

- 4) 原田祐嗣, 石井一弘, 亀高諭, 亀谷富由樹, 庄司進一, 斉藤祐子, 村山繁雄, 玉岡晃: ヒト脳における Beta-site APP-cleaving enzyme 1 (BACE-1) 抗体の解析: アルツハイマー病と対照脳の比較検討. 第23回日本痴呆学会、東京、9月29-30日、2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

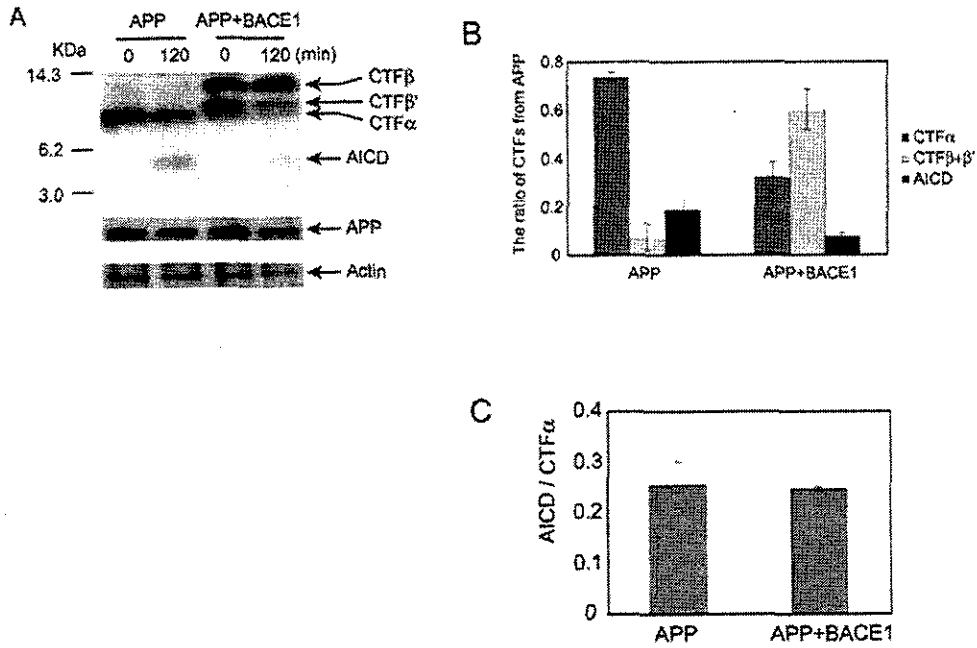


Figure 1. APP および APP と BACE1 を共発現させた COS-1 細胞の膜分画を用いた *in vitro* での AICD 産生

(A) 電気泳動およびイムノブロットによる比較。(B) 産生された各 APPC 末断片の割合の比較。(C) AICD/CTFα の割合の比較。AICD の産生が CTFα と密接に関連していることを示している。

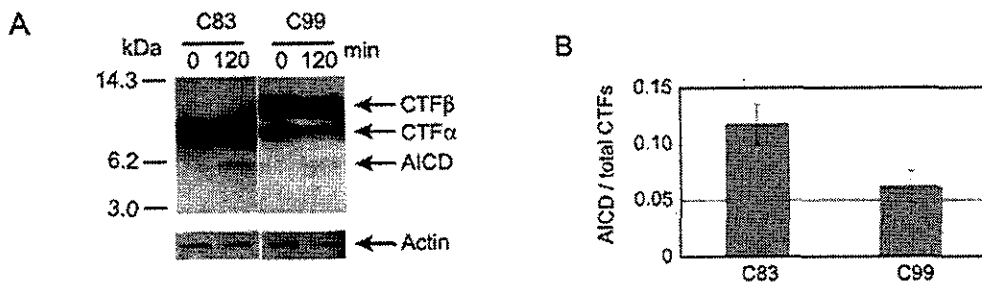


Figure 2. C83 および C99 を発現させた COS-1 細胞の膜分画を用いた *in vitro* での AICD 産生
 (A) 電気泳動およびイムノブロットによる比較。(B) 産生された AICD の割合の比較。AICD の産生が C83 (CTFα) と密接に関連し、C99(CTFβ) を発現した細胞では AICD の産生が減少する。

Table 1 同定された Aβ 関連ペプチド

TIC	MWc	MWo	Numbering	Amino acid sequence
Wild				
1.4e6	1886.0	1887.8	21-40	AEDVGSNKGAIIGLMVGGVV
2.1e6	3463.6	3463.3	19-52	FAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIATVIVITLVM*L
C83				
3.5e7	1886.0	1885.7	21-40	AEDVGSNKGAIIGLMVGGVV
3.5e7	2825.6	2828.1	21-49	AEDVGSNKGAIIGLM*VGGVVIATVIVITL
C99				
9.5e5	1511.9	1512.6	27-42	NKGAIIGLMVGGVIA
3.5e6	1776.2	1778.6	23-43	DVGSNKGAIIGLM*VGGVVIAT
5.7e7	2724.6	2722.2	23-50	DVGSNKGAIIGLM*VGGVVIATVIVITLV
5.7e7	1814.9	1815.1	22-40	EDVGSNKGAIIGLMVGGVV
8.9e6	1687.8	1689.1	21-38	AEDVGSNKGAIIGLMVGG
3.5e7	1886.0	1883.9	21-40	AEDVGSNKGAIIGLMVGGVV
5.9e6	1902.0	1902.4	21-40	AEDVGSNKGAIIGLM*VGGVV
9.7e5	2498.4	2497.1	21-46	AEDVGSNKGAIIGLM*VGGVVIATVIV
3.5e7	2825.6	2825.3	21-49	AEDVGSNKGAIIGLM*VGGVVIATVIVITL
3.5e6	1778.0	1778.6	20-37	FAEDVGSNKGAIIGLMVG
5.0e6	1834.9	1834.1	20-38	FAEDVGSNKGAIIGLMVGG
8.8e5	3818.2	3816.8	16-52	KLVFFAEDVGSNKGAIIGLM*VGGVVIATVIVITLVM*L
1.1e6	3672.8	3673.7	1-33	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIG
2.6e6	4130.0	4130.7	1-38	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG
Human brain				
2.1e6	2856.6	2855.1	22-50	EDVGSNKGAIIGLM*VGGVVIATVIVITLV
8.5e5	2791.3	2791.9	17-44	LVFFAEDVGSNKGAIIGLM*VGGVVIATV

TIC: total ion current, M*: oxidized Met

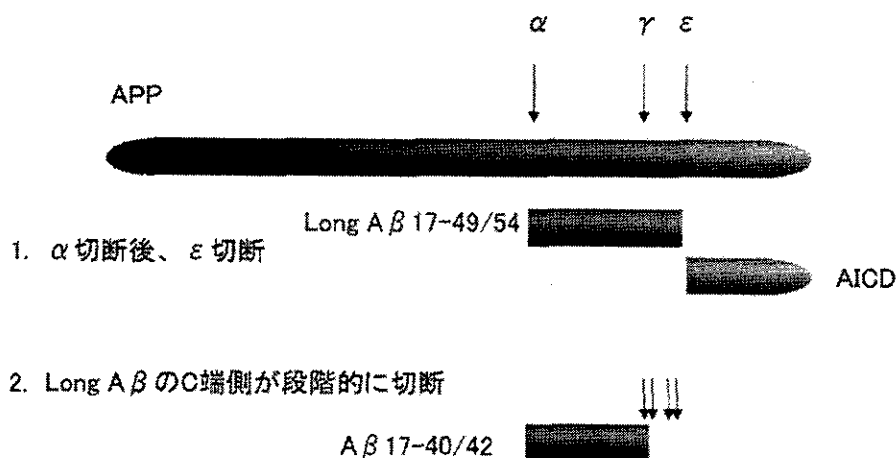


Figure 3. Aβ17-40/42 産生時の推定される APP のプロセッシング機序
α切断の後、ε切断が起こり、生じた longAβ の C 末側のアミノ酸が段階的に切断され γ 部位に至ると考えられた。

