

larities or gastrointestinal problems, quinacrine was withdrawn and readministered only when the condition had returned to normal. No other medicines were given during the period of quinacrine administration. The plasma concentration of quinacrine in the patients' blood samples was measured by high-performance liquid chromatography.

Results

Quinacrine was well tolerated by all the patients. Yellowish skin pigmentation invariably appeared 10–14 days after treatment began. Transaminase values were elevated in 3 of the 4 patients, but never reached 5 times the normal upper limits. Patients 1 and 2 had quinacrine withdrawn temporarily because of aspiration pneumonia, urinary tract infection or diarrhea, but both finally completed the 3-month treatment course.

Clinical Course

A change in cognitive state appeared during the first 2 weeks of treatment (table 1). Patient 1's unfocused, occasionally roving eyes (fig. 1a) became fixed (fig. 1b) and sometimes were oriented to the side of auditory stimuli (fig. 1c). When stimulated, patients 2 and 3 showed mitigation of irritable mood and the return of smiles or laughter. Patient 3, who had been apathetic (fig. 1d), made apparent eye contact with people (fig. 1e), turned her head from side to side in response to the examiner's position, and had purposeful, voluntary movement of the left arm (fig. 1f). Patient 4 also made eye contact with people and nonpathological laughter in response to stimuli was restored. She also nodded or shook her head, apparently indicating 'yes' or 'no', in response to simple verbal questions such as those about pain or thirst.

These changes in mood or cognitive function were invariably transient, lasting 2–8 weeks during the period of quinacrine administration, after which cognitive function gradually decreased to baseline levels. Due to the associated conditions described previously, quinacrine was temporarily withdrawn from patient 1 in the 5th and patient 2 in the 6th week. Both patients' conditions deteriorated to akinetic mutism that remained even after quinacrine was restarted. After 3–8 weeks of treatment, cognitive function in patients 3 and 4 had regressed with no predisposing factors.

EEG and MRI Findings

Patient 2 showed changes in both EEG and MRI findings, which may be associated with the clinical changes that occurred. Typical PSWCs in the severely suppressed



Fig. 1. Patients' appearances before (left) and after (right) quinacrine treatment. **a–c** Patient 1 had an apathetic appearance and unfocused, roving eye movements before treatment (**a**). After treatment, there was eye fixation (**b**) and gaze oriented to auditory stimulus (**c**). **d–f** Patient 3 was listless and apathetic before treatment (**d**). After treatment, she had a well-oriented facial expression (**e**) and purposeful limb movement (**f**).

background before treatment (fig. 2a) had become irregular slow activities with less periodicity and no suppression by day 16 of treatment (fig. 2b). Before treatment, DW-MRI detected high signals bilaterally in the corpus striatum and insular and cingulate gyri, as well as in the temporal and parietal lobes. The signal intensities in the temporal and parietal lobe lesions were higher on the left than the right (fig. 3a), at which time the patient did not respond to visual stimuli presented in the right visual field, but did respond to stimuli in the left visual field. Startle responses to threatening stimuli in the right visual field, which appeared on day 19 of treatment, lasted 2 weeks. DW-MRI on day 23 showed decreased high signal intensities in the left temporal and parietal lobes, whereas signal intensity remained high in the other regions (fig. 3b).

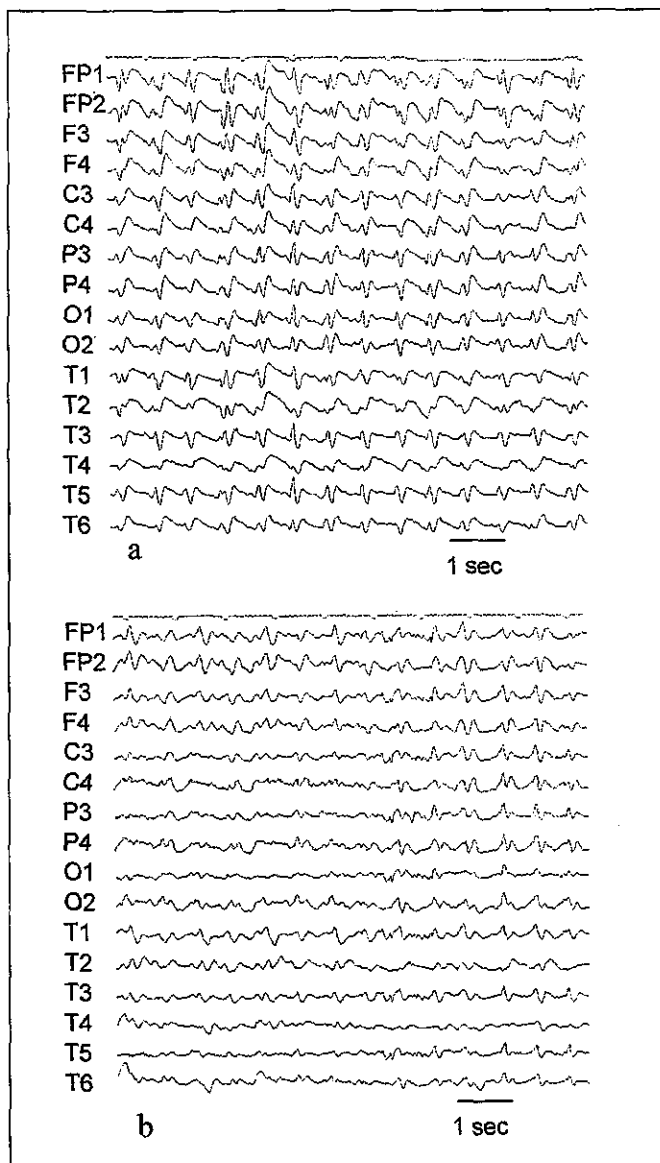


Fig. 2. Electroencephalograms for patient 2 before (a) and after (b) quinacrine treatment. PSWCs with totally suppressed background activities (a) were replaced by fewer periodic patterns and restored background activities after treatment (b).

Before treatment, patient 3 had high DW-MRI signals in the corpus striatum, cingulate gyrus and left parietal and temporal cortices. These had not changed by the 4th week of treatment, but they disappeared during the 12th week. The other two patients showed diffuse cerebral atrophy without high signals on DW-MRI, which findings did not change after treatment. On the EEGs, patient 1 had PSWCs in the suppressed background before treat-

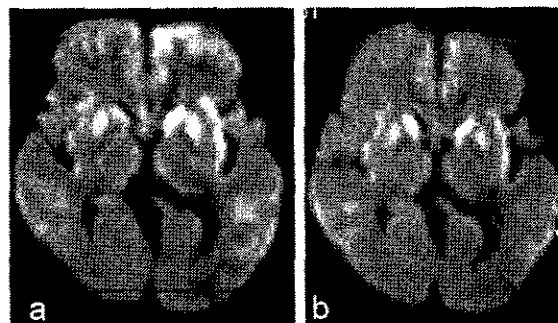


Fig. 3. DW-MRI of patient 2. The right side of each image corresponds to the left side of the brain. High signal intensities were present in the corpus striatum and insular and cingulate gyri on both sides, and in the parietal and temporal lobes before (a) and after (b) quinacrine treatment. In b, the high signal in the left temporoparietal lobes (arrow) is attenuated, whereas signals in the other regions remain unchanged.

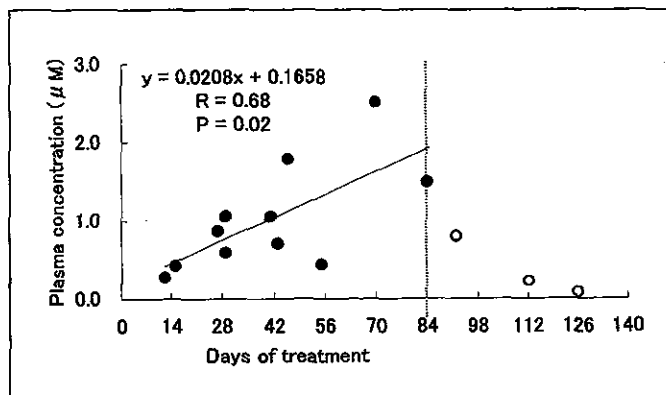


Fig. 4. Plasma concentrations of quinacrine during and after its administration. The concentration increased with the number of days of treatment. Quinacrine was still detectable in the plasma after drug discontinuation on day 84, indicating that it had accumulated in tissues.

ment. These disappeared and were replaced by diffuse slow activities of 3–7 Hz during the 2nd week of treatment, but they returned during the 4th week and disappeared thereafter. Patient 3 had PSWCs superimposed on slow background activities, and patient 4 showed diffuse slowing with occasional alpha activities. These features remained unchanged after treatment.

Plasma Concentration of Quinacrine

The plasma concentration of quinacrine increased with the length of administration (fig. 4). It reached 300 nM within 14 days and was as high as 2,500 nM near the end of the treatment period. Moreover, quinacrine was detectable in the patients' plasma 6 weeks after its discontinuation.

Discussion

In their search for potent agents to treat prion diseases, Doh-ura et al. [4] reported inhibition of PrP^{Sc} accumulation in scrapie-infected neuroblastoma cells by lysosomotropic agents, including quinacrine and cysteine protease inhibitors. These agents may interfere with the conversion of PrP^C to PrP^{Sc} at the plasma membrane or along an endocytotic pathway to the lysosomes. Recently, Collins et al. [10] reported that quinacrine did not prolong survival in a murine CJD model. Results of animal experiments, however, depend on the animal species and prion strain. Subcutaneous quinacrine administration prolonged the survival of transgenic mice inoculated with 263K scrapie agents into the brain [Doh-ura, pers. commun.].

We studied four patients, of whom three had clinically probable sCJD and one possibly iatrogenic CJD. All four had improved arousal levels after quinacrine treatment. Other changes in global brain function included decreased frequencies of reflex or action myoclonus (patients 1 and 2) and startle response (patients 2 and 3), and mitigation of the hyperkinetic state (patient 4). Focal brain functions restored were nonpathological laughter (patients 2–4), visual field (patient 2) and voluntary movement (patient 3). These changes might have been due to factors other than quinacrine, e.g. encouragement of contact by family members or caregivers, but this could be excluded for two reasons. Firstly, in Japan, intensive care is customarily given to severely disabled patients who have definitely poor prognoses. As in the case of patient 1, tube feeding is usually initiated and continued for irreversibly disabled patients because family members will not accept the cessation of feeding. The contact provided by family members and caregivers did not change after quinacrine treatment was begun in the present study. Secondly, the changes seen after treatment were transient, lasting 2–8 weeks. Thereafter, the patients' conditions regressed, even during quinacrine administration.

