh Y, Takahashi A, Otomo E, Matsushita M, Mizusawa H. Association of neprilysin polymorphism with cerebral amyloid angiopathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74:749-751, 2003.
- 2) 山田正仁：脳アミロイドアンギオパチー。神経内科 58 [Suppl.3]:551-564 2003.
- 3) 山田正仁：脳アミロイドアンギオパチーとシスタチンC。臨床検査 47:899-902, 2003.

2. 学会発表

- 1) Yamada M. CAA has a direct role in the pathogenesis of AD. Challenging Views of Alzheimer's Disease. Round II. Cincinnati, OH, July 24-27, 2003
- 2) Yamada M. Cerebral amyloid angiopathy and gene polymorphisms. 1st Congress of the International Society for Vascular Behavioural and Cognitive Disorders (VAS-COG). Göteborg, Sweden, August 28-31, 2003
- 3) Hamaguchi T, Okino S, Sodeyama N, Itoh Y, Takahashi A, Otomo E, Matsushita M, Mizusawa H, Yamada M. Association of a polymorphism of the transforming growth factor- β 1 gene with cerebral amyloid angiopathy in elderly. The XVth International Congress of Neuropathology. Torino-Lingotto, September 14-18, 2003
- 4) 浜口 毅、沖野惣一、袖山信幸、伊藤嘉憲、高橋 敦、松下正明、水澤英洋、山田正仁：Association of a polymorphism of the transforming growth factor- β 1 gene with cerebral

amyloid angiopathy. 第 44 回日本神経病理学会総会学術研究会。名古屋。2003 年 5 月 29-31 日。

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

表 1. 脳アミロイドアンギオパチー (cerebral amyloid angiopathy: CAA) に関連する脳出血の診断基準*

<p><u>1. 確実 (definite CAA)</u> 剖検による完全な脳の検索により以下の3点が証明される： (1) 脳葉型、皮質あるいは皮質皮質下出血、 (2) CAA 関連血管変化**を伴う高度な CAA、 (3) 他の原因病変の欠除。</p> <p><u>2. ほぼ確実 (生検組織の陽性所見を伴う) (probable CAA with supporting pathology)</u> 臨床データおよび病理組織 (血腫吸引標本あるいは皮質生検) が以下の3点を示す： (1) 脳葉型、皮質あるいは皮質皮質下出血、 (2) 標本内に CAA、 (3) 他の原因病変の欠除。</p> <p><u>3. 臨床的にほぼ確実 (probable CAA)</u> 臨床データおよび MRI/CT が以下の3点を示す： (1) 脳葉型、皮質あるいは皮質皮質下に限局する多発性出血 (小脳出血を含む)、 (2) 年齢 55 歳以上、 (3) 他の出血の原因***の欠除。</p> <p><u>4. 疑い (possible CAA)</u> 臨床データおよび MRI/CT が以下の3点を示す： (1) 脳葉型、皮質あるいは皮質皮質下の単発性出血、 (2) 年齢 55 歳以上、 (3) 他の出血の原因***の欠除。</p>

*Knudsen et al. *Neurology* 56:537, 2001 を改変

**CAA 関連血管変化：フィブリノイド壊死を伴う微小動脈瘤形成など

***他の脳出血の原因：高血圧、ワーファリン過量 (INR>3.0)、頭部外傷、虚血性脳血管障害、脳腫瘍、血管奇形、血管炎、血液疾患あるいは凝固障害

表 2. 中枢神経系限局性血管炎 (isolated angiitis of the CNS: IACNS) の診断基準*

1. 確実 (definite IACNS) *

剖検あるいは生検によって得られた脳組織の検索により以下の2点が証明される：

- (1) 血管炎の所見が病理学的に確認されている。
- (2) 全身性の血管炎および他の原因疾患(膠原病、リンパ系腫瘍、敗血症、動脈硬化症、中毒など)が否定できる。

2. 臨床的にほぼ確実 (probable IACNS) **

臨床所見、検査データおよび画像所見が以下の3点を満たす：

- (1) 急性または亜急性に出現する神経症状(意識障害、頭痛、幻覚、局所神経症状のいずれか2つ以上)を認める。
- (2) 脳血管撮影で複数箇所の動脈に求心性の狭窄病変を認める。
- (3) 全身性の血管炎および他の原因疾患(膠原病、リンパ系腫瘍、敗血症、動脈硬化症、中毒など)が否定できる。