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班 分担研究報告書

Alzheimer 型痴呆および変性型痴呆性疾患の β アミロイド関連生物学的マーカーの研究 — 脳脊髄液、血小板 BACE1

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 アルツハイマー病(AD)の新しい診断マーカーとしてアミロイド前駆体蛋白の β セクレターゼ (BACE1) の脳脊髄液および血小板における蛋白量・酵素活性の測定の有用性を検討した。いずれも AD 患者検体での値は、正常コントロールと比較して有意差は確認されなかったが、治療効果の判定などに使用できる可能性がある。今後、測定法法の改良と多数例での検討が必要である。

A. 研究目的

アルツハイマー病(AD)の診断マーカーでこれまで有用性が確認されているものは脳脊髄液中(CSF)の β アミロイド ($A\beta$) と tau 蛋白およびリン酸化 tau 蛋白であるが、検体採取に伴う侵襲性の問題と治療効果判定における有用性に関する問題がある。我々はこれらの問題に対して新しく AD 治療のターゲットのひとつである β セクレターゼ (BACE1) の臨床検体における蛋白量・酵素活性の測定の有用性を検討した。

B. 研究方法

対象と方法: 脳脊髄液(CSF)は、AD 15例 (51-80歳、平均67歳、MMSE score 0-24、平均18.8) と、痴呆のないALS15例 (52-72歳、平均68.2歳)、年齢相関させた非痴呆正常コントロール10例から採取した-80°C凍結保存検体を用いた。

血小板については、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、アルツハイマー病(AD)患者 12例 (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例 (50-78歳、平均67.2歳) の非痴呆コントロールから採血。EDTA採血の全血 9ml に buffer A (38mmol/l citric acid、75mmol/l trisodium citric acid、136mmol/l 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、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°C20秒のsonicationを行ったものを試料とした。いずれも文書による説明と同意を得て検体を採取した。

1. CSF および血小板の BACE1 の存在を確認するために、CSF 500 μ l を用いて免疫を行った。血小板については血小板試料の蛋白量 5 μ g 分を western blot で分析した。

2. BACE1 蛋白量測定は、固相に抗BACE1 C端抗体-MAB5308(Chemicon,CA)をコート、検出用抗体は抗 BACE 46-65 抗体 (Calbiochem,CA) を用いた sandwich ELISA法を用いた。二次抗体にHRP標識抗rabbit IgG抗体を用い、HRP基質で発光させ蛍光プレートリーダーにより測定した (excitation 320nm、emission 400nm)。CSFは50 μ l、血小板試料は蛋白量 μ をこのELISA系で測定した。

3. BACE1 酵素活性は、ELISA 同様の方法で固相に capture した BACE1 に、protease cleavage により発光する APP 基質 (APPsw(H-RE(EDANS)EVNLDAKEFK(DABCYL)R-OH) (Calbiochem,CA)10 μ mol/L を12時間37°Cで作用させ、蛍光プレートリーダーを用いて355nm 波長で励起、510nm 波長を測定した (excitation 355nm、emission 510nm)。CSFは50 μ l、血小板試料は蛋白量 20 μ g をこの系で測定した

C. 研究結果

CSFの免疫沈降試料、血小板試料のwestern blotで脳から調整したBACE1と同位置(50、55kD)のバンドを確認した(図2)。

a. BACE1蛋白量:今回用いたELISA系は、非痴呆コントロール(ALS)脳のBACE1を含む抽出物をstandardとしたところ、検出限界は0.001wt/volで、recombinant BACE1のwestern blot band densityで換算すると約200pg/mlであった。測定したCSF BACE1蛋白レベル(測定限界付近で参考値)は結果としてAD、ALS、NCの各群間で統計的有意差は認めなかった。また、血小板 BACE1蛋白レベルも同様に有意差を認めなかった(NC群に対して $p=0.40$)。図の測定値は群間比較のために便宜上、発光測定量を用いた相対値で表した(図3)。

b. BACE1 酵素活性:CSF BACE1 活性はAD群で対NC群比109.8%とAD群でやや高値であったが、有意差は認めなかった(NC群に対して $p=0.12$ 。ALS群に対して $p=0.10$)。血小板 BACE1も同様にAD群で対NC群比114%であったが、統計的有意差は認めなかった(NC群に対して $p=0.36$)。また酵素活性/蛋白量比にも同様に有意差は認めなかった。

D. 考察

ADの生物学的診断マーカーとしては、CSF tau蛋白、CSFリン酸化tau蛋白、CSF A β が高い診断感度、特異性を持つことが多くの施設で確認されている。一方、診断補助目的のみならず、診断マーカーの役割としては病態の変化を検出できるものが望ましい。AD治療のターゲットとしてはA β およびA β 関連物質が最重要と考えられ、それらの変化を反映するマーカーが望ましいが、その要求を満たすマーカーはまだ確認されていない。また、繰り返しの採取を行える低侵襲性の臨床検体が望ましく、CSFはその点で問題がある。これらの点から新しいマーカーを探索するために今回の検討を行った。

BACE1はAPPを基質とするアスパラギン酸プロテアーゼであり、その働き(β 切断)は結果として、ADの病態に重要なA β の産生を促す方向に働くため、AD治療のターゲットとして注目されている。BACE1は弧発性ADの大脳皮質で蛋白量、酵素活性が増加していると報告されている。また、Holsingerら(Ann Neurol 2004;55:898)はADのCSF中

でのBACE1活性の増加を報告しており、診断・治療マーカーとしての可能性を報告している。一方で、血液マーカーに関しては、Baskinら、DiLucaら(Neurology 2004;62:498)は血小板APPがAD発症と関連して変化することを報告しており、その病態は不明としながらも、血小板には脳におけると同様に α 、 β 、 γ セクレターゼ活性の存在があることから、それらの脳と関連した変化によると推測している。

今回、我々はFukumotoら(Arch Neurol 2002 ; 59:1381)に準じたBACE1蛋白量および酵素活性のassay系を用いた。この酵素活性測定方法は、固相にcaptureしたBACE1にAPP基質を作用させることから、組織および体液中に存在するAPPを基質とする他の酵素の影響を排除できる特徴を持っている。今回、まずAD2例およびコントロール6例の凍結脳を用いて各測定系の性能を検討した。ここでは、これまでに報告されるAD脳でのBACE1の変化は確認できなかったが、これは例数の少なさとその保存状態の問題が考えられた。

AD患者のCSFにおいては、BACE1の存在は認められ、ADで酵素活性が高値をとる例が多かったが、コントロールと比較しての統計的有意差は認めなかった。これは、ADにおける神経細胞でのBACE1変化が、神経細胞の減少、細胞外での分解などにより臨床検体として採取したCSFには十分に反映されない可能性が考えられた。

一方、血小板試料では、western blotで脳、CSFと同様のバンドを認めたが、BACE1蛋白量および酵素活性はADでの変化は認めず、診断に関する有用性は確認できなかった。しかし、BACE1阻害治療を導入した場合の作用判定を行える臨床検体になりうる可能性があると考えられる。今後さらに測定系の改良、多数例での検討などを進める予定である。

E. 結論

新しいA β 関連のAD診断およびsurrogateマーカーを検討した。昨年度報告した血小板APP組成変化に加えて、今年度は、最近報告されたCSF BACE1、また、今回始めて検討した血小板BACE1を検討したが、いずれもADでの変化が確認できなかった。しかし、特に血小板は検体採