Of the three patients with clinically probable sCJD, transient improvement occurred not only in patients 2 and 3, who were in the early stage, but also in patient 1,

who was in the terminal, akinetic mutism stage. This last patient had an improved arousal level associated with directed fixation of the eyes (fig. 1a–c) attributable to the function of the brainstem reticular formation, a structure relatively preserved in the classic, Heidenhain variant of sCJD [11]. The most marked change, seen in patient 2, was the restored response to objects presented in the right visual field. This change was accompanied by decreased DW-MRI signal intensities in the left temporal and parietal lobes. DW-MRI is a new technique that noninvasively images molecular water proton diffusion processes that occur on a micrometer scale [12]. Mittal et al. [13] reported that in CJD, the high-intensity signal areas seen in DW-MRI are correlated with a high degree of spongiform change. They speculated that these changes are the result of the microvacuolation of neuritic processes, heralding spongiform degeneration. Of our four patients, the two who were in the early stage of illness had high signals on DW-MRI that lasted for 2–3 months but which had disappeared 5 months into the illness. Although the exact mechanism is unknown, the immature attenuation of the high signals in the temporal and parietal lobes, which was correlated with clinical changes in patient 2, suggests that the high DW-MRI signals in CJD may represent reversible changes. Decreases in the action myoclonus and startle response in patient 2 were accompanied by decreased PSWCs and increased EEG background activity. These EEG findings suggest that mitigation of the irritable state, which produced a calm appearance, was due to improved cortical function and not to deterioration.

Cognitive function was restored temporarily in patient 4, who had an unusually prolonged course. She may have received contaminated cadaveric dura mater before onset, and her incubation period of 66 months compares with the incubation periods of other Japanese patients (mean incubation period 89 ± 44 months, range 16–193 months) during the CJD outbreak [3]. She had rapidly progressive dementia during the first 2 years of her total, prolonged 6-year course. Some Japanese patients with dura mater-associated CJD may have a clinically variant, longer duration of illness, characterized pathologically by florid-type plaques [14]. The diagnosis in that patient's case has had to be postponed, but quinacrine treatment appears to be beneficial for patients with rapidly progressive dementia and prolonged survival.

Whether the changes found are due to the antiprion effect of quinacrine, as reported in *in vitro* experiments, is unknown. Therapeutic doses of quinacrine are known to cause psychomotor hyperactivity. The incidence of quinacrine psychosis is reported to be 0.9–4 per 1,000 persons

[15]. Engel et al. [16] administered 2.1–2.8 g of quinacrine to 5 healthy individuals over a 10-day period, doses sufficient to obtain plasma levels exceeding 250 nM. Their subjects had various degrees of psychomotor hyperactivity and increases in EEG frequencies. The EEG changes occurred at plasma quinacrine levels of 75–100 nM and continued for up to 8 days after discontinuation of the drug. The increased arousal levels in our patients, therefore, may be attributable to the cortical stimulation action of quinacrine, but the mechanism of its direct effect on the central nervous system has yet to be determined.

The plasma concentrations of quinacrine in our patients suggest that a therapeutic dose of 300 mg/day quinacrine may reach the EC₅₀ of PrP^{Sc} formation, i.e. 300–400 nM, in brain tissues. Quinacrine accumulates progressively in tissues when administered chronically [7]. The lowest concentrations are in the brain, heart and skeletal muscle [7], but tissue to plasma concentration ratios may be very high, as in dog skeletal muscle [8]. The clinical changes in our patients occurred from the 2nd to 8th

week of administration, and the plasma concentrations ranged from 300 to 1,000 nM. Those concentrations would be sufficient for the drug's accumulation in brain tissues as well as for its action either as a direct cortical stimulant or through its antiprion activity. Cognitive state regression during quinacrine treatment may be due to its toxicity on the brain [6]. We believe that the quinacrine dose should be decreased after the initial loading dose and the plasma concentration of the drug monitored. Although its effectiveness is limited in terms of extent and duration, our findings support undertaking a clinical trial of quinacrine and the search for other chemicals that prevent the accumulation of, or conformational changes in, prion proteins.

Acknowledgment

This study was supported by Research Grant No. 13080901 from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan.

References

- 1 Prusiner SB, Hsiao KK: Human prion diseases. *Ann Neurol* 1994;35:385–395.
- 2 Will RG, Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K, Alperovitch A, Poser S, Pocchiari M, Hofman A, Smith PG: A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 1996;347:921–925.
- 3 Creutzfeldt-Jakob disease associated with cadaveric dura mater grafts – Japan, January 1979–May 1996. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1997;46:1066–1069.
- 4 Doh-Ura K, Iwaki T, Caughey B: Lysosomotropic agents and cysteine protease inhibitors inhibit scrapie-associated prion protein accumulation. *J Virol* 2000;74:4894–4897.
- 5 Korth C, May BC, Cohen FE, Prusiner SB: Acridine and phenothiazine derivatives as pharmacotherapeutics for prion disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:9836–9841.
- 6 Lidz T, Kahn RL: Toxicity of quinacrine (atabrine) for the central nervous system. III. An experimental study on human subjects. *Arch Neurol Psychiatry* 1946;56:284–299.
- 7 Rolls IM: Drugs used in the chemotherapy of helminthiasis; in Goodman LS, Gillman A (eds): *Pharmacological Basis of Therapeutics*, ed 5. New York, Macmillan, 1975, pp 1080–1094.
- 8 Shannon JA, Earle DP, Brodie BB, Taggart JV, Berliner RW: The pharmacological basis for the rational use of atabrine in the treatment of malaria. *J Pharmacol Exp Ther* 1944;81:307–330.
- 9 Brandel J-P, Delasnerie-Lauprêtre N, Laplanche J-L, Hauw J-J, Alperovitch A: Diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease: Effect of clinical criteria on incidence estimates. *Neurology* 2000;54:1095–1099.
- 10 Collins SJ, Lewis V, Brazier M, Hill AF, Fletcher A, Masters C: Quinacrine does not prolong survival in a murine Creutzfeldt-Jakob disease model. *Ann Neurol* 2002;52:503–506.
- 11 Parchi P, Giese A, Capellari S, Brown P, Schulz-Schaeffer W, Windl O, Zerr I, Budka H, Kopp N, Piccardo P, Poser S, Rojiani A, Streichenberger N, Julien J, Vital C, Ghetti B, Gambetti P, Kretzschmar H: Classification of sporadic Creutzfeldt-Jacob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann Neurol* 1999;46:224–233.
- 12 Moseley ME, Butts K: Diffusion and perfusion; in Stark DD, Bradley WG Jr (eds): *Magnetic Resonance Imaging*. St. Louis, Mosby, 1999, p 1515.
- 13 Mittal S, Farmer P, Kalina P, Kingsley PB, Halperin J: Correlation of diffusion-weighted magnetic resonance imaging with neuropathology in Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch Neurol* 2002;59:128–134.
- 14 Shimizu S, Hoshi K, Muramoto T, Homma M, Ironside JW, Kuzuhara S, Sato T, Yamamoto T, Kitamoto T: Creutzfeldt-Jakob disease with florid-type plaques after cadaveric dura mater grafting. *Arch Neurol* 1999;56:357–362.
- 15 Lindenmayer J-P, Vargas P: Toxic psychosis following use of quinacrine. *J Clin Psychiatry* 1981;42:162–164.
- 16 Engel GL, Romano J, Ferris EB: Effect of quinacrine (atabrine) on the central nervous system, clinical and electroencephalographic studies. *Arch Neurol Psychiatry* 1947;58:337–350.

Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease with MM1-type prion protein and plaques

To the Editor: Ishida et al.¹ report a case of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease (sCJD) characterized by homozygosity for methionine at codon 129 of the prion protein gene (PRNP) and type 1 PrP^{Sc} associated with focal plaque-like deposits in the brain. They report that these deposits were mainly in the cerebellar cortex, while the cerebral cortex showed mostly diffuse, synaptic type PrP immunoreactivity. The immunoblot analysis was performed only on homogenates from the frontal cortex.

We previously found the co-occurrence of focal and synaptic PrP immunoreactivity in the same subject, both in different brain regions and within the same region.² In each, we demonstrated the presence of both type 1 and type 2 PrP^{Sc} in the brain, with a strict relation between PrP^{Sc} type and pattern of PrP immunoreactivity. In particular, the synaptic pattern was associated with type 1 PrP^{Sc}, while the focal (plaque-like perivacuolar, and perineuronal) deposits were linked to type 2 PrP^{Sc}. Most of these cases were homozygous for methionine at codon 129 of PRNP. Sample selection for immunoblot analysis was based on the microdissection of discreet areas of cerebral cortex, subcortical gray structures, and cerebellum from frozen brain slices adjacent to the paraffin-embedded section. In this section, immunohistochemistry revealed either diffuse or focal PrP deposits or both. Immunoblot analysis should be extended to other brain regions, particularly to the cerebellar cortex, where focal PrP immunoreactivity was prevalent.

Gianfranco Puoti, MD, Lucia Limido, PhD,
Roberto Cotrufo, MD, Giuseppe Di Fede, MD,
Fabrizio Tagliavini, MD, Naples, Italy

Reply from the Authors: Dr. Puoti et al.¹ raise the possibility of co-occurrence of type 1 and type 2 protease-resistant prion protein (PrP^{Sc}) in the brain of our patient with CJD. However, the report of the distribution of synaptic (granular) and plaque-like prion protein (PrP) deposits in our patient was clear. We found not only the PrP granular deposits of the synaptic type but also plaque-type PrP deposits in the cerebral cortex.¹ In their study, Dr. Puoti et al. concluded that the synaptic PrP deposits were associated with type 1 PrP^{Sc} and that the plaque-like PrP deposits and a perivacuolar PrP immunoreactivity were related to type 2 PrP^{Sc} in the patients with a homozygosity for methionine at codon 129.² According to their results, our patient should reveal co-occurrence of type 1 and type 2 PrP^{Sc} in the frontal cortex yet only type 1 PrP^{Sc}

was demonstrated. Dr. Puoti et al. reported two patients (Patients 3 and 4) of MM homozygote with focal perivacuolar and plaque-like PrP deposits and found the coexistence of both type 1 and type 2 PrP^{Sc} in those patients. However, the plaque-like deposits detected in our patient were unicentric plaque type as shown in our report¹ and appear morphologically different from those in Patient 4 shown in their study.² Our patient had different molecular and neuropathologic features of PrP than those reported by Dr. Puoti et al.

Recently, we reported that a C-terminal PrP fragment of 11–12 kDa (fPrP11–12) is related to subtypes of dural graft-associated CJD (dCJD) and other prion diseases.³ There are two subtypes of dCJD—dCJD with plaque-type PrP deposits (p-dCJD) and dCJD without PrP plaques (np-dCJD), and both the subtypes have type 1 PrP^{Sc}.⁴ Interestingly, all of the p-dCJD cases show no fPrP11–12, while the np-dCJD cases reveal fPrP11–12.⁵ Our patient showed absence of fPrP11–12 as found in p-dCJD cases (data not shown). In addition, our patient and p-dCJD patients shared common neuropathologic features as described in our report.¹

Taken together, we consider that a prion strain in our patient may be similar to that in p-dCJD rather than that in the sporadic CJD patients of MM homozygote with co-occurrence of type 1 and type 2 PrP^{Sc}.