3. 疑い (possible IACNS) *

臨床所見、検査データおよび画像所見が次ぎの3項目を満たし、他の原因疾患が否定される：

- (1) 急性または亜急性に出現する神経症状(意識障害、頭痛、幻覚、局所神経症状のいずれか2つ以上)を認める。
- (2) 血沈の亢進あるいは髄液の蛋白増多(細胞増多、キサントクロミーを認めることもある)を認める。
- (3) 急性期のMRI/CTで以下の所見のいずれか1つを認める：
 - i) 皮質あるいは皮質下の腫瘤性病変、
 - ii) 多発性の白質病変、
 - iii) 皮質あるいは皮質下の出血性病変。

* Fountain NB and Eberhard DA. *Neurology* 46: 190-197, 1996

** Calabrese LH and Mallek JA. *Medicine(Baltimore)* 67: 20-39, 1988

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)
 アミロイドーシスに関する調査研究 分担研究報告書

臨床的にビンズワンガー型脳血管性痴呆が疑われ、脳に顕著なアミロイドア
 ンギオパチー、plaque-like angiopathy と cotton wool plaque (CWP)類似の球
 形老人斑、およびアルツハイマー神経原線維が認められた一例

分担研究者 葛原茂樹 三重大学医学部神経内科

共同研究者 村山繁雄、斉藤裕子 東京都老人研老化臨床神経部門

研究要旨 臨床的にビンズワンガー病と診断された 87 歳男性の脳において、プレセニリン 1 遺伝子変異の家族性アルツハイマー病に特有とされる cotton wool plaque(CWP)が多数出現していた。老人斑の大部分は CWP と plaque-like angiopathy で構成され、両者の関連が示唆された。多数の神経原線維変化も出現していた。この他に、ビンズワンガー病様の大脳白質病変と多発小梗塞も認めたが、白質変性形成には、アミロイドアングリオパチーが関与している可能性もある。

A. 研究目的

いわゆるフィンランド型家族性アルツハイマー病は、プレセニリン 1 遺伝子のエクソン 9 欠失 (PS1-Δ9)が原因で発症し、進行性の痴呆と痙性対麻痺を特徴とする。この家系の発症者の脳には、アルツハイマー神経原線維変化 (NFT) と並んで cotton-wool plaque (CWP)と命名された独特の形状の老人斑が出現する^{1) 2)}。CWP は、エオジン好性で全体が淡く染まり、典型的老人斑に見られるアミロイド芯を欠く球形のアミロイド斑である。コンゴ赤染色性と Thioflavin S 染色性は弱い、βアミロイド (Aβ) 免疫染色では全体が濃染する。変性神経突起に乏しく、嗜銀性とタウ免疫染色性も弱い。

CWP は当初、このタイプの家族性アルツハイマー病に特有のものと考えられていた。しかし、類似の老人斑は、老年期発症の非家族性アルツハイマー病においても、認められることが報告され、必ずしも疾患特異的なものでないことが認識されるようになった³⁾。我々はビンズワンガー病と臨床診断した高齢者に類似の所見を認めたので、報告する。

症例呈示

患者。死亡時 87 歳男性 (1898 年 1 月生)。
 家族歴：両親の状況不詳。同胞に特記すべきことなし。長男戦死。三男精神病死。

生活歴・臨床病歴

埼玉県秩父地方出身で小学校卒。雑役業につき次男夫婦と同居していたが、嫁との折り合いが悪く、独居生活は不可能な状況のために、1969 年 (71 歳) に都立老人ホームに入寮した。1974 年の検診時には、高血圧、パーキンソニズムがあり、手足不自由で転倒しやすいと記載されていた。運動機能、精神機能とも衰えてホームでの生活が困難なために、1977 年に特養へ移った。この時は歩行器使用、尿失禁があり、自発語が乏しかった。1979 年には車椅子レベルで、1982 年には無動・無言状態になった。

1983 年の神経学的所見：四肢は屈曲拘縮を呈し rigor と spasticity があつた。四肢腱反射は低下し、バビンスキー徴候はなかつた。上肢にはまさぐり行為があり、呼名でアと答え、生まれ故郷の秩父の話題をすると泣くので、会話内容はある程度は理解していると判定した。偽性球麻痺 (強制泣き、嚥下障害) があつたが、食物は時間をかけて経口摂取できた。振戦はなかつた。CT で脳室拡大と白質の低吸収域を認め (図 1)、脳波は基礎律動が 3-5Hz の徐波であつた。パーキンソニズムと診断されていた運動障害を伴う進行性の痴呆、無動無言症だが一定の理解が保たれていること、偽性球麻痺や強制泣きが強いこと、過去に高血圧の既往があつたこと、および CT 所見から