取も容易であり、現在各施設で開発中である BACE1 阻害薬が AD 治療へ導入される場合に効果確認のために利用できる可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) Kuzuhara S, Saito Y, Murayama S: Cotton-wool plaques, plaque-like angiopathy. Neurofibrillary

tangles and leukoencephalopathy in a Japanese man who clinically presented with Binswanger's disease. The 9th international conference of Alzheimer's disease and related disorders. Philadelphia. July 20, 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

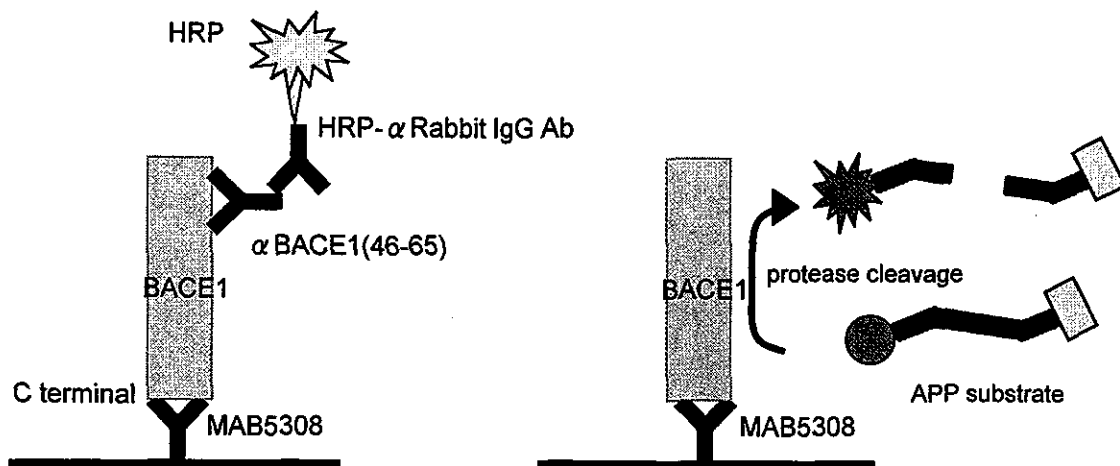


図1: BACE1 protein ELISA (左) と BACE1 activity assay (右)

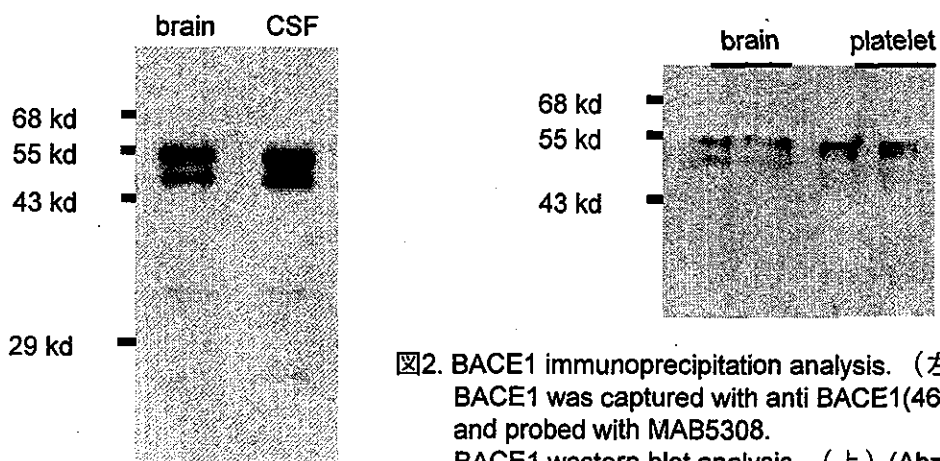


図2. BACE1 immunoprecipitation analysis. (左)
 BACE1 was captured with anti BACE1(46-65)Ab and probed with MAB5308.
 BACE1 western blot analysis. (上) (Ab=MAB5308)

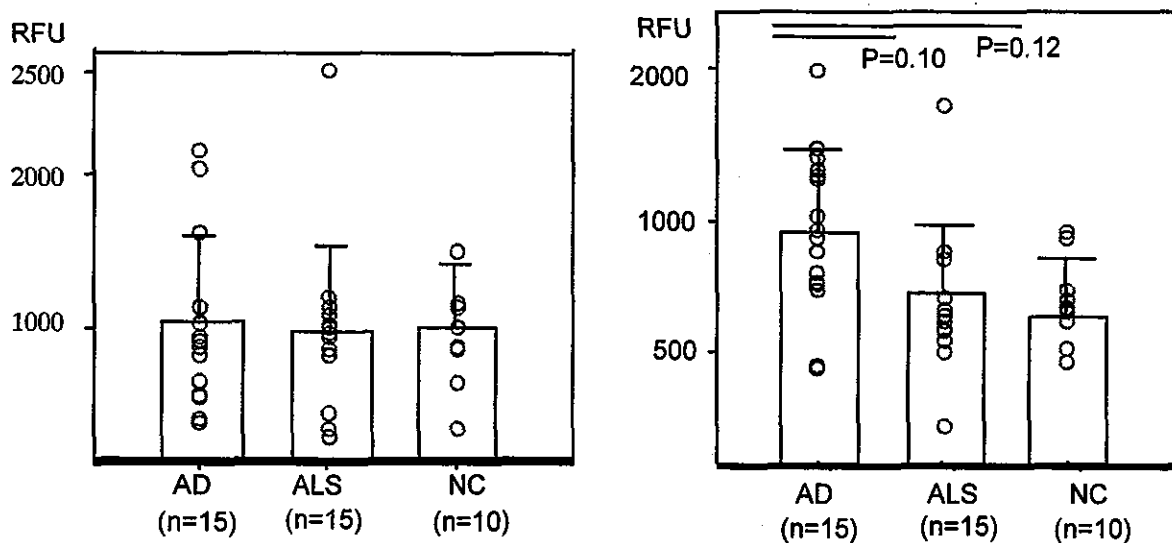


図3: CSF BACE1 protein level (左) と CSF BACE1 activity (右)

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班 分担研究報告書

アルツハイマー病 β アミロイド線維形成阻害・分解薬の開発 および脳アミロイドアンギオパチーに関する研究

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 小野賢二郎*、浜口 毅*、廣畑美枝*、吉田光宏*、内木宏延**、
 長谷川一浩**、高島明彦***、吉池裕二***、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)、**福井大学医学部病因病態医学講座・分子病理学領域、***理化学研究所脳科学総合研究センター、****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 アルツハイマー病 (AD) や脳アミロイドアンギオパチー (CAA)の主病態である β アミロイド ($A\beta$) 沈着に対し、 $A\beta$ 凝集阻害あるいは凝集した $A\beta$ を分解する薬剤の開発、CAAの危険因子の探索、わが国におけるCAAおよびCAAに関連する病態である中枢神経系限局性血管炎 (IACNS) の疫学調査を行った。その結果以下のことが明らかになった：(1) $A\beta$ 凝集阻害・分解薬開発：チオフラビン T 法、電頭を用いた試験管内実験系で、ニコチン、赤ワイン関連ポリフェノール、クルクミン、ローズマリー酸、タンニン酸は、 $A\beta$ 線維 (f $A\beta$) 形成・伸長を抑制し、既存のf $A\beta$ を不安定化させた。f $A\beta$ の細胞毒性はポリフェノールに分解されることにより軽減した。これらはADやCAAの予防・治療薬開発に向け、有力な基本分子となる可能性がある；(2)CAAの危険因子：高齢者167剖検例を検討し、ネプリライシンおよびTGF- β 1遺伝子多型がCAAの程度と関連することを見出した。高度のCAAが病理学的に証明された57例において、脳出血群は非出血群と比べ、皮質の微小出血や小梗塞が有意に高率にみられた。これらの遺伝子検索やMRI上の小病変の検出は、CAAの存在やCAA関連脳出血の発症を予測するマーカーになる可能性がある；(3)CAA全国調査：CAA関連脳出血およびIACNSの診断基準を作成し、第一次全国調査を行い、CAA関連脳出血のべ755例、CAAに関連する他の病態（白質脳症、痴呆他）21例、IACNS64例を見出した。現在第二次全国調査を推進中である。