Chiho Ishida, MD, PhD, Tetsuyuki Kitamoto, MD, PhD,
Masahito Yamada, MD, PhD, Kanazawa, Japan

Copyright © 2004 by AAN Enterprises, Inc.

References

1. Ishida C, Kakishima A, Okino S, et al. Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease with MM1-type prion protein and plaques. *Neurology* 2003;60:514–517.
2. Puoti G, Giaccone G, Rossi G, et al. Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: co-occurrence of different types of PrP-Sc in the same brain. *Neurology* 1999;53:2173–2176.
3. Parchi P, Giese A, Capellari S, et al. Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann Neurol* 1999;46:224–233.
4. Giaccone G, Canciani B, Puoti G, et al. Creutzfeldt-Jakob disease: Carnoy's fixative improves the immunohistochemistry of proteinase-K-resistant prion protein. *Brain Pathol* 2000;10:31–37.
5. Bessen R, Marsh RF. Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. *J Virol* 1994;68:7859–7868.
6. Satoh K, Muramoto T, Tanaka T, et al. Association of an 11–12 kDa protease-resistant prion protein fragment with subtypes of dura graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease and other prion diseases. *J Gen Virol* 2003;84:2885–2898.

プリオン蛋白高次構造を標的としたプリオン病の分子治療

Drug therapy in prion diseases



山田正仁

Masahito YAMADA

金沢大学大学院医学系研究科脳病態医学講座脳老化・神経病態学(神経内科学)

◎プリオン病は致死的な伝播性の脳疾患であり、現時点では確立した有効な治療法はない。その感染因子プリオンの主要構成成分であるプリオン蛋白(PrP)は宿主の染色体遺伝子によってコードされており、おもに中枢神経系で、少量ではリンパ系組織などに発現している。プリオン病の発症過程において、宿主の正常型のPrP(PrP^C)がプロテアーゼ抵抗性で感染型のPrP(PrP^{Sc})に高次構造(コンフォメーション)を転換することが、病態の中心をなすことが知られている。このPrPの高次構造転換過程をターゲットとして、プリオン病の予防・治療薬開発が行われている。*In vitro*の無細胞系でのPrPの転換実験、プリオン持続感染細胞を用いた実験、プリオン病動物モデルを用いた実験などの研究成果により、プリオン病の予防・治療薬候補として報告されている化合物を紹介し、そのなかでもとくに免疫学的手法による新しい治療法に焦点を当てて概説した。



プリオン病, プリオン蛋白, 正常型, 感染型, 高次構造(コンフォメーション)

プリオン病とは

Creutzfeldt-Jakob病(CJD)などの一群の疾患は、脳組織を動物に接種すると長い潜伏期間の後に伝播されること、しばしば脳に特徴的な海綿状変化を生じることから、従来、遅発性ウイルス感染症や伝染性海綿状脳症と呼称されてきた。しかし、その感染因子として通常のウイルスとは異なるプリオンが提唱され、現在これらはプリオン病と総称されている。プリオン病はヒト以外のさまざまな動物にもみられ、ヒツジのスクレイピー、ウシのウシ海綿状脳症(BSE; 狂牛病)、シカ類の慢性消耗性疾患(CWD)などが知られている(表1)。

プリオン病は種を越えて感染・伝播する人畜共通感染症である。近年、ウシのBSEに関連する変異型とよばれる新しいタイプのCJD(変異型CJD)(variant CJD: vCJD)がイギリスを中心に発生し、最近わが国でもBSEのウシが認定され、大きな問題となっている。また、ヒト屍体由来の硬膜移植後のCJDがわが国で多数発症し、これも社会問題化している。

ヒトのプリオン病はその病因から、①何の発病

の背景も見出されない特発性(孤発性CJD)、②感染性、③遺伝性に大別される(表1)。

発生頻度は人口100人当たり1年間にほぼ1人とされる。わが国においては、特発性の孤発性CJDが79%、プリオン蛋白遺伝子変異に伴う遺伝性プリオン病が12%、感染性プリオン病が9%を占め、感染性プリオン病はすべて硬膜移植後のCJDであった¹⁾。

プリオンの基本概念と疾患伝播のメカニズム

プリオン(prion)は“蛋白性の感染粒子(proteinaceous infectious particle)”を意味し、Prusinerによってスクレイピー感染脳から界面活性剤およびプロテアーゼ処理に抵抗性の感染性の強い分面に見出され、命名された²⁾。プリオンの主要構成成分であるプリオン蛋白(PrP)は宿主の染色体遺伝子(PrP遺伝子)によってコードされており、おもに中枢神経系で、少量ではリンパ系組織などに発現している。その産物である正常のPrPはプロテアーゼ感受性で、感染性のない蛋白である(正常

表 1 プリオン病の分類

疾患	宿主
A. 動物のプリオン病	
スクレイピー (scrapie)	ヒツジ
ウシ海綿状脳症 (狂牛病; bovine spongiform encephalopathy : BSE)	ウシ
ネコ海綿状脳症 (feline spongiform encephalopathy : FSE)	ネコ
伝染性ミンク脳症 (transmissible mink encephalopathy : TME)	ミンク
慢性消耗性疾患 (chronic wasting disease : CWD)	ミュールジカ, ヘラジカ
外来有蹄類脳症 (exotic ungulate encephalopathy)	ニヤラ (アフリカ産レイヨウ) クーズー (アフリカ産カモシカ)
B. ヒトのプリオン病	
特発性 孤発性 (Creutzfeldt-Jakob 病 : CJD)	ヒト
感染性 クールー (Kuru)	ヒト
医原性 CJD (下垂体製剤, 硬膜移植後, 角膜移植後など)	ヒト
変異型 CJD (variant CJD)	ヒト
遺伝性 Gerstmann-Sträussler-Scheinker 病 (GSS)	ヒト
家族性 CJD	ヒト
致死性家族性不眠症 (fatal familial insomnia : FFI)	ヒト

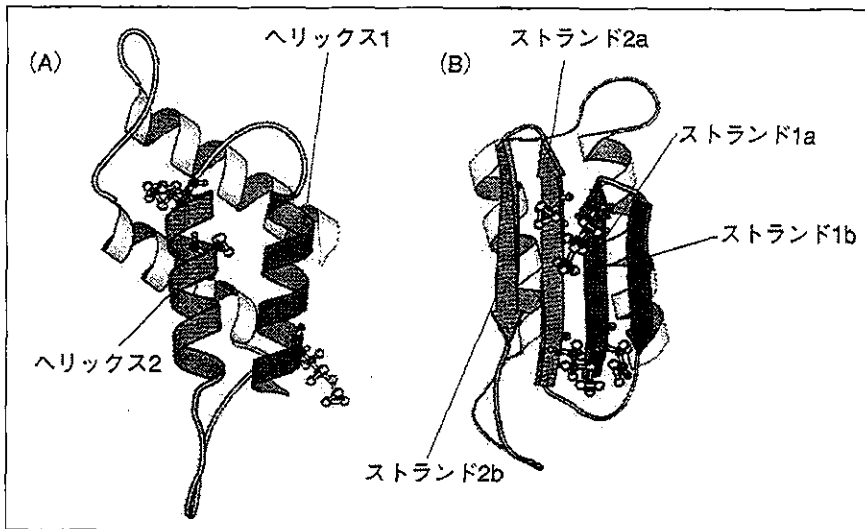


図 1 PrP^C(A)および PrP^{Sc}(B)の三次構造モデル(文献²⁾より改変)

PrP^Cのヘリックス 1 を赤色で、ヘリックス 2 を緑色で示す(A)。PrP^{Sc}に転換するときヘリックス 1 および 2 はβシート構造に転換し、PrP^{Sc}は4つのストランド(ヘリックス 1 由来のストランド 1a および 1b、ヘリックス 2 由来のストランド 2a および 2b)からなるβシート構造と2つのαヘリックス構造を含む。種間の伝播におけるバリアー(species barrier)に関係する4アミノ酸残基が分子模型として図示されているが(A, B)、それらはβシート構造の表面に位置し、PrP^{Sc}と PrP^Cの相互作用に関連しているらしい。

型 PrP : PrP^C)。一方、感染性の PrP は感染型 PrP (PrP^{Sc})とよばれ、プロテアーゼ抵抗性のコアを有し、PrP^Cが翻訳後にコンフォメーションの変化を起こし、βシート構造に富むようになることでつくり出される(図 1)²⁾。PrP^Cから PrP^{Sc}へのコンフォメーションの変化に伴う PrP^{Sc}の蓄積、あるいは正常の PrP^C機能の消失によりニューロンやシナプスの障害が生じると考えられている。この感

染因子プリオンによる共通のメカニズムによって、CJD、スクレイピーをはじめとする一群の疾患が発症するという仮説(プリオン仮説)は、現在広く受け入れられている。PrP^Cが発現していない宿主にはプリオン病は感染しない。

感染因子プリオンは種を越えて伝播し、プリオン病を引き起こす。一般に、近縁の種の間では伝播を起こしやすく、遠い種では伝播が起りにく

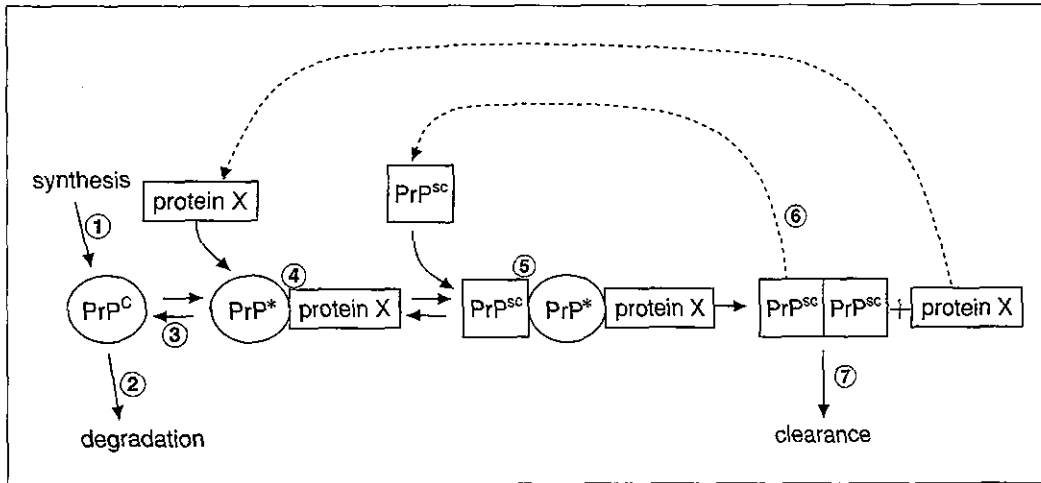


図 2 PrP^Cから PrP^{Sc}への転換(template-assisted PrP^{Sc} formation)を示す模式図(文献²⁾より改変)

細胞内で産生された PrP^Cは PrP^{*}(PrP 転換の際の中間体)として, protein X(PrP 転換に寄与する要素として想定されている因子)と結合する. つぎに, PrP^{Sc}が PrP^{*}/protein X 複合体に結合する. PrP^{*}が PrP^{Sc}に変換するとき, protein X はリリースされる. この転換過程を阻止する戦略として, ①PrP^C産生の阻害, ②PrP^C分解経路の促進, ③PrP^Cの安定化による PrP^{*}への転換阻止, ④protein X の結合阻害, ⑤PrP^C/PrP^{*}と PrP^{Sc}の相互作用阻害, ⑥PrP^{Sc}を隔離することにより PrP 転換のための鋳型(template)として利用できないようにする, ⑦PrP^{Sc}のクリアランスを促進することなどが考えられている.