A. 研究目的

β アミロイド ($A\beta$) 沈着はアルツハイマー病 (AD) や脳アミロイドアンギオパチー (CAA) の主病態である。本研究は、(1) $A\beta$ 凝集阻害あるいは凝集した $A\beta$ を分解する薬剤の開発、(2)CAAの危険因子の探索、(3)わが国におけるCAAおよびCAAに関連する病態である中枢神経系限局性血管炎 (IACNS) の疫学病態の解明を目的とした。

B. 研究方法

(1) $A\beta$ 凝集阻害・分解薬開発：チオフラビン T 法、電頭を用いた試験管内実験系において、ニコチン、赤ワイン関連ポリフェノール、クルクミン、ローズマリー酸、タンニン酸の、 $A\beta$ 線維 (f $A\beta$) 形成・伸長、既存のf $A\beta$ への影響を検討した。さらに、ポリフェノールにより分解されたf $A\beta$ の細胞毒性の変化を検討した。

- (2) CAA の危険因子: 高齢者 167 剖検例において、ネプリライシンおよび TGF- β 1 遺伝子多型と CAA の程度との関連を検討した。さらに、高度の CAA が病理学的に証明された 57 例において、脳出血群と非出血群を比較し、CAA 関連脳出血に関わる因子について検討した。
- (3) CAA 全国調査: 平成 15 年度、CAA 関連脳出血および IACNS の診断基準を作成し、第一次全国調査を行った。さらに、その結果に基づき、平成 16 年度、第二次全国調査を計画、開始した。

(倫理面の配慮) 研究は遺伝子解析研究に関する倫理指針あるいは疫学研究に関する倫理指針に基づき、金沢大学の倫理審査委員会の審査、承認を得た上でを行った。

C. 研究結果

- (1) A β 凝集阻害・分解薬開発: ニコチン、赤ワイン関連ポリフェノール、クルクミン、ローズマリー酸、タンニン酸は、fA β 形成・伸長を抑制し、既存の fA β を不安定化させた。さらに、ポリフェノールにより分解された fA β の細胞毒性は軽減した。
- (2) CAA の危険因子: ネプリライシンおよび TGF- β 1 遺伝子多型が CAA の程度と関連した。TGF- β 1 遺伝子多型は非 AD 患者およびアポリポ蛋白 E (ApoE) E4 の非保持者において CAA と強い関連を示した。高度の CAA を有する症例群において、脳出血例は非出血例と比べ、皮質の微小出血や小梗塞が有意に高率にみられたが、白質脳症には有意差がなかった。
- (3) CAA 全国調査: 『CAA に関連する脳出血の診断基準』および『IACNS の診断基準』を作成し第一次全国調査を行った結果、418 施設の 481 部門より回答を得た (回答率 34.9%: 精度 5%、推定の信頼率 99%を確保)。CAA 関連脳出血の経験は 164 部門あり、のべ患者数は 755 例であった。CAA に関連する脳出血以外の病態は 6 部門で 21 例 [内訳: 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%)、IACNS 2 例 (9.5%)、不明 2 例 (9.5%)、IACNS

の経験は、47 部門、64 症例 [うち CAA 合併 2 例 (3%)] であった。この結果に基づき、さらに詳細を明らかにするため、第 2 次全国調査を実施中である。

D. 考察

A β 凝集阻害・分解薬開発を目的とした一連の研究により、ニコチン、赤ワイン関連ポリフェノール、クルクミン、ローズマリー酸、タンニン酸が、A β 線維 (fA β) 形成・伸長を抑制するばかりでなく、既存の fA β を不安定化させること、fA β の細胞毒性はポリフェノールに分解されることにより軽減することなどが明らかになった。これらは AD や CAA の予防・治療薬開発に向け、有力な基本分子となる可能性があり、現在、遺伝子改変 AD 動物モデルを用いた予防・治療実験が進行している。

CAA の大多数を占める高齢者の孤発性 CAA については、AD が強力な危険因子であり、AD の危険因子である ApoE E4 が CAA のリスクでもあることが報告されている。本研究では、ネプリライシンおよび TGF- β 1 遺伝子多型が CAA の程度と関連することを見出した。興味深いことには、TGF- β 1 遺伝子多型は非 AD 患者およびアポリポ蛋白 E (ApoE) E4 の非保持者において CAA と強く関連し、これらの患者における CAA のリスク診断に有用である可能性がある。高度の CAA が病理学的に証明された患者群において、脳出血例は非出血例と比べ、皮質の微小出血や小梗塞が有意に高率にみられ、これらの小病変の MRI 等による検出は、CAA 関連脳出血の発症を予測するマーカーと考えられる。

CAA および 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、わが国ではもちろん初めてであり、世界的にみても類例がない。CAA 関連脳出血のべ 755 例、CAA に関連する他の病態 (白質脳症、痴呆他) 21 例、IACNS 64 例を見出され、CAA 関連脳出血や IACNS が全国に広く存在していることが明らかになった。その結果をもとに、現在、第二次全国調査を推進し、臨床症候、検査所見等の詳細を検討中である。

E. 結論

- (1) ニコチン、赤ワイン関連ポリフェノール、クルクミン、ローズマリー酸、タンニン酸は A β 線維 (fA β) 形成・伸長を抑制、既存の fA β を不安定化し、fA β の細胞毒性を軽減する。
- (2) ネプリライシンおよび TGF- β 1 遺伝子多型は CAA と関連し、CAA 関連脳出血群は非出血群と較べ皮質微小出血や小梗塞が有意に高率である。
- (3) CAA および IACNS の全国調査を初めて実施し、CAA 関連脳出血 755 例、他の CAA 関連病態 (白質脳症、痴呆他) 21 例、IACNS 64 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) 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* 75:742-750, 2004.
- 2) Ono K, Yoshiike Y, Takashima A, Hasegawa K, Naiki H, Yamada M. Vitamin A exhibits potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects in vitro. *Exp Neurol* 189:380-392, 2004.
- 3) Ono K, Hasegawa K, Naiki H, Yamada M. Anti-amyloidogenic activity of tannic acid and its activity to destabilize Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. *Biochim Biophys Acta (Molecular Basis of Disease)* 1690:193-202, 2004.
- 4) 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- α 1 gene with cerebral amyloid angiopathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* (In Press)
- 5) Yamada M: Cerebral amyloid angiopathy and gene polymorphisms. *J Neurol Sci* 226:41-44, 2004.
- 6) Nicoll JA, Yamada M, Frackowiak J, Mazur-Kolecka B, Weller RO. Cerebral amyloid angiopathy plays a direct role in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 25:589-597, 2004.
- 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.
- 8) 浜口 毅、山田正仁：脳アミロイドアンギオパチーと遺伝子。 *分子脳血管病* 3:155-162, 2004.
- 9) 山田正仁：痴呆症学(3)。脳アミロイドアンギオパチー。 *日本臨床* 62 (増刊号 4) :167-173, 2004.