いことが知られている(species barrier). 種を越えた伝播の起こりやすさには, PrP 自体の種差, PrP^Cから PrP^{Sc}への転化に関与する分子シャペロン(protein X)の種差などが関係しているものと考えられている.

また, 伝播の経路が重要であり, 感染脳のホモジネートを実験動物の脳内に直接接種すればもつとも伝播が成立しやすい. ウシの BSE がヒトへ感染し vCJD を発症することが問題となっているが, そうした場合, 経口的に摂取された BSE 因子が消化管から脳に到達し, vCJD を発症させる伝播経路が問題になる. vCJD では PrP を発現しているリンパ系組織(消化管粘膜リンパ装置, リンパ節, 扁桃, 脾など)で PrP^{Sc}が蓄積しており, そこから末梢神経系を通じて中枢神経系に伝播していく可能性が指摘されている. また, 末梢ルートで投与された下垂体製剤(成長ホルモン, ゴナドトロピン)や, プリオン腹腔内投与による動物伝播実験などでも末梢でいったん感染が成立し(末梢における PrP^{Sc}の複製), その後中枢神経系に伝播していく(中枢神経系への PrP^{Sc}の侵入).

また, 同じ種においても異なったプリオン病の表現型(潜伏期間や臨床・病理像)をもたらす, 多

様なプリオンの“株(strain)”が存在し, これらは PrP^{Sc}の異なったコンフォメーションを反映している可能性が指摘されている.

プリオン蛋白の高次構造変換のメカニズムとそれに基づく治療戦略

PrP^Cから PrP^{Sc}への高次構造変換を抑えることがプリオン病の予防・治療薬開発の基本戦略となっている. しかし, この高次構造変換の正確なメカニズムはいまだ解明されていない.

PrP^Cから PrP^{Sc}への高次構造変換について現在考えられているのは, おもに2つのモデルである. ひとつは PrP^{Sc}がシード(seed)として働き, それを核として PrP^Cが立体構造を変えてあらたな PrP^{Sc}としてつぎつぎに付加され, PrP^{Sc}の重合体ができていくという重合モデル, もうひとつは PrP^{Sc}が PrP^Cと複合体をつくり(PrP^C-PrP^{Sc} heterodimer complex), PrP^Cを PrP^{Sc}に転換させていくというヘテロダイマーモデルである(図2)²⁾. 後者のモデルに基づいて, そのさまざまな段階に修飾を加えることによって疾患の発症を予防・治療しようとする試みがなされている(図2). それらには PrP^C合成の阻害(図2-①)³⁾から生成された PrP^{Sc}のクリ

表 2 プリオン病の予防・治療薬候補として報告されている化合物(文献⁴⁻⁸⁾他から引用)

化合物	<i>in vitro</i> PrP ^{res} * ^a 転換* ^b	<i>ex vivo</i> PrP ^{res} 産生抑制* ^c	<i>in vivo</i> 潜伏期延長* ^d	コメント
ポリアニオン (ペントサンほか)	刺激	Yes	Yes	末梢における複製阻害 内因性グリコサミノグリカンと PrP ^C との相互作用阻害 脳室内投与で効果 ヒトで他の目的に使用
スルホン化色素 (コンゴレッドほか)	抑制	Yes	Yes	PrP ^C および PrP ^{res} に結合 内因性グリコサミノグリカンと PrP ^C との相互作用阻害 ヒトで他の目的に使用
テトラピロール アントラサイクリン (IDOX ほか)	抑制	Yes	Yes Yes	他のアミロイドーシスで報告あり
LTβR-Ig* ^e ダブソン ポリエン系抗生物質 (アムホテリシン B ほか)	抑制		Yes Yes? Yes	脾で PrP ^{res} や感染性を抑制 抗炎症作用. PrP ^{res} 沈着に効果なし ヒト患者での有効性の報告なし
分枝ポリアミン システインプロテアーゼ インヒビター	効果なし	Yes Yes	Yes* ^f	βシート構造を減少 PrP ^C には影響なし
ヘパラン硫酸関連物質 アクリジン誘導体 (キナクリン, クロロキン)	効果なし	Yes Yes	Yes	内因性ヘパラン硫酸と競合 株依存性の効果. PrP ^C には影響なし
フェノチアジン系薬物 (クロルプロマジン)		Yes	Yes	構造上アクリジン誘導体に類似
スラミン テトラサイクリン β-ブレーカーペプチド 合成 PrP ペプチド 抗 PrP 抗体 銅キレート剤 (D-ペニシラミン)	PrP ^{res} 減少 抑制 抑制 抑制* ^g	Yes Yes Yes	Yes Yes Yes Yes* ^f Yes	PrP ^C の代謝に影響 PrP ^{Sc} と結合 βシート構造を減少 PrP ^C の PrP ^{res} への結合を阻害 細胞膜上の PrP ^C に結合 血中および脳の銅減少

*^aPrP^{res}: プロテアーゼ抵抗性の異常プリオン蛋白, *^b*in vitro*: 無細胞系でのプリオン蛋白転換実験, *^c*ex vivo*: プリオン持続感染細胞実験, *^d*in vivo*: プリオン病動物モデルでの実験, *^eLTβR-Ig: lymphotoxin β-receptor-IgG fusion protein, *^f: 化合物で処理した感染細胞を投与した場合, プリオン病が伝播せず, *^g: 銅による PrP 転換増強効果を抑制.

アランス促進(図 2-⑦)まで含まれる。

In vitro の無細胞系でのプロテアーゼ抵抗性 PrP への転換実験, プリオン持続感染細胞を用いた実験, プリオン病動物モデルを用いた研究結果により, プリオン病の予防・治療薬候補として報告されている化合物を表 2 にあげた⁴⁻⁸⁾. キナクリン, クロルプロマジンなど, すぐに使用可能なくつかの既存の薬物⁸⁾はヒトでの応用が試みられているが, 現在までにヒトのプリオン病に有効であることが実際に検証されたものはない。

こうした化合物の臨床応用を考える場合, いくつかの点を念頭におく必要がある。ひとつは治療のタイミングの問題である。たとえば, 硬膜移植後の CJD が約 10 年の潜伏期間を経て発症するこ

とからもわかるように, 疾患は非常に長い潜伏期間のあとに発症し, いったん発症するときわめて急激な経過をたどる。臨床的に CJD の典型像を示す段階では脳は荒廃した状態になっており, 治療はすでに手遅れである。したがって, 治療薬が有効に使用されるためには発症前に, あるいは発症のごく早期に正確な診断が下される必要がある。また vCJD など, 末梢での PrP^{Sc}複製が中枢神経系へ PrP^{Sc}が伝播する前の必要なステップである場合には, 末梢段階での制御が治療の重要な標的となる。また, 中枢神経系における PrP^{Sc}複製を標的にする場合, 化合物が血液-脳関門(blood-brain barrier)を通過して脳に到達する必要がある。

以下に, 免疫学的手法を用いたプリオン病の予

防・治療法開発について述べる。

免疫学的手法を用いたプリオン病の 予防・治療法開発

近年、免疫療法、すなわち PrP による能動免疫や抗 PrP 抗体を用いた受動免疫などがプリオン病に有用であることを示唆する報告がつぎつぎとなされている。

プリオン感染細胞への抗 PrP 抗体投与によって PrP^{Sc}複製が抑制され、既存の PrP^{Sc}が分解・除去されることが示された^{9,10}。抗 PrP 抗体は PrP^C上のある領域に結合し、PrP^{Sc}の複製過程を抑制するらしい。

さらに、プリオンの末梢からの(腹腔内)投与によるプリオン病動物モデルにおいて、PrP による能動免疫¹¹、あるいは抗 PrP 抗体¹²⁻¹⁴がプリオン病の発症を遅延・抑制することが報告された。

最近の報告¹³では、プリオンの腹腔内投与後、脾における PrP^{Sc}の蓄積が最大レベルに達したときにはじめて抗 PrP 抗体を投与した場合でも抗体投与によって末梢における PrP^{Sc}のレベルやプリオンの感染性を顕著に減少させることができること、未治療動物では死亡してしまう 300 日を過ぎても治療を継続している動物は無症状のままであることなどが報告され、受動免疫療法がきわめて有効である可能性が示唆されている。

また、PrP^Cで能動免疫する場合は PrP^Cは宿主の自己成分であるため、免疫学的寛容ということが問題になる。ダイマー化した PrP を免疫原として投与すると抗体が効率よく産生され、膜表面に存在する PrP^Cと結合し、PrP^{Sc}への転換過程を抑制することが報告された¹⁵。

こうした免疫療法はプリオン病の末梢段階においてのみ有効であり、感染が中枢神経系に波及した段階、あるいは直接脳内にプリオンが接種された場合には無効である。抗 PrP 抗体は血液-脳関門を通過せず、脳内の PrP^{Sc}複製過程には効果を発揮できないものと推測される。これは Alzheimer 病動物モデルにおいて脳内に蓄積するアミロイド β 蛋白(Aβ)に対する抗体を末梢から投与することによって脳内の Aβ 沈着を抑制・除去することができるという観察とは対照的であり、Alzheimer

病動物モデルの場合は抗 Aβ 抗体が末梢の Aβ を減少させることにより脳からの Aβ の“ひきぬき”が起こることが推定されている¹⁶。

また、非特異的な免疫療法として先天免疫(innate immunity)を刺激することが知られている CpG オリゴデオキシヌクレオチドをプリオン腹腔内接種後の動物に投与すると、感染マウスの生存期間を有意に延長することが報告されている¹⁷。抗プリオン効果のメカニズムは明らかではないが、マクロファージ、単球、樹状突起細胞を刺激し、抗 PrP 反応を強化している可能性がある¹⁷。

最近、PrP^Cをヒト免疫グロブリン G の Fc 部位(Fcγ)へ結合させて可溶性かつダイマー化した PrP^C(PrP-Fc₂)を発現させたマウスにおいて、プリオン接種後、PrP^{Sc}の複製・蓄積、プリオン病の発症が遅延することが報告された¹⁸。このマウスの脳において、PrP-Fc₂は lipid raft において PrP^{Sc}と複合体を形成するがプロテアーゼ抵抗性を獲得せず、PrP-Fc₂^{Sc}への転換に抵抗性であることが示唆された。PrP-Fc₂を発現するが、内因性 PrP^Cをノックアウトしたマウスはプリオン病に抵抗性で PrP-Fc₂^{Sc}を蓄積せず、他の動物へプリオン病を伝播させることはなかった。PrP-Fc₂はプリオンの腹腔内接種動物ばかりでなく、プリオンを脳内接種された動物においても有効であった。PrP-Fc₂は PrP^{Sc}を隔離して、PrP^{Sc}を PrP 転換の際の鋳型として使えないようにすることが示唆される。こうした可溶性 PrP 誘導体は PrP 転換過程にアンタゴニストとして作用する新しい種類の予防・治療薬候補であり、今後、トランスジェニックモデル以外での効果や副作用の検討が待たれる。