2. 学会発表

- 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. The 9th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders. Philadelphia, July 17-22, 2004
- 2) 小野賢二郎、吉池裕二、高島明彦、長谷川一浩、内木宏延、山田正仁：赤ワイン関連ポリフェノールのアルツハイマー病 β アミロイド線維の分解作用、第 45 回日本神経学会総会、東京、2004.5.11-14
- 3) 小野賢二郎、吉池裕二、高島明彦、長谷川一浩、内木宏延、山田正仁：赤ワイン関連ポリフェノールのアルツハイマー病 β アミロイド線維に対する分解作用、第 27 回日本神経科学会・第 47 回日本神経化学会合同大会、大阪、2004.9.21-23
- 4) 小野賢二郎、長谷川一浩、内木宏延、山田正仁：クルクミンはアルツハイマー病 β アミロイド線維を強力に分解する、第 23 回日本痴呆学会、東京、2004.9.29-30

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

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班 分担研究報告書

アルツハイマー病の危険因子とアミロイドβ蛋白および酸化ストレスについて - モデル動物を用いた検討 -

分担研究者 玉岡 晃 筑波大学大学院人間総合科学研究科臨床医学系神経内科

共同研究者 原田祐嗣*、松野佐好子*、石井一弘*、庄司進一*、永田博司**、
星野 茂***、貫名信行****、藤田 忍*****

*筑波大学大学院人間総合科学研究科臨床医学系神経内科、

茨城県立医療大学神経内科、*日本医科大学脳神経外科、

****理化学研究所、*****三菱化学生命科学研究所

研究要旨 孤発性アルツハイマー病の危険因子として知られている脳虚血、頭部外傷、アポリポ蛋白 E4 が如何にしてアルツハイマー病を発症させるかを、モデル動物を用いてアミロイドβ蛋白や酸化ストレスの観点から検討した。脳虚血や頭部外傷は脳内アミロイドβ蛋白の沈着を促進することによってアルツハイマー病の危険因子となっている可能性が示唆された。

A. 研究目的

脳虚血、頭部外傷、アポリポ蛋白 E (APOE) が如何にして孤発性アルツハイマー病 (AD) の危険因子となるかに関して、それぞれのモデル動物を用いてアミロイドβ蛋白 (Aβ) と酸化ストレスの観点から解析した。

(APOE-KO)マウスと野生型マウスの間や、アポリポ蛋白 E4 (APOE4) ノックイン (APOE4-KI) マウスとアポリポ蛋白 E3 (APOE3) ノックイン (APOE3-KI) マウスの間で比較検討した。

B. 研究方法

雄 Wister ラットの両側総頸動脈を結紮し、3時間、1、2、4週間後の脳を摘出した。サンドイッチ ELISA にて可溶性画分及び不溶性画分の Aβ40 と Aβ42 を分別定量し、対照ラット (シャム) と比較検討した。次に3ヶ月齢の Sprague-Dawley 系雄性ラットに対し右側頭部に fluid percussion injury による打撃を加え、外傷前、2、4、6ヶ月後に断頭して大脳を摘出した。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の可溶性画分及び不溶性画分に含まれる Aβ分子種を同様にして分別定量し、シャム群と比較検討した。更に thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) として過酸化脂質を測定し、APOE ノックアウト

C. 研究結果

両側総頸動脈結紮後3時間、1、2週後のラット脳では虚血群とシャム群でAβ分子種に有意差を認めなかったが、2週以前では虚血群において不溶性画分のAβ42が増加傾向を示した。4週後では虚血群において可溶性画分、不溶性画分ともに有意にAβ40とAβ42が増加していた (図1)。頭部外傷4ヶ月後の脳可溶性画分ではAβ40、Aβ42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Aβ40、Aβ42ともに対照群に比して有意に増加していた (図2)。APOE-KOマウスでは野生型よりもTBARSが有意に増加しており、APOE4-KIマウスとAPOE3-KIマウスとの比較では有意差には至らなかったが、APOE4-KIマウスにおいてAPOE3-KIマウスよりもTBARSの増加傾向が認められた。

D. 考察

ラット慢性脳虚血モデルにおいても不溶性画分に $A\beta_{42}$ がまず増加し、その後 $A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{42}$ の両分子種が蓄積することが明らかとなり、 $A\beta_{42}$ のシード仮説が成り立つことが示された。また、慢性脳虚血が AD 脳に沈着する $A\beta$ の生成・蓄積を促進し、AD 発症の要因の一つとなる可能性が示唆された。ラット頭部外傷モデルにおいても慢性期に脳内 $A\beta$ が増加することが示され、まず可溶性画分に $A\beta$ が増加し、それが不溶化していく過程が予想された。頭部外傷が脳内 $A\beta$ の蓄積を介して AD 発症の促進因子となる可能性が示唆されるとともに、頭部外傷後痴呆脳においても $A\beta$ のシード仮説が適応できるものと考えられた。また、APOE4→酸化ストレスへの脆弱性→ $A\beta$ の神経毒性増強→神経細胞死促進→AD 発症という仮説の合理性は更に検証していく必要があるものとみなされた。

E. 結論

脳虚血や頭部外傷は脳内 $A\beta$ の沈着を促進することによって AD の危険因子となっている可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ishii K, Tamaoka A, Otsuka F, Iwasaki N, Shin K, Matsui A, Endo G, Kumagai Y, Ishii T, Shoji S, Ogata T, Ishizaki M, Doi M, Shimojo N. Diphenylarsinic acid poisoning from chemical weapons in Kamisu, Japan. *Ann Neurol* 56(5):741-5, 2004.
- 2) Ishii K, Tamaoka A, Shoji S: MRI of idiopathic lumbosacral plexopathy. *Neurology* 63(2):E6, 2004.
- 3) 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. 昭和医会誌 (in press)
- 4) 玉岡 晃：ALZHEIMER 病：スタチンによる制御は可能か？—ALZHEIMER 病病態における

コレステロール制御の意義. 医学のあゆみ(in press)

- 5) 玉岡 晃：アルツハイマー病治療薬の現状と問題点. *分子細胞治療* 3(3): 61-66, 2004.
- 6) 玉岡 晃：アルツハイマー病治療薬としてのスタチンの可能性. *Molecular Medicine* 41(4): 457-466, 2004.
- 7) 玉岡 晃：アルツハイマー病：スタチンによるコレステロール制御. *BRAIN MEDICAL* 16(1): 33-40, 2004.
- 8) Saido TC, Takeda M, Urakami K, Shoji M, Ito N, Iwatsubo T, Tamaoka A, and Kanemaru K: Discussions on role of neprilysin and degradating system. *Psychogeriatrics* 4:13-8, 2004.
- 9) 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* 4:39-44, 2004.
- 10) 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* 4:45-50, 2004.

2. 学会発表

- 1) 玉岡 晃：アミロイド β 蛋白からみたアルツハイマー病の分子病態. 東北大学神経内科特別セミナー (仙台)、1月28日、2005.
- 2) Harada H, Tamaoka A, Ishii K, Shoji S, Kametaka S, Kametani F, Murayama S: Analyses on beta-site APP cleaving enzyme (BACE1) in brains of patients with Alzheimer's disease and normal controls. Society for Neuroscience 34th Annual Meeting(San Diego), October 27, 2004..
- 3) Tamaoka A, Matsuno S, Harada H, Ishii K, Shoji S, Hoshino S: Amyloid β protein in chronic stage of fluid percussion in rat brain. Society for Neuroscience 34th Annual Meeting(San Diego), October 23, 2004.
- 4) 玉岡 晃：アルツハイマー病の診断と治療.

竜ヶ崎市・牛久市医師会学術講演会（龍ヶ崎）、
10月8日、2004.

5) 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：ヒト脳におけ
る Beta-site APP-cleaving enzyme 1 (BACE1)抗体の
解析—アルツハイマー病脳と対照脳の比較検討—
第23回日本痴呆学会学術集会（東京）、9
月30日、2004.

6) 玉岡 晃、原田祐嗣、石井一弘、庄司進一、
宮崎晴子、櫻井 隆、貫名信行、藤田 忍：アポ
リポ蛋白 E ノックアウト及びノックインマウス
脳における酸化ストレスの検討. 第23回日本痴
呆学会学術集会（東京）、9月29日、2004.

7) 伊藤信朗、小久保康昌、佐々木良元、成田有
吾、石黒幸一、大野英人、玉岡 晃、葛原茂樹：
紀伊半島の筋萎縮性側索硬化症／パーキンソン
痴呆複合の脳脊髄マーカー. 第45回日本神経学
会総会（東京）、5月14日、2004.

8) 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：アルツハイマ
ー病脳における Beta-site APP-cleaving enzyme 1

(BACE1)の解析. 第45回日本神経学会総会（東
京）、5月12日、2004.

9) 玉岡 晃、原田祐嗣、石井一弘、庄司進一、
宮崎晴子、櫻井 隆、貫名信行、藤田 忍：アポ
リポ蛋白 E ノックアウト及びノックインマウス
脳における酸化ストレスの検討. 第45回日本神
経学会総会（東京）、5月12日、2004.

10) 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

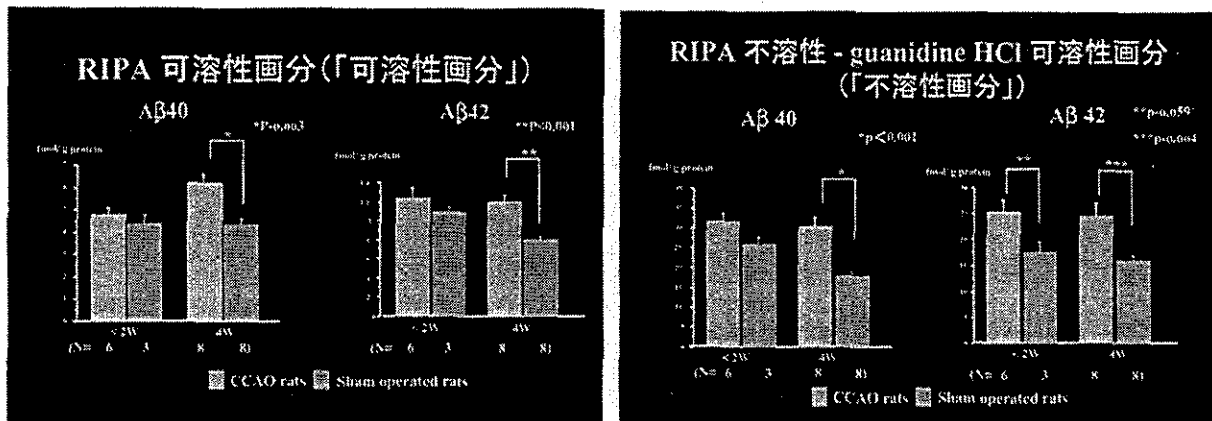


図1. ラット慢性脳虚血モデルにおける脳内アミロイドβ蛋白の解析

両側総頸動脈結紮後3時間、1、2週間後のラット脳では虚血群 (CCAO rats) とシャム群 (Sham operated rats) でAβ分子種に有意差を認めなかったが、2週以前では虚血群において不溶性画分のAβ42が増加傾向を示した。4週後では虚血群において可溶性画分、不溶性画分ともに有意にAβ40とAβ42が増加していた。

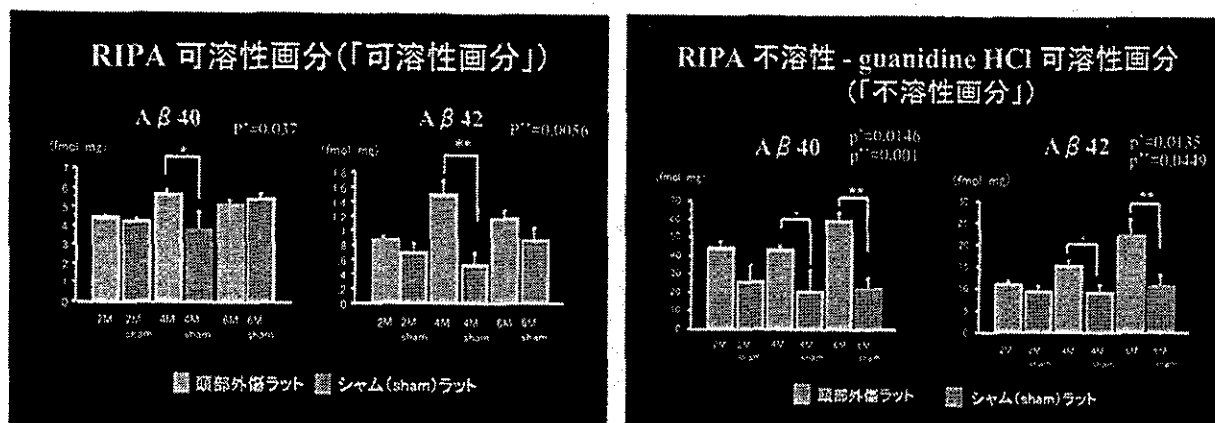


図 2. 実験的頭部外傷ラット脳の慢性期におけるアミロイドβ蛋白の定量

脳の可溶性画分 (RIPA可溶性画分) では外傷4ヶ月後でAβ40、Aβ42ともに対照群に比して有意に増加しており、不溶性画分 (RIPA不溶性・塩酸グアニジン可溶性画分) では外傷4ヶ月後、6ヶ月後でAβ40、Aβ42ともに対照群に比して有意に増加していた。

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班 分担研究報告書

Transgenic mouse を用いた脳アミロイド治療法の検討

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 瓦林毅、松原悦朗、阿部康二

岡山大学大学院医歯学総合研究科神経病態内科学

研究要旨 アルツハイマー病(AD)の新しい診断法と治療法の検討を行った。血漿アミロイドβ蛋白(AB)測定では AB40/AB42 ratio が AD の初期からコントロールに比べて有意に上昇し診断マーカーとしての意義を有するものと考えられた。ヒト血液中に AB アミロイドを認識する抗体が一定の比率で検出されたが疾患特異性や臨床症状との相関は認められなかった。トランスジェニックマウスを用いた治療法の検討では、抗 AB40 抗体、抗 AB42 抗体の腹腔内投与は血漿 AB40、AB42 の選択的増加と脳 AB40、AB42 の選択的低下を引き起こしたが、その効果は軽度であった。脳への抗体の移行を増やすために抗 AB42 抗体の脳室内持続投与を行うと脳 AB42 選択的に著明な脳アミロイドの減少をもたらす、有望な治療法と考えられた。メラトニンの経口投与は脳 AB40、AB42 蓄積抑制と行動異常の改善に有効であり、今後の臨床応用に期待が持てる。

A. 研究目的

アルツハイマー病の治療薬の最近の進歩は初期から確実に AD を診断できるバイオマーカーの必要性を示している。また、脳アミロイドの根本的治療法として AB ワクチン療法および抗 AB 抗体受動免疫療法が期待されている。我々は Tg2576 マウスを用いて AD の新たな診断法の開発および治療法の検討を行った。