おわりに

PrP 高次構造を標的としたプリオン病の治療法開発について概説した。

プリオン病の発症過程には PrP の高次構造転換メカニズム以外にも、まだ多数の不明な点がある。たとえば、プリオン病脳神経細胞内において、PrP^Cの代謝過程が変化し PrP^{Sc}が蓄積して神経細胞死が生じるメカニズムはいまだ十分明らかにされていない。こうした点が解明されることにより、あらたな分子治療の標的が見出されることになる

う。また、本文中にも述べたように、有用な治療法の開発と同時に、PrP 高次構造を標的とするような高感度の診断法の開発も必須である。研究の進展を期待したい。

文献

- 1) 山田正仁：臨床神経，2003。（印刷中）
- 2) Prusiner, S. B. : Prion Biology and Diseases. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1999.
- 3) Mallucci, G. et al. : *Science*, **302** : 871-874, 2003.
- 4) Brown, P. : *Neurology*, **58** : 1720-1725, 2002.
- 5) Forloni, G. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99** : 10849-10854, 2002.
- 6) Adjou, K. T. et al. : *J. Gen. Virol.*, **84** : 2595-2603, 2003.
- 7) Sigurdsson, E. M. et al. : *J. Biol. Chem.*, **278** : 46199-46202, 2003.
- 8) Korth, C. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98** : 9836-9841, 2001.
- 9) Peretz, D. et al. : *Nature*, **412** : 739-743, 2001.
- 10) Enari, M. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98** : 9295-9299, 2001.
- 11) Sigurdsson, E. M. et al. : *Am. J. Pathol.*, **161** : 13-17, 2002.
- 12) Heppner, F. L. et al. : *Science*, **294** : 178-182, 2001.
- 13) White, A. R. et al. : *Nature*, **422** : 80-83, 2003.
- 14) Sigurdsson, E. M. et al. : *Neurosci. Lett.*, **336** : 185-187, 2003.
- 15) Gilch, S. et al. : *J. Biol. Chem.*, **278** : 18524-18531, 2003.
- 16) DeMattos, R. B. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98** : 8850-8855, 2001.
- 17) Sethi, S. et al. : *Lancet*, **360** : 229-230, 2002.
- 18) Meier, P. et al. : *Cell*, **113** : 49-60, 2003.

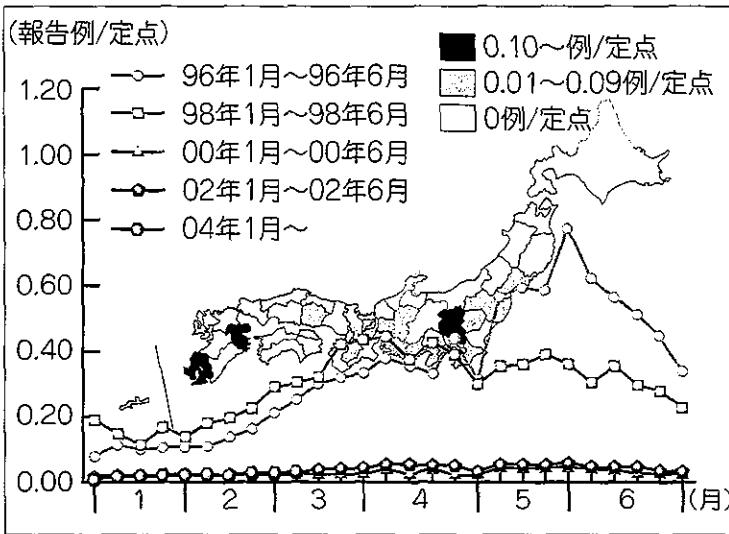
* * *

INFECTIOUS DISEASES REPORT

長崎大学名誉教授 松本 慶蔵 監修

▶ 風疹*1 ◀

【解説・川崎医科大学 小児科第1講座 助教授 寺田 喜平】



風疹は妊婦が感染すると胎児が先天性風疹症候群 (CRS) になることがあり、少子化の中、次世代の子供達を守るために重要な疾患である。1995年予防接種法改正施行後、対象が女子中学生から生後12~90カ月の幼児 (男女) となった。そのため、1995年以降定点当たりの報告数が1.2を超えた年はなくなった。しかし、経過措置時の接種率は低く、その頃の中学生は最高23歳になった。わが国では、抗体調査から女性約70万人以上、男性450万人以上が感受性者と推定されている。昨年度全国的な風疹の流行はなかったが、岡山県で散在性小流行があり、CRS 2例と不顕性胎児感染2例が発生した。その後、広島県と東京都で各1例のCRSを確認した。流行パターンは、はじめ小流行から1~2年漸増し、ピーク後漸減していった状況を考慮すると、今後数年間流行が予想される。とくに、春先から流行が始まるので、本年は今後の動向に注意する必要がある。

▶ トピックス ◀

● クロイツフェルト・ヤコブ病 ●

【解説・金沢大学大学院医学系研究科 脳病態医学講座 脳老化・神経病態学 (神経内科学) 教授 山田 正仁】

クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) は世界中で1年間に人口100万人あたり、ほぼ1人の発症率といわれているが、最近、わが国を含め世界各国で増加傾向が報告されている。これは疾患に対する認識が高まったことと関連している可能性もあるが、長期に渡る綿密なサーベイランスが必要である。

厚生労働省難治性疾患克服研究事業『プリオン病および遅発性ウイルス感染に関する調査研究』班・CJDサーベイランス委員会は、わが国のプリオン病について全例実地調査を原則にサーベイランスを行っている。平成11年から15年10月までに登録された440例のプリオン病についてみると、孤発性CJD 343例 (78%)、遺伝性プリオン病 52例 (12%) (内訳: 家族性CJD 31例 [7%], ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病 20例 [5%], 致死性家族性不眠症 1例 [0.2%])、感染性CJD (すべて硬膜移植後) 41例 (9%) に分類された。わが国では硬膜移植後のCJDが多いことが特徴であり、世界的な問題となっているウシ海綿状脳症 (BSE) に関連する変異型CJDは現在まで1例も確認されていない。

硬膜移植後CJD患者数は増加を続けており、過去の調査で判明した者と本サーベイランスの結果とを加えると合計102例となった。多くの患者は1987年に硬膜の処理法が変更される前に移植を受けた者であり、移植からCJD発症までの潜伏期間の平均は125ヵ月 (約10年)、最長は275ヵ月 (約23年) である。潜伏期間は長期化する傾向にあり、今後も硬膜移植後のCJD患者が新たに発症してくることが予想される。

▶ 平成16年10週 第3102表 報告数・定点当り報告数, 疾病・都道府県別より*2 ◀

インフルエンザ	咽頭結膜熱	A群溶血性 レンサ球菌咽頭炎	感染性胃腸炎	水痘	手足口病	伝染性紅斑	突発性発しん	百日咳									
→	↗	↗	→	↗	→	→	→	→									
報告数 定点当り	報告数 定点当り	報告数 定点当り	報告数 定点当り	報告数 定点当り	報告数 定点当り	報告数 定点当り	報告数 定点当り	報告数 定点当り									
総数 24891	5.29	556	0.18	6602	2.17	30175	9.93	6566	2.16	156	0.05	939	0.31	1799	0.59	26	0.01

(当該週と過去5年間の平均の比 (対数) を矢印にて表した。→: -0.50~0.50, ↗: 平均±1SD, ↘: 平均±2SD)

(*1~2は国立感染症研究所 感染症情報センター「厚生労働省 感染症発生動向調査事業のデータ」をもとに作成)

▶ 細菌性赤痢

【解説・東京都立北療育医療センター 院長 増田 剛太】

細菌性赤痢は、腸内細菌科に属するグラム陰性桿菌である赤痢菌属（A群：*Shigella dysenteriae*, B群：*S. flexneri*, C群：*S. boydii*, D群：*S. sonnei*の4群に大別）を病原体とし、大腸壁の潰瘍を伴う炎症性病変を主体とする腸管感染症である。臨床症状としては発熱、下腹部痛、テネスムス（しぶり腹）と血便・粘血を混じた頻回の下痢（図1）が挙げられる。赤痢菌感染は患者糞便に汚染された飲食物の摂食により成立する。10~100個の生菌により発病するほど感染力が強く（患者糞便1グラム当たりの赤痢菌数は $10^3 \sim 10^9$ ）、家族内伝播の発生もまれではない。

細菌性赤痢は感染症法で二類感染症に分類され、他個体へ蔓延させる可能性が高い発症者は入院勧告、措置により感染症指定医療機関への入院対象となる。さらに、病原体がまだ同定されていないが本疾患である可能性が高い有症症例（疑似症例）も同様に扱う。保菌者は入院の対象としない。

現在、世界的に流行している赤痢菌型は弱毒菌である*S. sonnei*であり、その結果、細菌性赤痢全体としての臨床症状は概して軽症であるため（表1）、サルモネラやカンピロバクターなどの細菌性、さらにウイルス性腸炎

との臨床的鑑別が困難である。

わが国の本疾患症例数は第二次世界大戦後の混乱期に年間10万人を数えたが、国内の衛生環境の改善とともに報告数が減少して1974年以降は1,000人台で経過し（伝染病統計）、1999年以後は1,000人以下となった（感染症発生動向調査）。今日のわが国の症例の70~80%は発展途上国からの帰国者に生じた輸入例であるが、感染経路不明の散発・集団例や輸入食品を媒体とした集団発生事例も報告される。

かつて小児に好発した疫痢や菌血症・関節炎を合併症とする症例は、今日では皆無に近い。細菌性赤痢の診断は糞便培養での赤痢菌分離により確定するが、培養は必ず抗菌薬投与開始前に行なう。

細菌性赤痢の治療で重要なのは、①重症度に合わせた食餌制限と②水・電解質溶液（スポーツドリンクなど）の飲用である。5~10回/日程度の下痢症例での食餌は全粥または消化のよい食物の少量摂取とする。重症例では絶食とし、点滴による水分補給を行なう。③抗菌薬投与は臨床症状と排菌期間の短縮に極めて有効である。通常、この目的にニューキノロン薬やホスホマイシンが3~5日間投与される。

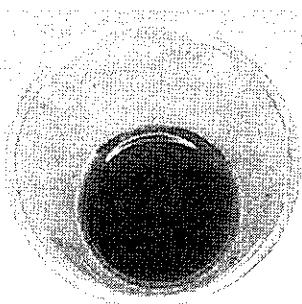


図1 プラスチックコップに採取した細菌性赤痢患者の血性水様便

テネスムスを伴い頻回に排出されるため、一回量は多くない。

表1 細菌性赤痢の臨床像 (n=221)

症状	陽性数 (%)
水様便	180/210(85.7)
血便	53/213(24.9)
発熱 $\geq 38^{\circ}\text{C}$	87/192(45.3)
腹痛	144/210(68.6)
嘔気・嘔吐	30/212(14.2)
症状持続期間	1~ ≥ 10 日 (中央値5日)
排便回数	1~ ≥ 21 回/日 (中央値6回/日)

東京都立駒込病院 1985~1994年症例。保菌者例・混合感染例を除く（増田剛太：新内科治療ガイド [矢崎義雄，ほか編集]，pp.1496-1498，文光堂，1999，より）

制作・発行：⑧ 医薬ジャーナル社

大阪市中央区淡路町3丁目1番5号 淡路町ビル21 ☎541-0047 代表 06(6202)7280 FAX 06(6202)5295
 東京都千代田区三崎町3丁目1番1号 高橋セーフビル ☎101-0061 代表 03(3265)7681 FAX 03(3265)8369

提 供：⑨ 大正富山医薬品株式会社

6 孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病の嗅上皮における異常プリオン蛋白の検出

Detection of Pathologic Prion Protein in the Olfactory Epithelium in Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease

CJDの診断における嗅粘膜生検の有用性が示唆された

【背景・目的】ヒトの伝播性海綿状脳症あるいはプリオン病の特徴は、宿主の正常型のプリオン蛋白 (PrP^C) が立体構造上の修飾を受け、不溶性でプロテアーゼ抵抗性の異常プリオン蛋白 (PrP^{Sc}) になることにある。

孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) は、急速進行性の痴呆、ミオクローヌス、脳波上の周期性同期性放電、脳脊髄液中の14-3-3蛋白上昇などを示し、PrP遺伝子コドン129の多型とPrP^{Sc}の性質がその表現型に影響している。しかし、現時点では脳生検以外に生前に確定診断しうる末梢性の診断マーカーは存在しない。

嗅皮質と嗅覚路は孤発性CJDにおいて高率に侵されることが知られており、著者らは嗅粘膜を含む嗅覚路の末梢領域を検索してPrP^{Sc}の鼻腔上皮における沈着について評価した。

【方法】神経病理学的に確定診断された9例の孤発性CJDを対象とした。

剖検時に脳、嗅粘膜の付着した篩板 (図)、および周辺の呼吸上皮を採取した。対照として

神経疾患のない5例とそのほかの神経疾患患者 (アルツハイマー病など) を含めた。嗅粘膜、呼吸粘膜、頭蓋内嗅覚系 (嗅球、嗅索、梨状葉前皮質、内嗅領皮質) について、病理、免疫組織化学的検索用標本、ウエスタンブロット法用の凍結標本を採取した。PrPの免疫組織化学的検索は3F4抗体 (抗PrPモノクローナル抗体) を用いABC法で行った。ウエスタンブロットは組織100mgを用い、プロテイナーゼK処理後にサンプルを電気泳動してブロットした後、3F4抗体に反応させた。

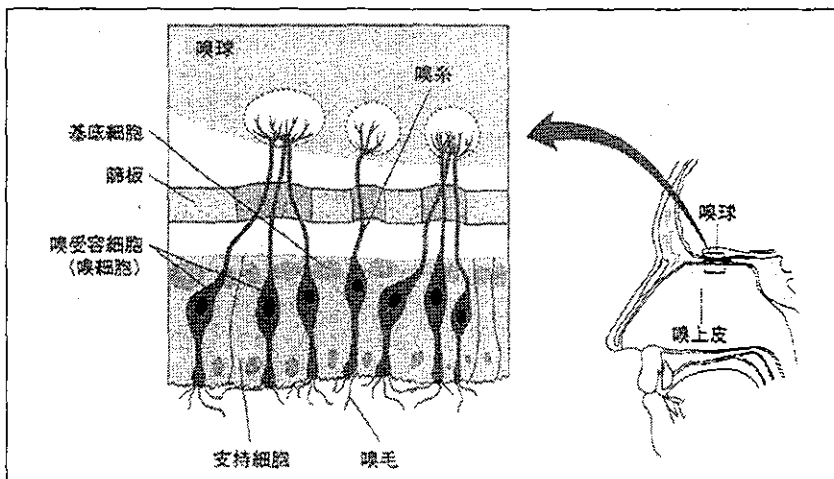
【結果】孤発性CJD 9例の臨床症状、脳波所見、髄液14-3-3蛋白、コドン129多型、PrP^{Sc}のタイプを表に示す。PrP遺伝子変異を有する症例はなかった。

CJDの嗅上皮細胞は組織学的には明らかな異常所見を示さなかった。しかし、PrP免疫染色では対照例はすべての組織が陰性であったが、CJDは全例において嗅受容細胞の嗅毛に強い陽性所見を、嗅上皮基底細胞には弱い陽性所見を認めた。呼吸上皮は陰性であった。CJDの嗅球、嗅索、嗅皮質にはPrPの沈着が認められた。

ウエスタンブロット法で嗅上皮および呼吸上皮におけるPrP^{Sc}発現をみると、それぞれ、脳の約20%、13%の量の発現がみられた。プロテイナーゼK処理後のPrP^{Sc}をリン酸タングステン酸塩を用いて沈降させて検討すると、嗅上皮にのみPrP^{Sc}が見いだされ、糖鎖がついていないPrP断片のサイズは、コドン129がMet/Metの全例で22kD、Val/Valの症例9では21kDであった。孤発性CJDの呼吸上皮や対照例の組織ではPrP^{Sc}は検出されなかった。

嗅覚領域、新皮質、皮質下灰白質、小脳におけるPrP^{Sc}の分布をみると、コドン129がMet/Metのケースでは、新皮質に大量、視床や基底核や小脳では比較的少量、海馬では極少量であったが、一方で内嗅領皮質や嗅皮質では比較的大量のPrP^{Sc}を認めた。嗅球や嗅索などの領域にもPrP^{Sc}が検出された。

図●末梢嗅覚系



嗅受容細胞 (嗅細胞) の樹状突起の先端部には嗅毛が数本あり、嗅毛にはにおい受容部位がある。嗅受容細胞は嗅糸とよばれる一本の細い軸索を篩板を貫いて嗅球へ送っている。嗅上皮は3種類の細胞からなり、嗅受容細胞以外に支持細胞、基底細胞がある。

コドン129がVal/Valである症例9においては、PrP^{sc}は新皮質では少量であったが、小脳や皮質下灰白質では大量に認められ、嗅球、嗅索、嗅皮質では中等量が認められた。

【考察】本研究により孤発性CJDでは嗅覚路が侵され、PrP^{sc}が嗅粘膜の神経上皮に検出されることが示された。嗅粘膜生検の診断的意義が問題となるが、本研究は剖検組織を用いたものであるため、孤発性CJDの臨床経過のどの段階で嗅粘膜にPrP^{sc}が出現するかは不明である。嗅覚障害を初発症状としている症例もあることから初期から嗅覚系が侵されている可能性もあり、嗅粘膜生検が孤発性CJDの初期診断上で有用な方法となる可能性がある。

また、嗅粘膜が感染源となって嗅覚経路がプ

リオンの感染経路になる可能性もあり、鼻腔上部を含む内視鏡検査や外科手術では十分感染に注意する必要がある。嗅上皮におけるPrP^{sc}蓄積は、嗅上皮がプリオン感染ルートの入口に位置することを示唆するのか、あるいは単に神経系におけるプリオン感染が広がった結果であるのかなど問題は今後の課題である。

【結論】孤発性CJDの嗅粘膜の神経上皮においてPrP^{sc}が沈着していることが示された。嗅粘膜生検は診断上有用である可能性がある。また、嗅覚経路による感染はプリオン伝播の一形式である可能性がある。

山田正仁 [金沢大学大学院医学系研究科脳老化・神経病態学(神経内科学)教授]

表●孤発性CJD9例の特徴(全例とも髄液14-3-3蛋白陽性)

1	72歳(男性)	Met/Met	21	幻覚	5カ月	失調、ミオクローヌス	PSWs	
2	71歳(女性)	Met/Met	21	幻覚	8カ月	痴呆、失調、ミオクローヌス	PSWs	
3	73歳(女性)	Met/Met	21	失調、構音障害	16カ月	痴呆	PSWs	
4	74歳(女性)	Met/Met	21	痴呆	2カ月	失調	PSWs	
5	69歳(女性)	Met/Met	21	皮質盲	5カ月	痴呆、ミオクローヌス	DS	
6	59歳(男性)	Met/Met	21	痴呆	3カ月	ミオクローヌス	PSWs	
7	55歳(女性)	Met/Met	21	嗅覚障害	5カ月	痴呆	PSWs	*糖鎖のついていないプロテイナーゼK抵抗性PrP ^{sc} 断片の分子量
8	52歳(男性)	Met/Met	21	痴呆	3カ月	失調、ミオクローヌス	PSWs	PSWs: 周期性銹徐波複合
9	64歳(女性)	Val/Val	19	失調	5カ月	痴呆	DS	DS: びまん性徐波化

RIEMARK

CJDの新規診断法の開発

山田正仁

プリオン病の確定診断は異常プリオン蛋白PrP^{sc}の検出による。最近、採取が容易な末梢組織や体液を用いて異常PrPを検出し、脳生検なしに異常PrP蓄積を診断しようとする試みがなされている。たとえば、高感度の検出法を用いて患者の髄液からPrP^{sc}を検出できたとする報告(Bieschke J et al: Proc Natl Acad Sci USA 97: 5468~5473, 2000)、患者の尿中にプロテアーゼ抵抗性PrPが検出されるとする報告(Shaked GM

et al: J Biol Chem 276: 31479~31482, 2001)などがあり、臨床応用への可能性が検討されている。また、変異型CJDでは扁桃組織にPrP^{sc}の沈着がみられることから、扁桃生検が診断上有用である。

本研究では孤発性CJD患者の嗅上皮にPrP^{sc}が見いだされ、嗅粘膜生検が診断上有用である可能性が示唆された。ただし、本研究は剖検時の組織を用いた研究であるため、いくつかの問題がある。たとえば、臨床経過のどの段階から嗅上皮にPrP^{sc}が検出されるようになるのかが不明である。また、免疫組織化学のみならずウエスタンブロット

法でPrP^{sc}を正確に検出するためには、ある程度以上の量の嗅粘膜組織を生検で採取する必要がある。しかし、嗅粘膜生検は有用な診断手段になる可能性があり、孤発性CJDの病型別(MM1/MM2/MV1/MV2/VV1/VV2)やほかのプリオン病についても詳細な検討を加える必要がある。

また、嗅粘膜が感染源となって嗅覚系がプリオンの感染経路になる可能性が指摘されているが、この点も臨床上的大きな問題である。鼻腔上部を含む内視鏡検査や外科手術は医原性感染をおこす可能性があることに十分注意する必要がある。

質疑応答

◎質問は「日本医事新報社質疑応答係」宛にはがき、封書、FAX(03-3113-2921-550)でお願いします。
◎質問は読者の方々がご覧になるための誌上掲載が前提です。

◎誌上匿名の取り扱いを致しますが、連絡の必要がありますので、住所・氏名・電話番号を必ず明記してください。
◎質問の採否は編集部にて一任ください。
◎質問は無料ですが、誌上掲載前に回答をご覧になりたい場合は、一件につき送付手数料1000円を切手同封か、現金書留等を利用してお送りください。

一般診断

虚血性心疾患の聴診におけるI音の減弱



一、虚血性心疾患の時、聴診上、I音は心臓の強さを表し、

特に心筋が傷害された場合、膜式では聴こえが悪く、ベル式で聴こえるといわれる。例えば糖尿病の場合、無痛性心筋梗塞が生じていると解釈できるか(心不全以外の時でギャロップ以外)。

二、また、心聴診所見がdistantであるといわれるが、その意義について、実地医家向けに解説を。
以上、さわやまクリニック・沢山俊民院長に。
(群馬県 N)

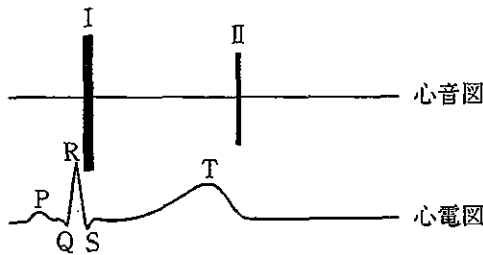


一、I音の強さ(大きさ)には音量と亢進度が関係している。I音の強さは他の条件

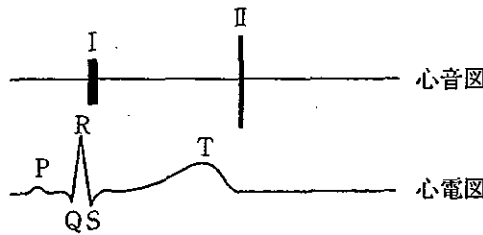
(とりわけ心電図P-R間隔の長短)が一定ならば心筋の収縮性の強弱(左室心筋の収縮速度)に関連す

図1 心尖部における3状態の心音図所見¹⁾

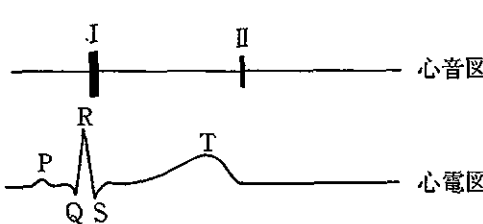
1. 正常心音〔若年健常者：I音、II音とも大きい〕



2. I音減弱〔虚血性心疾患等で心筋収縮性が減弱した例〕



3. distant心音〔肥満者：I音、II音とも小さい〕



る。例えば、甲状腺機能亢進患者や若年健常者を聴診すると、I音が亢進していることに気づくであろう。
一方、I音がベル式では聴きやすいが膜式で聴きにくいという所

見は「I音の減弱」と表現され、心筋収縮性の低下を意味するが、疾患特異性はない。しかし、もし正常大であったI音が、心筋梗塞後に減弱したことがわかれば、それは梗塞により心筋収縮性が減弱したためといえよう。
二、次に、「聴診所見がdistantである」という表現は、心血管系そのものの異常によるためというよりも、心臓と胸壁との距離が遠い(distant)状態、代表は肥満例と肺気腫例である。これらの場合には二心音とも聴き取りにくく(ただ音量が小さい)、呼吸音も当

然distantである。
図1に、正常心音、I音減弱ならびにdistant心音をそれぞれ示しておく。
〔文 訳〕
1) 沢山俊民：CDによる聴診トリーニング 心音編・改訂第2版、南江社、1994、p.17。
さわやまクリニック
倉敷心臓病予防施設
沢山俊民

内科



日本人の多くがウシ海綿状脳症(BSE)と同じ病原に感染する

BSE病原体に対する感受性の人種差

る遺伝子型を持つており、欧米人よりむしろBSEの病原体に感染しやすいと聞いたが、その理由について。
(鳥取県 E)



ウシのBSEやヒトのクロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)などの一群の疾患は、種

を越えて感染する人畜共通感染症であり、感染因子として、ウイルスなどの通常の病原体とは異なるプリオンが提唱され、現在これらはプリオン病と総称されている。
ヒトのプリオン病はその病因から、①何の発病の背景も見出されない特発性(孤発性CJD)、②感染

る

性、③遺伝性に大別される。近年、

感染性プリオン病の一つとして、ウシのBSEから伝播したとされる変異型と呼ばれる新しいタイプのCJD（変異型CJD, variant CJD: vCJD）が英国を中心に発生し、わが国でもBSEのウシが認定されたことから、大きな社会問題となっている。わが国におけるサーベイランスでは、現在までにvCJDと認定された患者はおらず、感染性プリオン病はすべて屍体由来の硬膜移植後のCJDである。

プリオンの主要構成成分であるプリオン蛋白(PrP)は、宿主の第20染色体短腕上の遺伝子(PrP遺伝子)によってコードされており、主に中枢神経系に、少量ではリンパ系組織などに発現している。正常のPrPはプロテアーゼ感受性で、感染性はない(正常型PrP: PrP^C)。一方、感染性のPrP(感染型PrP: PrP^{Sc})はプロテアーゼ抵抗性のコアを有し、PrP^Cが翻訳後に立体構造の変化を起し、作り出される。プリオン病では、PrP^{Sc}の蓄積あるいは正常のPrP^C機能の消失により、ニューロンやシナプスの障害が生ずると考えら

れている。

PrP遺伝子には多数の変異、多型の部位が存在する。変異は遺伝性プリオン病の病因となり、一方、多型は孤発性CJDや感染性プリオン病の疾患感受性(発病しやすさ)や表現型(病像)に影響する。PrP遺伝子に見出されている多型の中で、コドン129の多型は最も一般的にみられ、vCJDの感受性にも関係している。コドン129多型にはメチオニン(M)とバリン(V)の二種類のアレル、MM、MV、VVの三種類の遺伝子型がある。V/Vの三種類の遺伝子型がある。コーカサス人種(英国)におけるM/Vのアレル頻度は〇・六二五/〇・三七五であるのに対し、日本人では〇・九五八/〇・〇四二であり、アレル頻度に明らかな人種差がある。

コーカサス人種において、孤発性CJDではロドン129がホモ接合体(MMあるいはVV)である頻度(八七〇九五%)が健常者のそれ(ほぼ五〇%)と比べて有意に高く、ホモ接合体を有することが孤発性CJDのリスクであると考えられている。しかし、もともととMMのホモ接合体が九〇%以上を占める日本人では、この関連は

容易には検証されえない。また、屍体由来の下垂体由来成長ホルモン製剤の使用や硬膜移植等によって感染した医原性CJDにおいても、同様にホモ接合体の頻度が高い。

注目すべきは、コドン129がMMのホモ接合体であることが、変異型(vCJD)発症のリスクと考えられている点である。英国でこれまで検索されたvCJD一三例のすべて(一〇〇%)がMMのホモ接合体であった。一方、英国の一般人口におけるMMの頻度は三七%にすぎない。前述したように、日本人では、MMのホモ接合体を有する人が全体の九〇%以上を占めている。したがって、英国におけるvCJDとMMホモ接合体の関連が日本人にそのまま当てはまるものと仮定し、さらに、日本人が英国と同程度にBSE因子に曝露されたと仮定した場合、日本人は英国人よりもvCJDを発症しやすいものと推定される。

最近、vCJDを後になって発症したドナーから輸血を受けた英国人患者が五年後に非神経疾患で死亡し、剖検したところ、脳には異常PrP蓄積はなかったものの、脾

臓に異常PrPの蓄積を認められた。興味深いことには、発症前であったと考えられるこの患者のPrP遺伝子コドン129多型はMVのヘテロ接合体であった。

これらのことから、英国で人口の約五〇%を占めるMVを有するサブグループは、BSEからの直接感染あるいは輸血による二次感染に曝露された後、MMホモ接合体とは異なる非常に長い潜伏期間を経て発症してくる可能性があること、これらの発症前の患者が献血などによって医原性感染を起こす危険性があることなどの問題が提起されている。

〔文 献〕

- 1) Palmer MS, Dryden AJ, Hughes T, et al: Nature 352: 340, 1991.
- 2) Doh-ura K, Kitamoto T, Sakaki Y, et al: Nature 353: 801, 1991.
- 3) Brown P, Preece M, Brandel J-P, et al: Neurology 55: 1075, 2000.
- 4) The UK National Creutzfeldt-Jakob Disease Surveillance Unit. <http://www.gjd.ac.uk/elevnth/rep2002.htm>
- 5) Peden AH, Head MW, Ritchie D, et al: Lancet 364: 527, 2004.

金沢 大 学 院 山田正仁
 脳老化・神経病態学教授



Research report

Brain pericytes contribute to the induction and up-regulation of blood–brain barrier functions through transforming growth factor- β production

Shinya Dohgu^a, Fuyuko Takata^a, Atsushi Yamauchi^a, Shinsuke Nakagawa^b,
Takashi Egawa^a, Mikihiko Naito^c, Takashi Tsuruo^c, Yasufumi Sawada^d,
Masami Niwa^b, Yasufumi Kataoka^{a,*}

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

^bDepartment of Pharmacology 1, Graduate School of Medicine, Nagasaki University, 1-12-4 Sakamoto, Nagasaki 852-8523, Japan

^cInstitute of Molecular and Cellular Biosciences, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032, Japan

^dDepartment of Medico-Pharmaceutical Sciences, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan

Accepted 10 January 2005

Abstract

The blood–brain barrier (BBB) is a highly organized multicellular complex consisting of an endothelium, brain pericytes and astrocytes. The present study was aimed at evaluating the role of brain pericytes in the induction and maintenance of BBB functions and involvement of transforming growth factor- β (TGF- β) in the functional properties of pericytes. We used an *in vitro* BBB model established by coculturing immortalized mouse brain capillary endothelial (MBEC4) cells with a primary culture of rat brain pericytes. The coculture with rat pericytes significantly decreased the permeability to sodium fluorescein and the accumulation of rhodamine 123 in MBEC4 cells, suggesting that brain pericytes induce and up-regulate the BBB functions. Rat brain pericytes expressed TGF- β 1 mRNA. The pericyte-induced enhancement of BBB functions was significantly inhibited when cells were treated with anti-TGF- β 1 antibody (10 μ g/ml) or a TGF- β type I receptor antagonist (SB431542) (10 μ M) for 12 h. In MBEC4 monolayers, a 12 h exposure to TGF- β 1 (1 ng/ml) significantly facilitated the BBB functions, this facilitation being blocked by SB431542. These findings suggest that brain pericytes contribute to the up-regulation of BBB functions through continuous TGF- β production.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Theme: Cellular and molecular biology

Topic: Blood–brain barrier

Keywords: Blood–brain barrier; Pericyte; Transforming growth factor- β ; P-glycoprotein; Permeability; Mouse brain endothelial cell

1. Introduction

The blood–brain barrier (BBB) is highly restrictive of the transport of substances between blood and the central nervous system. The BBB is a complex system of different cellular components including brain microvascular endo-

thelial cells, pericytes and astrocytes. Astrocytes induce and maintain the properties of the BBB including the integration of tight junctions and expression of P-glycoprotein (P-gp) through cell-to-cell contact and the secretion of soluble factors [23]. Brain pericytes are important for control of the growth and migration of endothelial cells and the integrity of microvascular capillaries [22]. Such functions are known to be mediated by transforming growth factor- β (TGF- β) [1,21,25], vascular endothelial growth factor (VEGF)

* Corresponding author. Fax: +81 92 862 2696.

E-mail address: ykataoka@cis.fukuoka-u.ac.jp (Y. Kataoka).

[14,17] and direct cell-to-cell communications. Pericytes have several apparatuses to directly make contact with endothelial cells: gap junctions, adhesion plaques and peg-and-socket junctions [24]. Soluble factors including TGF- β , VEGF and basic fibroblast growth factor (bFGF) were produced by and released from pericytes [2,24]. These growth factors control the permeability of the BBB [8,26,31]. These evidences indicate that pericytes regulate the brain's endothelial barrier by collaborating with astrocytes.

TGF- β , a family of multifunctional peptide growth factors, has several isoforms (TGF- β 1, 2, 3, 4 and 5), shares the same structure (65–80% homology) and displays similar biological activity *in vitro* [11]. TGF- β acts on two highly conserved single transmembrane receptors with an intracellular serine/threonine kinase domain (TGF- β type I and type II receptors) to activate an intracellular signaling system, such as Smad proteins or the p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and the extracellular signal-regulated kinase pathway [6]. TGF- β is listed as a potent endogenous substance protecting against neurodegenerative diseases of the central nervous system [11].

Recently, brain pericytes were reported to induce occludin and multidrug resistance-associated protein (MRP) 6 mRNA expression in brain endothelial cells [3,15]. As for BBB functions, brain pericytes reduce the endothelial permeability of the brain [13]. However, little is known about the mechanism behind the facilitatory role of brain pericytes in the induction and maintenance of BBB functions. The aim of this study was to clarify whether TGF- β participates in the pericyte-induced regulation of BBB functions. We made an *in vitro* model of the BBB by coculturing immortalized mouse brain capillary endothelial (MBEC4) cells with rat brain pericytes. MBEC4 cells are known to have the highly specialized characteristics of brain microvascular endothelial cells including the expression of P-gp [28,29]. BBB functions were assessed based on the permeability coefficient of sodium fluorescein (Na-F) and the cellular accumulation of rhodamine 123 in MBEC4 cells as the paracellular permeability of brain endothelial cells and the functional activity of P-gp, respectively.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Wistar rats aged 2 weeks old were housed in a room at a temperature of 22 ± 2 °C under a 12-h light/dark schedule (lights on at 7:00 h) and given water and food *ad libitum*. All the procedures involving experimental animals adhered to the law (No. 105) and notification (No.6) of the Japanese Government and were approved by the Laboratory Animal Care and Use Committee of Fukuoka University.

2.2. MBEC4 cell culture

MBEC4 cells, which were isolated from BALB/c mouse brain cortices and immortalized by SV40-transformation [28], were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 units/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin at 37 °C with a humidified atmosphere of 5% CO₂/95% air. They were seeded on 12-well Transwell®-Clear inserts (Costar, MA) and 24-well culture plates (BD FALCON™, BD Biosciences, NJ) at a density of 42,000 cells/insert and 21,000 cells/well, respectively.

2.3. Primary culture of rat pericytes

Rat cerebral pericytes were isolated according to the method of Hayashi et al. [13]. Pure cultures of rat cerebral pericytes were obtained by prolonged culture of isolated brain microvessel fragments under selective culture conditions because microvessel fragments contain 23% pericytes [27]. The cerebral cortices from 2-week-old Wistar rats were cleaned of meninges and minced. The homogenate was digested with collagenase CLS2 (1 mg/ml; Worthington, Lakewood, NJ) and DNase I (37.5 μ g/ml; Sigma, St. Louis, MO) in DMEM (Sigma) containing 100 units/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 50 mg/ml gentamicin and 2 mM glutamine at 37 °C for 1.5 h. Neurons and glial cells were removed by centrifugation in 20% bovine serum albumin (BSA)-DMEM (1000 \times g for 20 min). The microvessels obtained in the pellet were further digested with collagenase/dispase (1 mg/ml; Roche, Mannheim, Germany) and DNase I (16.7 μ g/ml) in DMEM at 37 °C for 1 h. Microvessel endothelial cell clusters were separated by 33% Percoll (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) gradient centrifugation (1000 \times g for 10 min). The obtained microvessel fragments were washed twice in DMEM (first 1000 \times g for 8 min, then, 700 \times g for 5 min) and placed in uncoated culture flasks in DMEM supplemented with 10% FBS, 100 units/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin at 37 °C with a humidified atmosphere of 5% CO₂/95% air. After 14 days in culture, rat pericytes overgrew brain endothelial cells and reached typically 80–90% confluency. The cells were used at passages 2–3.

2.4. Preparation of three *in vitro* BBB models

The preparation of the *in vitro* BBB models was previously described [7]. In brief, rat pericytes (40,000 cells/cm²) were first cultured on the outside of the collagen-coated polyester membrane (1.0 cm², 0.4 μ m pore size) of a Transwell®-Clear insert (12-well type, Costar) directed upside down in the well. Two days later, MBEC4 cells (42,000 cells/cm²) were seeded on the inside of the insert placed in the well of a 12-well culture plate (Costar) (the

opposite coculture system). In the other (bottom coculture) system, rat pericytes (20,000 cells/cm²) were first cultured in the wells of the 12-well culture plate. After 2 days, MBEC4 cells were seeded on the inside of a Transwell®-Clear insert placed in the plate containing layers of rat pericytes. A monolayer system was also made with MBEC4 cells alone (MBEC4 monolayer).

2.5. Paracellular transport of Na-F

To initiate the transport experiments, the medium was removed and MBEC4 cells were washed three times with Krebs–Ringer buffer (118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, 1.0 mM NaH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃ and 11 mM D-glucose, pH 7.4). Krebs–Ringer buffer (1.5 ml) was added to the outside of the insert (abluminal side). Krebs–Ringer buffer (0.5 ml) containing 100 µg/ml of Na-F (MW 376) (Sigma) was loaded on the luminal side of the insert. Samples (0.5 ml) were removed from the abluminal chamber at 30, 60, 90 and 120 min and immediately replaced with fresh Krebs–Ringer buffer. Aliquots (5 µl) of the abluminal medium were mixed with 200 µl of Krebs–Ringer buffer and then the concentration of Na-F was determined with a CytoFluor Series 4000 fluorescence multiwell plate reader (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA) using a fluorescein filter pair (Ex(λ) 485 ± 10 nm; Em(λ) 530 ± 12.5 nm). The permeability coefficient and clearance were calculated according to the method described by Dehouck et al. [5]. Clearance was expressed as microliters (µl) of tracer diffusing from the luminal to abluminal chamber and was calculated from the initial concentration of tracer in the luminal chamber and final concentration in the abluminal chamber: Clearance (µl) = $[C]_A \times V_A / [C]_L$, where $[C]_L$ is the initial luminal tracer concentration, $[C]_A$ is the abluminal tracer concentration and V_A is the volume of the abluminal chamber. During a 120-min period of the experiment, the clearance volume increased linearly with time. The average volume cleared was plotted versus time, and the slope was estimated by linear regression analysis. The slope of clearance curves for the MBEC4 monolayer or coculture systems was denoted by PS_{app}, where PS is the permeability-surface area product (in µl/min). The slope of the clearance curve with a control membrane was denoted by PS_{membrane}. In the rat pericyte opposite coculture system, the control membrane is the rat pericyte-layered membrane. The real PS value for the MBEC4 monolayer and the coculture system (PS_{trans}) was calculated from $1/PS_{app} = 1/PS_{membrane} + 1/PS_{trans}$. The PS_{trans} values were divided by the surface area of the Transwell inserts to generate the permeability coefficient (P_{trans}, in cm/min).

2.6. Functional activity of P-gp

The functional activity of P-gp was determined by measuring the cellular accumulation of rhodamine 123

(Sigma) according to the method of Fontaine et al. [12]. MBEC4 cells were washed three times with assay buffer (143 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, 1.0 mM NaH₂PO₄, 10 mM HEPES and 11 mM D-glucose, pH 7.4). In rat pericyte coculture systems, rat pericytes on the outside of the membrane were removed with a cell scraper. MBEC4 cells were incubated with 0.5 ml of assay buffer containing 5 µM of rhodamine 123 for 60 min. Then, the solution was removed and the cells were washed three times with ice-cold phosphate-buffered saline and solubilized in 1 M NaOH (0.2 ml). Aliquots (5 µl) of the cell solution were removed for measurement of cellular protein according to the method of Bradford [4] using a Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). The remaining solution was neutralized with 1 M HCl and the rhodamine 123 content was determined with a CytoFluor Series 4000 fluorescence multiwell plate reader (PerSeptive Biosystems) using a fluorescein filter pair (Ex(λ) 485 ± 10 nm; Em(λ) 530 ± 12.5 nm).

2.7. Detection of TGF-β1 mRNA

Total RNA from rat pericytes was extracted using TRIzol™ reagent (Invitrogen). The primer pair used in the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was designed based on the nucleotide sequence of the rat TGF-β1 and rat GAPDH. The sequences of primers were as follows: the upper primer 5'-ATACGCCTGAGTGGCTGTCT-3' and the lower primer 5'-TGGGACTGATCCCATGATT-3' for TGF-β1; the upper primer 5'-CTACCCACGGCAAGTTCAAT-3' and the lower primer 5'-GGATGCAGGGATGATGTTCT-3' for GAPDH. The expected sizes of the RT-PCR products, predicted from the positions of the primers, were 153 bp for TGF-β1 and 479 bp for GAPDH. A SuperScript One-Step RT-PCR system (Invitrogen) was used for reverse transcription of RNA, and TGF-β1 cDNA was amplified by PCR. Amplification was performed in a DNA thermal cycler (PC707; ASTEC, Fukuoka, Japan) according to the following protocol: cDNA synthesis for 30 min at 50 °C, pre-denaturation for 5 min at 94 °C; 25 cycles of denaturation for 30 s at 94 °C, primer annealing for 30 s at 57 °C and polymerization for 30 s at 72 °C; and a final extension for 5 min at 72 °C. Each 10 µl of PCR product was analyzed by electrophoresis on a 3% agarose (Sigma) gel with ethidium bromide staining. The gels were visualized on a UV light transilluminator and photographed using a DC290 Zoom digital camera (Kodak, Rochester, New York).

2.8. Effects of the modulation of TGF-β1 signaling on BBB functions

A TGF-β type I receptor antagonist, SB431542 (TOCRIS, Bristol, UK), and human TGF-β1 (Sigma) were first dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) and 4 mM HCl