B. 研究方法

1. 対象

- a) 血漿測定：113 例の AD 群 (平均年齢 75 歳、平均 MMS 検査得点 15 点) と 155 例の年齢補正された正常対照群の計 268 例 (平均年齢 76 歳) の血漿を用いた。
- b) 治療：アミロイドβ蛋白(AB)の前駆体を過剰産生する transgenic mouse である Tg2576 マウスおよびこのマウスと PS1(L286V) transgenic mouse との double transgenic mouse (PSAPP mouse)を用いた。

2. 方法

- a) 血漿測定：ELISA 法を用いて血漿 AB40 および AB42 を測定した。抗 AB 自己抗体は採取血漿を

用いて Tg2576 マウスの脳切片を ABC 法で免疫染色し、AB アミロイドの染色の有無で判定した (Tissue amyloid plaque immunoreactivity; TAPIR)。

- b) 治療：ワクチン療法は 6 月齢 Tg2576 マウスの背部に合成 AB42 1mg を月 1 回ずつ 6 ヶ月間免疫した。抗 AB40 抗体、抗 AB42 抗体の腹腔内投与療法では 4 月齢 PSAPP マウスに抗 AB40 抗体、抗 AB42 抗体またはマウス IgG 0.5mg の投与を毎週 1 回 1 ヶ月間行った。脳室内投与療法は 18 月齢の Tg2576 マウスの右脳室内に抗 AB42 抗体を Alzet pump を用いて 2 週間持続投与した。メラトニン投与療法は 4 月齢 Tg2576 マウスにメラトニン 0.5mg の経口投与を 4 月齢から 11.5 ヶ月間行った。解剖時に半脳は凍結して抽出を行い、脳 AB 量を ELISA で測定した。残りの半脳はパラホルム固定してパラフィン切片を作成し、抗 AB 抗体を用いた免疫染色を行って大脳皮質での AB アミロイドの占める面積 amyloid load を測定した。

(倫理面への配慮)

採血は書面によるインフォームドコンセントのもとに行った。

C. 研究結果

a) 診断法：年齢補正された正常対照群に比べ AD 群では血漿 Aβ40 は増加($p < 0.0002$), 血漿 Aβ42 は低下($p < 0.0001$)し, Aβ ratio は有意に増加した ($p < 0.0001$) (図 1). AD 群を MMS 21 以上の早期群と 11-20 までの中期群, 10 以下の進行群に分けて検討を行うと, Aβ ratio は AD の初期から進行期まで一貫して上昇していた. ヒト血漿中の抗 Aβ 自己抗体は AD と年齢補正された正常対照群の間で出現率に差を認めなかった. TAPIR の強さと, MMS, 疾患罹病期間および血漿 Aβ の値との間には相関を認めなかった. 免疫沈降を用いて抗 Aβ 自己抗体の characterization を行うと Aβ40 の monomer と dimer が検出されたが, Aβ42 の反応は非常に弱く, 力価の低い抗 Aβ40 抗体であった.

b) 治療法：

1. Aβ42 ワクチン療法では脳アミロイド沈着の減少と脳 Aβ 量の減少を認めたが, Aβ 減少効果は約 4 割で, 個体毎の効果のばらつきが大きかった. また治療群 22 匹中の 13 匹が死亡し, 治療群で死亡率の増加が見られた. 効果例で CD45 陽性のリンパ球およびマクロファージの髄膜および脳実質内への浸潤が認められ, ヒトの治療で認められた髄膜脳炎と同様な所見であった.
2. 抗 Aβ 抗体の末梢投与
抗 Aβ40 抗体は血漿 Aβ40 を, 抗 Aβ42 抗体は血漿 Aβ42 を約 3 倍上昇させた. TBS, SDS, ギ酸のそれぞれの脳分画で Aβ40 および Aβ42 を測定すると抗 Aβ40 抗体はギ酸分画の Aβ40 を, 抗 Aβ42 抗体は SDS とギ酸分画の Aβ42 を軽度低下させた. 抗 Aβ40 抗体は Aβ40 amyloid load, 抗 Aβ42 抗体は Aβ42 amyloid load を軽度低下させた.
3. 抗 Aβ42 抗体の脳室内投与
抗 Aβ42 抗体は脳 Aβ42 沈着を著明に減少させた. また Aβ40 の減少も認めた.
4. メラトニンの経口投与
メラトニンは脳 Aβ40, Aβ42 の蓄積を抑制し, 脳 amyloid load も有意に低下させた. また Morris water maze で隠れた platform を見つける時間が有意に短縮された.

D. 考察

血漿 Aβ ratio は AD の初期から進行期まで一貫して上昇していた. 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. ヒトでは Aβ 脳アミロイドを認識する抗 Aβ 自己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 Aβ 抗体の出現には疾患特異性はなく, また, 臨床症状や血漿 Aβ との相関も現在のところみられていない.

Aβ ワクチン療法でヒトでの治験と同様な髄膜脳炎を認めたため, 細胞性免疫を介さない抗 Aβ40 抗体, 抗 Aβ42 抗体の受動免疫療法を試みた. 腹腔投与ではそれぞれ血漿 Aβ40, Aβ42 の選択的上昇と脳 Aβ40, Aβ42 の選択的低下を認め, 抗 Aβ 抗体が脳から Aβ を引き抜いて血漿 Aβ を上昇させるという sink theory に合う所見が得られた. 腹腔内投与で抗体が脳内に移行する率はわずか 0.3%とされる. 抗体の脳内移行量を増やすために抗 Aβ42 抗体の脳室内直接投与を行うと脳 Aβ42 の著明な選択的減少が認められ, 有効な治療法と考えられた. メラトニンの投与実験で脳 Aβ 量の有意な減少, 脳アミロイド蓄積の減少および認知障害の改善作用が認められた. 今後の臨床応用が期待される.

E. 結論

血漿 Aβ40/Aβ42 ratio は脳アミロイド蓄積の生物学的マーカーとなる可能性がある. 抗 Aβ 抗体の受動免疫療法およびメラトニンはマウスモデルで脳 Aβ 蓄積を減少させ, 有望な治療法と考えられた.

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* 36(3): 225-227, 2004
- 2) 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* 24(15): 3801-3809, 2004
2. 学会発表
なし
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
1. 特許取得
脳 A β 42 選択的除去療法 特願 2003-317443
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班 分担研究報告書

日本のプリオン病の現状

研究協力者 水澤英洋 東京医科歯科大学大学院脳神経病態学
共同研究者 袖山信幸*、中村好一**、山田正仁***、佐藤 猛****、北本哲之*****
*東京医科歯科大学大学院脳神経病態学、**自治医科大疫学・地域保健部門、
金沢大大学院脳老化・神経病態学、*東大和病院神経内科、
*****東北大大学院病態神経学

研究要旨 本邦における最近のプリオン病の疫学的動向を検討し、近年プリオン病の診断に導入されるようになった検査の状況を評価することによりプリオン病の病状と診断の現状を正確に把握することを目的とした。対象は孤発性 405 例、遺伝性 61 例、感染性 52 例である。孤発性は、発症年齢は平均 65.9 歳、全経過は平均 12.7 ヶ月であった。症状の頻度は、進行性の経過と痴呆・意識障害 100%、ミオクローヌス 96%、無動性無言 93.3%、錐体路症状 80.2%、錐体外路症状 77.7%、小脳症状 66.4%、精神症状 64.4%、視覚症状 55.2%であった。2004 年 9 月までに認定された遺伝性プリオン病はのべ 75 例で CJD は 46 例、その内訳はコドン 180 番変異:16 例 (重複 1 例)、コドン 200 番変異:16 例、コドン 232 番変異:9 例 (重複 1 例)、遺伝子挿入(様々):2 例、コドン 208 番変異:1 例、遺伝子未検索:2 例、GSS は 24 例、その内訳はコドン 102 番変異:20 例、遺伝子挿入:1 例、コドン 105 番変異:2 例、遺伝子未検索:1 例、家族性致死性不眠症は 2 例、その内訳はコドン 178 番変異:2 例、その他分類不能のものが 3 例、その内訳は遺伝子未検索:2 例、コドン 178 番変異:1 例であった。感染性プリオン病は全例がヒト由来乾燥硬膜によるもので、移植から発症までの期間は 6 年から 23 年で平均は 13.4 年であった。検査に関しては脳波、脳 MRI、14-3-3 蛋白、NSE の施行率はそれぞれ 99%、76%、36%、44%であり、感度は 75%、71%、73%、58%、発症から異常所見が検出されるまでの期間は 3.6 ヶ月、4.4 ヶ月、4.8 ヶ月、3.6 ヶ月であった。これらの 4 検査はそれぞれの利点を持つため組み合わせて施行する必要がある。

A. 研究目的

プリオン病は急速かつ不可逆的に中枢神経系を障害することから正確な治療効果の判定や良好な治療成績を得るためには早期に治療を開始することが必要である。また、プリオン病は感染性疾患であり、早期診断が公衆衛生の立場からも重要である。本研究は本邦における最近のプリオン病の疫学的動向を検討し、近年プリオン病の診断に導入されるようになった検査の状況を正確に把握し、それを早期診断に寄与させることを目的とした。

B. 研究方法

対象は 1999 年 4 月から 2004 年 3 月まで日本のクロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)サーベイランス委員会にて possible 以上のプリオン病と診断さ

れた 518 例である。遺伝性プリオン病の臨床の詳細に関しては 2004 年 9 月まで認定された 74 例を検討対象とした。CJD サーベイランス調査票の記載に基づいて、プリオン病の疫学的データに検討を加えた。さらに、孤発性と感染性を合わせた群における脳波、脳 MRI、14-3-3 蛋白、NSE の各検査の検査施行数、施行率、陽性数、感度を計算し、発症から CJD に特徴的な異常が各検査で検出されるまでの期間を検討した。また、発症後 1 月ごとの検査陽性数をそれぞれの検査について検索した。CJD に特徴的な異常とは、脳波では periodic synchronous discharge (PSD)を、脳 MRI では拡散強調画像 (DWI)、T2 強調画像、または FLAIR 画像での大脳皮質のリボン状の高信号病変または大脳基底核や視床の高信号病変とした。14-3-3 蛋白は検査を施行した施設における基準で陽性と

されたものを、NSEは35ng/ml以上を異常とした。

(倫理面への配慮)

本研究は CJD サーベイランス委員会が施行した CJD サーベイランス調査に基づいている。調査については患者御本人または御家族へ十分に御説明をし、文書にて同意が得られている。倫理審査委員会の承認も得られており、倫理面における問題はない。

C. 研究結果、D. 考察

プリオン病と認定された 518 例の内訳は孤発性プリオン病:405 例、家族性プリオン病:61 例、感染性プリオン病:52 例であった。男女別の割合はいずれの分類のプリオン病でも女性が多かった(表 1)。

孤発性プリオン病の発症年齢は 33 歳から 90 歳までであり、平均 65.9 歳であった。発症から死亡までの期間は平均 12.7 か月であった。初発症状は知能障害が 40.1%、四肢、体幹等の機能障害が 28.4%、視覚異常が 15.1%、精神症状が 10.6%であった(図 1)。経過中に、進行性の経過は 100.0%、痴呆・意識障害は 100.0%、ミオクローヌスは 96.0%に、無動性無言は 93.3%に、錐体路症状は 80.2%、錐体外路症状は 77.7%、小脳症状は 66.4%、精神症状は 64.4%、視覚症状は 55.2%に認められた(図 2)。

2004 年 9 月までに認定された遺伝性プリオン病 74 例(1 例は 2 箇所の遺伝子変異あり)の病型と遺伝子変異の内訳は以下のとおりである。CJD は:46 例、その内訳はコドン 180 番(Val→Ile):16 例(重複 1 例)、コドン 200 番(Glu→Lys):16 例、コドン 232 番(Met→Arg):9 例(重複 1 例)、遺伝子挿入(様々):2 例、コドン 208 番(Arg→His):1 例、遺伝子未検索:2 例、GSS は 24 例、その内訳はコドン 102 番(Pro→Leu):20 例、遺伝子挿入:1 例、コドン 105 番(Pro→Leu):2 例、遺伝子未検索:1 例、FFI は 2 例、その内訳はコドン 178 番(Asp→Asn):2 例、その他分類不能のものが 3 例、その内訳は遺伝子未検索:2 例、コドン 178 番(Asp→Asn):1 例であった。以下に頻度が高かったコドン 102 番変異による GSS とコドン 180 番変異による CJD について詳細に検討した。

コドン 102 番 (Pro→Leu)変異による GSS は遺伝性プリオン病の 26.7%を占めていた。発症年齢は平均 55.2 歳、家族歴は 20 例中 16 例で陽性であった。初発症状は小脳症状:75%、痴呆:20%、錐体外路症状:10%、錐体路症状:5%、精神症状:5%であった。経過中に見られた症状の頻度は小脳症状:85%、痴呆:85%、錐体路症状:55%、錐体外路症状:45%、精神症状:45%、ミオクローヌス:45%、無動性無言:35%、視覚症状:0%であり、発症から症状出現までの期間は小脳症状:0.5 ヶ月、ミオクローヌス:9.3 ヶ月、錐体外路症状:13.6 ヶ月、錐体外路症状:15.8 ヶ月、無動性無言:16.9 ヶ月、痴呆:18.3 ヶ月、精神症状:23.4 ヶ月であった。脳波、脳 MRI、14-3-3 蛋白、NSE の感度%/施行率%はそれぞれ、脳波:6%/90%、脳 MRI:40%/75%、14-3-3 蛋白:80%/25%、NSE:20%/25%であった。

コドン 180 番 (Val→Ile)変異による CJD は (232 変異の合併例 1 例あり)遺伝性プリオン病の 21.3%を占めていた。発症年齢は平均 74.5 歳、家族歴は 16 例中 1 例のみで陽性であった。コドン 129 番多型は 14 例中 10 例で Met/Met、14 例中 4 例で Met/Val であった。初発症状は痴呆:79%、精神症状:14%、錐体外路症状:14%、錐体路症状:7%、小脳症状:7%であった。経過中に見られた症状の頻度は痴呆:100%、ミオクローヌス:94%、小脳症状:88%、錐体路症状:75%、精神症状:75%、視覚症状:56%、視覚症状:31%であり、発症から症状出現までの期間は痴呆:0.6 ヶ月、精神症状:1.2 ヶ月、視覚症状:2 ヶ月、小脳症状:2.3 ヶ月、錐体路症状:4.4 ヶ月、錐体外路症状:4.5 ヶ月、無動性無言:7.5 ヶ月、ミオクローヌス:9.6 ヶ月であった。脳波、脳 MRI、14-3-3 蛋白、NSE の感度%/施行率%はそれぞれ、脳波:6%/100%、MRI:100%/81%、14-3-3 蛋白:57%/44%、NSE:29%/44%であった。

感染性プリオン病の発症年齢は平均 56.7 歳であった。移植から発症までの期間は 6 年から 23 年で平均は約 13.4 年であった(図 3)。原因となった硬膜移植手術は 1978 年から 1989 年にわたり、発症は 1992 年から 2003 年に認められた(図 4)。

検査に関しては、孤発性と感染性を合わせた群における脳波、脳 MRI、14-3-3 蛋白、NSE の陽性数(感度%)/検査施行数(施行率%)は definite 群(58 例) 脳波:42(72%)/58(100%)、脳 MRI: