

れる。抗凝固療法として静脈内投与した場合、安全性は高いが、血小板減少をきたすことが知られている。PPSそのものの中樞神経に対する作用は知られていない。動物における経口や、腹腔内投与でも神経学的症状は認めていない。血液脳関門は通過しない。PPSは脳室内投与を行った後にどのような薬理動態を示すかは不明であるが、ヘパリン結合細胞、たとえば神経細胞やグリア細胞に取り込まれて抗プリオン蛋白効果を示すことが期待されている。

### PPS脳室内持続投与療法の実際

PPSは経口投与や静脈内投与では血液脳関門を通過せず、脳室内に直接投与する必要がある。PPSの脳室内持続投与法は、プリオン感染マウスにおける実験で発症を遅延させる効果が証明された。臨床効果のみならず、マウスの脳病理においてPrP<sup>sc</sup>の蓄積が投与側で抑制されていることが認められた。ヒトプリオン病に対する臨床治療は、2003年に英国で変異型CJDに対して同治療の1例目が行われて以降、欧州で現在までに13例のプリオン病患者に同治療が行われ、患者での安全性と有効性が評価されているところである<sup>19)20)</sup>。

#### 1. プロトコルの実際

現在、福岡大学で作成したプロトコルの概略を説明する。神経学的所見、脳波所見、拡散強調画像を含むMRI、脳脊髄液所見(一般検査、14-3-3蛋白、NSE)などから診断と治療前評価を行う。インフォームドコンセント後に脳室内カテーテルの留置手術および腹部皮下体内埋め込み型微量注入器具の留置手術を行う。一般に右前頭部から右前角穿刺で、脳室チューブを埋め込む。脳室チューブは前頭部から耳介後方を通して右側頸部から右前胸部、上腹部まで誘導。臍の高さで右腹部皮下に埋め込み持続注入ポンプに接続する(図2)。埋め込み型持続注入ポンプは当科においてArchimedes(20ml reservoir, flow rate 0.5ml/24hr, Codman Inc., Germany)を使用している。留置術直後、第7病日に頭部CT scanで出血などの合併症の有無をチェックする(図3)。術後8日目からPPS投与を低濃度で開始する。その後、漸増し維持量に到達させる。至適維持量

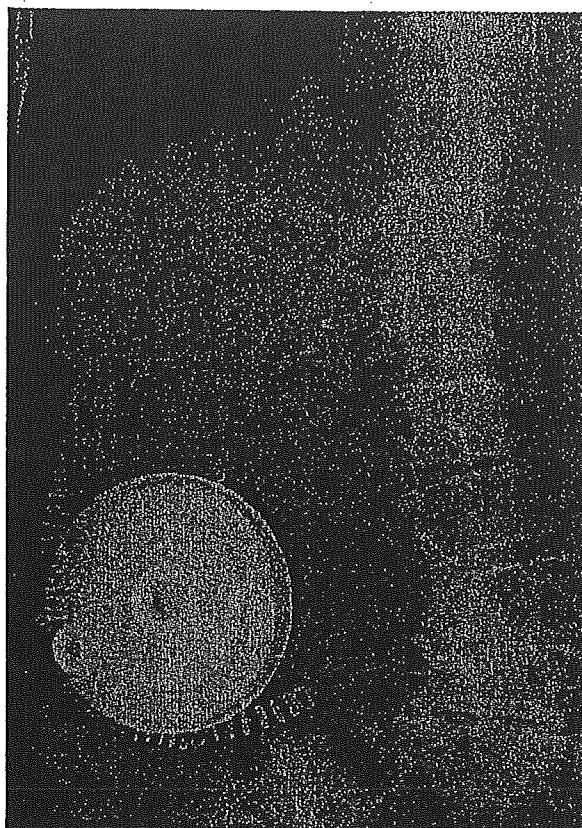


図2 Plain abdominal X-ray

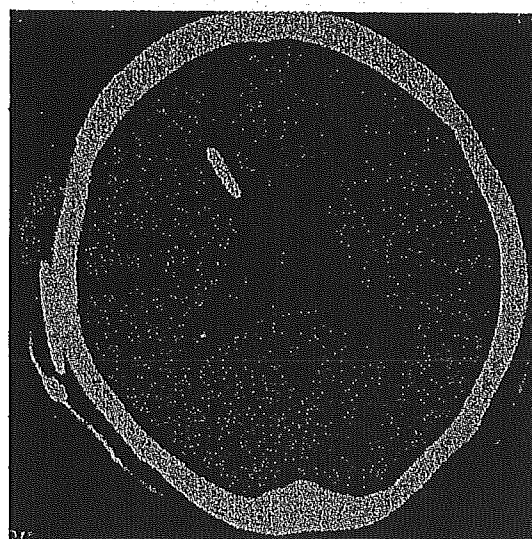


図3 Non-enhanced brain CT scan 7 days after intraventricular catheter placement

に関してはまだ検討の余地がある。動物実験で感染後期にPPSの脳室内持続投与を行ったマウスモデルでは、至適治療濃度は230 $\mu$ g/kg/dayであった。この濃度では副作用は出現せず、これらの実験結果をもとに投与量を決めてきた。初期の英国における症例は11 $\mu$ g/kg/dayを上限として治療を行っていた。その後、7例目から当初の10倍

である110 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ となっている。これまでの経過からはPPS濃度をあげたことによる副作用の報告はない。おそらく脳内に拡散し、細胞内とり込みが飽和した状態で血中に移行することから、髄液中あるいは血中のPPS濃度を測定することはその判断に役立つはずである。現在、濃度測定系を検討している。現在、福岡大学では60 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ を維持量としている。その後、4週間ごとに腹部皮下の微量注入ポンプの薬液を新しい薬液に交換充填する。手術後の患者の状態は術前の状態への回復は速やかである。創部の安定とともに生活の制限は必要がない。本邦では1例目のPPSの脳室内持続投与は孤発性CJDの66歳女性例に行われた<sup>2)</sup>。2004年1月、歩行時のふらつきで発症。下旬には物忘れ、言葉の出にくさや問いかけへの反応が鈍くなった。3月には右上肢のミオクローヌスが出現した。徐々にミオクローヌスは全身に広がった。3月下旬には起立、歩行が不能となり、4月に近医へ入院し、孤発性CJDの診断を受けた。4月中旬、寝たきり、無動無言。8月25日に当院に転院した。入院時所見は無動無言で、四肢のミオクローヌスを認めた。開眼はあるが、意味のある自発運動はなく、光、音、痛みに対して驚愕反応を認めた。11月16日、右の側脳室前角脳室カテーテル留置および右腹壁に微量持続注入ポンプを埋め込み、腹部カテーテルは皮下を通じて留置したポンプに接続した。1週間後のCTで出血などの合併症がないことを確認した後にPPSを低濃度(1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ )よりはじめ、徐々に濃度を上げて60 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ とした。現在、同濃度で維持療法中である。治療開始11カ月が経過している。現在、明らかな臨床効果や脳波上の変化を示していない。一方で、血算、生化学、凝固検査、頭部CTで副作用は認められない。

## 2. 治療の適応症例について

症状が出現したときにはすでに脳内にはPrP<sup>sc</sup>の沈着が多く認められることから、理想の予防的治療は症状発症前、すなわちPrP<sup>sc</sup>の蓄積がまだ脳機能障害を起こす以前に開始されなければ理論上有効ではない。しかしながら、この発症前診断は現在困難であり、やはり発症のできるだけ早期に治療は開始する以外に方法はない。

少なくとも治療開始時の障害レベルがある程度軽度であり、その後の臨床観察が可能である状態が望ましい。いずれにしても、どのような治療法の開発においても早期あるいは発症前診断というものは必要となる。一方で確定診断、少なくともWHO診断基準でprobable CJD以上でなければならず、possibleの症例に行うには倫理上問題がある。しかし、これまでの診断基準は診断の確実性を主に考え、早期CJD診断の感受性は高くない。MRIの拡散強調画像の進歩などから、早期患者の診断精度を上げる必要が今後生じるであろう。当然ではあるが、同治療には血算、生化学、凝固機能などを含め、全身状態が安定していることが要求される。また、外科的処置を行うことから、抗血小板療法や抗凝固療法中の患者やその必要性がある場合は適応にはならない。

## おわりに

プリオン病の基礎研究から臨床治験に至るまでを概説したが、治療法の開発に関して今ようやく始まったばかりである。今後の発展のためは、この疾患の病態の把握と、薬物の機序に関してのさらなる研究、知見や、診断学の向上による早期の発見、治療評価法の確立、そして、今回のペントサンポリサルフェート(PPS)治療にみられるように、脳外科医、麻酔医や手術室のスタッフの協力など集学的な取り組みが必要である。

現在のところPPS脳室内持続投与法は、抗プリオン作用をもつ、もっとも期待できる方法と考えられるが、今後は経過の注意深い観察と、安全域を考えた治療濃度設定を検討する必要がある。

## 文 献

- 1) 中村好一, 渡邊 至, 佐藤 猛, ほか. クロイツフェルトヤコブ病サーベイランス結果. 厚生労働科学研究費補助金・難病性疾患克服研究事業・プリオン病及び遅発性ウイルス感染に関する調査研究. 平成15年度分担研究報告書. 東京: 厚生労働省; 2004. p. 33-9.
- 2) Hsich G, Kenney K, Gibbs CJ, et al. The 14-3-3 brain protein in cerebrospinal fluid as a marker for trans-

- missible spongiform encephalopathies. *N Engl J Med* 1996 ; 335 : 924-30.
- 3) Beaudry P, Cohen P, Brandel JP, et al. 14-3-3 protein, neuron-specific enolase, and S-100 protein in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 1999 ; 10 : 40-6.
  - 4) Kropp S, Zerr I, Schulz-Schaeffer WJ, et al. Increase of neuron-specific enolase in patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci Lett* 1999 ; 261 : 124-6.
  - 5) Brandel JP, Beaudry P, Delasnerie-Laupretre N, et al. Creutzfeldt-Jakob disease : diagnostic value of protein 14-3-3 and neuronal specific enolase assay in cerebrospinal fluid. *Rev Neurol (Paris)* 1999 ; 155 : 148-51.
  - 6) Tranchant C, Geranton L, Guiraud-Chaumeil C, et al. Basis of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 1999 ; 52 : 1244-9.
  - 7) Will RG, Ironside JW, Zeidler M, et al. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 1996 ; 347 : 921-5.
  - 8) 山田正仁, ほか. CJDサーベイランスにおける問題例 : わが国における変異型CJD疑い例および孤発性CJD診断困難例の検討. 厚生労働科学研究費補助金・難病性疾患克服研究事業・プリオン病及び遅発性ウイルス感染に関する調査研究. 平成16年度班会議抄録集. 東京 : 厚生労働省 ; 2005. p. 53-8.
  - 9) Prusiner SB. Biology and genetics of prion diseases. *Annu Rev Microbiol* 1994 ; 48 : 655-86.
  - 10) Harris DA. Biosynthesis and cellular processing of the prion protein. *Adv Protein Chem* 2001 ; 57 : 203-28.
  - 11) Brandner S, Isenmann S, Raeber A, et al. Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature* 1996 ; 379 : 339-43.
  - 12) Caughey B. Protease-resistant PrP accumulation and scrapie agent replication : a role for sulphated glycosaminoglycans? *Biochem Neurodegen Disord* 1994 ; 22 : 163-7.
  - 13) Caughey B, Raymond G. Sulphated polyanion inhibition of scrapie associated PrP accumulation in cultured cells. *J Virol* 1993 ; 67 : 643-50.
  - 14) Perez M, Wandosell F, Colaco C, et al. Sulphated glycosaminoglycans prevent the neurotoxicity of a human prion protein fragment. *Biochem J* 1998 ; 335 : 369-74.
  - 15) Shyng SL, Lehmann S, Moulder K, et al. Sulphated glycans stimulate endocytosis of the cellular isoform of the prion protein PrP<sup>C</sup> in cultured cells. *J Biol Chem* 1995 ; 270 : 30221-9.
  - 16) Doh-ura K, Ishikawa K, Murakami-Kubo I, et al. Treatment of transmissible spongiform encephalopathy by intraventricular drug infusion in animal models. *J Virol* 2004 ; 78 : 4999-5006
  - 17) Dawes J, Prowse CV, Pepper DS. Absorption of heparin, LMW heparin and SP54 after subcutaneous injection, assessed by competitive binding assay. *Thromb Res* 1986 ; 44 : 683-93.
  - 18) Sie P, Albarede JL, Robert M, et al. Tolerance and biological activity of pentosan polysulfate after intramuscular or subcutaneous administration for ten days in human volunteers. *Thromb Haemost* 1986 ; 55 : 86-9.
  - 19) Todd NV, Morrow J, Doh-ura K, et al. Cerebroventricular infusion of pentosan polysulphate in human variant Creutzfeldt-Jakob disease. *J Infec Dis* 2005 ; 50 : 394-6.
  - 20) Rainov NG, Whittle IR, Doh-ura K. Treatment options in patients with Prion disease-the role of long term cerebroventricular infusion of pentosan polysulphate. In : Kitamoto T, editor. *PRIONS*. Tokyo : Springer-Verlag ; 2005. p. 41-66.
  - 21) 山田達夫, 坪井義夫. ペントサンポリサルフェート脳室内持続投与法の臨床試験に関する研究. 厚生科学研究費補助金・こころの健康科学研究事業・プリオン病の画期的治療法に関する臨床研究と基礎研究. 平成16年度分担研究報告書. 東京 : 厚生労働省 ; 2005. p. 8-9.

# プリオン病の治療

## —経口キナクリン療法とペントサン硫酸の脳室内持続投与法の現状—

坪井義夫 山田達夫

TSUBOI Yoshio, YAMADA Tatsuo/福岡大学医学部神経内科

堂浦克美

DOH-URA Katsumi/東北大学大学院医学系研究科附属創生応用医学研究センタープリオン蛋白研究部門

プリオン病は伝染性海綿状脳症と考えられ、発症後その進行は早く、平均約2ヵ月で無動無言になることが多い。これまでに有効な治療法は全くなき、診断後は対症療法しかない。しかし、英国における変異型CJD、およびほぼ同時期に本邦で発生が多かった硬膜移植後の医原性CJDの発生後、即戦力となる治療の開発が求められた。キナクリン(抗マalaria薬)やペントサンポリサルフェートは実験的に抗プリオン効果が認められ、臨床応用が期待された。これまでの本邦および海外における最新の治療研究を概説する。

### はじめに

プリオン病は伝染性海綿状脳症として知られ、いったん発症すると、進行性でかつ致死性の疾患である。臨床病型は孤発性、遺伝性(家族性)、感染性の3つに分類され、感染性には伝染が疑われるものと医原性のものが含まれる<sup>1)</sup>。プリオン病のあらゆる病型において共通してプリオン蛋白の代謝異常が認められ、プロテアーゼ抵抗性の異常型プリオン蛋白(PrP<sup>sc</sup>)の蓄積がみられる。PrP<sup>sc</sup>の異常な蓄積は、主に中枢神経に起こる。ヒトのプリオン病はクロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)、Gerstmann - Sträussler - Scheinker (GSS)症候群、クールー病(kuru)、致死性家族性不眠症(FFI)などの病型を呈する。このうち80%は孤発性のCJDであり、一般にその進行は早く、発症後は平均約2ヵ月で無動無言になる。これまでに有効な治療法は全くな

く、いったん診断されたら後は対症療法しか考えられなかった。しかし、この疾患に対する考えが一変した理由は、英国で発生した変異型CJDであり、ほぼ同時期に本邦で発生が確認された硬膜移植後の医原性CJDであった。どちらも古くから認められた疾患ではなく、人為的な行為の結果作られた疾患(man-made disease)であり、若年者で多発したことから、即戦的治療が求められたのである。

### 1 プリオン蛋白とは

正常のプリオン蛋白(PrP<sup>c</sup>)はすべての動物において存在し、主に中枢神経系で、少量はリンパ球組織で発現する。プリオン遺伝子がコードする蛋白質であり、転写後にゴルジ体で糖鎖修飾を受け、細胞膜に移動する。培養細胞では細胞膜上での半減期は3~6時間であり、その後分解されるとされて

#### Key words

- プリオン病
- クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)
- キナクリン
- ペントサンポリサルフェート

いる<sup>2)</sup>。正常 PrP<sup>c</sup>は 253 アミノ酸蛋白で、分子量は 35~36 kDa で、その生理的作用は不明であるが、銅結合蛋白質としての機能や酸化ストレスに関与している可能性が考えられている。

一方、異常プリオン蛋白(PrP<sup>sc</sup>)はすべてのプリオン病の病理で認められ、ヒトのみならず動物のプリオン病、たとえばスクレイピーにおいても、脳にその蓄積が認められる。正常の PrP<sup>c</sup>に転写後に何らかの構造変化が引き起こされ、 $\beta$ シート構造に富む PrP<sup>sc</sup>へと変化し、病的蓄積を生じる<sup>3)</sup>と考えられている。

脳における PrP<sup>sc</sup>の病的蓄積が神経細胞死、反応性のグリオシス、ミクログリアの増加、そして海綿状変化を引き起こす。これらの脳病理はプリオン病の診断に必須で、アミロイド斑が認められることもある。PrP<sup>sc</sup>は感染性を有し、種を超えて伝播が可能であり、新たなプリオン病を生じる可能性を有する。しかし、PrP<sup>c</sup>が発現していない宿主にはプリオン病は感染しない。

## 2 プリオン病の現状

孤発性の CJD は 1921 年に初めて報告されたが、患者のほとんどは 40~80 歳までの間に発病し、発生率は年間 100 万人に一人とされている。本邦では年間に 100 名近くの患者が新たに診断されており、その平均年齢は 65.6 歳である<sup>4)</sup>。典型的な症状としては、進行性の痴呆とミオクローヌス、

小脳性運動失調や視覚異常などの臨床症状のほか、脳波では周期性同期性放電が認められ、診断に有用とされている。また、脳脊髄液中の 14-3-3 蛋白、neuron-specific enolase(NSE)やタウ蛋白が、CJD における神経細胞死の生物学的マーカーとして有用であることが報告されている<sup>5)~8)</sup>。また、プリオン蛋白遺伝子(PRNP)内コドン 129 のメチオニンとバリンの遺伝子多型は、臨床表現型に影響を与えることがわかっている<sup>9)</sup>。

医原性プリオン病は、本邦で 100 例を超えて報告<sup>4)</sup>されており、ヒト硬膜の移植後に数年から十数年経った後に発症している。まれに角膜移植からの感染が疑われる報告もある。遺伝性プリオン病の発生は全体の約 10% を占めている。遺伝性プリオン病は、いずれも常染色体優性遺伝で PRNP 内に点変異あるいは挿入変異を有する。

プリオン病の臨床症状は、必ずしも均一ではなく多彩である。先ほど述べた進行性痴呆、ミオクローヌス、小脳性運動失調、視覚異常などは頻度が高く、他にうつ、無気力、不安神経症などの精神症状が強い場合や、ジストニア、舞踏様運動や錐体路症状、感覚症状(感覚過敏など)が出現する。

変異型 CJD は 1996 年に報告され、ウシ海綿状脳症(BSE)との関連が確実視されている<sup>10)</sup>。孤発型 CJD との違いは若年発症(平均 29 歳)で進行は遅い。脳病理も異なり、海綿状病理の周囲に florid plaques が認められる。英国での発生がほとんどであるが、最近本邦でも 1 例目が報告された<sup>11)</sup>。

どの型の CJD も発症年齢、初発症状に違いはあるものの進行性であり、ほぼ数ヵ月から長くても数年で無動無言となり死に至る。診断のみ確立されて、その後はただ対症療法のみであった CJD 治療は、近年一変している。表 1 はこれまでの実験室的研究、すなわち培養細胞や動物実験での研究に使われた主な薬物である。この中のいくつかは、若干なりとも予防的効果のあることが確認されている<sup>12)13)</sup>。しかしながら動物の研究において、症状が出現した時にはすでに脳内には PrP<sup>sc</sup>の沈着が多く認められることから、理想の予防的治療は症状発症前、すなわち PrP<sup>sc</sup>の蓄積がまだ脳機能障害を起こす以前に開始されなければ理論上有効ではない。しかしながらこの発症前診断は現在困難であり、やはり発症のできるだけ早期に治療を開始する以外に方法はない。しかし今後、どのような治療法の開発においても、早期あるいは発症前診断というものは必要となる。

## 治療法の探求 —キナクリンの報告とペントサン硫酸 脳室内投与の取り組み—

これまでに実験的に有効性の確立された薬剤が臨床的に使用された報告は数少ない(表 1)が、この中でこれまでの治療研究の概略と、福岡大学で行われたキナクリン治療の結果、ペントサンポリサルフェート脳室内投与の海外と本邦の取り組み状況などを述べる。

抗マラリア薬であるキナクリン、キニーネや抗精神病薬であるクロルプロ

表1 プリオン病治療研究に使われた化合物

抗ウイルス剤	抗寄生虫剤	免疫賦活剤	ホルモン
Amantadine	Quinacrine*	Bacterial polysaccharide	Adrenalin
Adenine arabinoside	Chloroquin*	BCG	Estradiol
Cytosine arabinoside	Glycobiarsol	Phytohemagglutinin	Insulin
Isoprinosine	Metronidazole	Vaccinia virus	Prednisone
Methisazone	Niclosamide	OpG deoxyoligonucleotide	Propylthiouracil
Phosphonoacetic acid	Suramin		Testosterone
Rifampicin		免疫抑制剤	
Sodium butyrate	ポリアニオン	Antilymphocytic serum	その他
Sodium thiocyanate	Carrageenan	Arachis oil	Chlorpromazine
Thiamphenicol	Chondroitin sulfate	Indomethacin	Colchicine
Virazole	Dextran sulfate		DEAE-dextran
	Heparan sulfate		ET $\beta$ -R Ig
抗細菌剤	HPA-23	抗癌剤	Cysteine protease inhibitors
Dapsone	Pentosan polysulfate	Actinomycin D	Neutral dextran
Rifampicin	Polyvinyl sulfate	Cyclophosphamide	Ouabain
Sulfamethoxazole	Silicofungstate	Methotrexate	Silica
Tetracycline		Streptozotocin	Tetrapyrroles
Trimethoprim	インターフェロン		Trypan blue
Thiamphenicol	およびその誘導体		Vitamin C
	Newcastle disease virus		
抗真菌剤	Poly I, Poly C		
Amphotericin B	Sendai virus		
Griseofulvin	Statolon		
Mepartricin	Tilorone HCl		
MS-8209			
Sinefungin			

\* : 実験的に何らかの有効性を報告されているもの。

(文献12より引用)

マジンは、培養細胞における実験系で PrP<sup>c</sup>から PrP<sup>sc</sup>への構造変化を防止する作用がある。また、キナクリンは神経芽腫細胞における異常型プリオン蛋白の蓄積を阻害する<sup>14)15)</sup>。キナクリンはマラリアに対する治療薬として60年以上の歴史があるために、CJDに対する治療的研究が、米国および英国にて始まり、現在進行形である(文献13, PRION-1 study : <http://www.ctu.mrc.ac.uk/studies/cjd.asp>)。

本邦でもプリオン病に対して、抗マ

ラリア薬であるキナクリン、キニーネの効果および副作用の検討を行った<sup>16)17)</sup>。キナクリンを孤発性CJD 22例、医原性(硬膜移植後発症)CJD 5例、および遺伝性プリオン病4例の計31症例に、300 mg/dayを経口または経管投与を行った。両者とも副作用出現がない限り、原則として12週間連日投与とした。

その結果、キナクリン治療を行った12例(39%)に臨床症状の部分的改善を認めた(表2, 3)。効果の平均持続

期間は3.2±3.5週(1~12週)で、効果の内容は覚醒度の改善、自発語の増加、固視反応の改善などであった。しかし、この効果は一過性で、キナクリン投与が継続されていたにもかかわらず消退した。孤発性CJD症例においては、治療開始時の覚醒、意識レベルが高い症例に治療効果がみられた。すなわち、自発語や聴覚・視覚刺激に反応を認めた10例中の8例(80%)に部分的改善を認めた。一方で、症状が進行した無動無言状態で治療を開始した

表2 孤発性CJDにおけるキナクリン治療効果

効果	性別 男 女	年齢 (歳)	発症から投与 までの期間 (月)	開始時の認知機能		効果持続 期間 (週)
				レベル1~2 刺激に反応あり	レベル3 無動性無言	
あり(N=9)	3/6	63.2±8.6	9.1±11.1	8	1	3.2±3.5
なし(N=12)	4/8	64.6±10.1	7.3±6.3	2	10	0
p値	ns	ns	ns	<0.001		-

ns：有意差なし。

表3 キナクリン治療の効果とその内容

性/年齢	診断	投与後の認知機能その他の変化	効果の持続 期間(週)
F/67	医原性CJD	開眼時間の延長、発語の増加。	4
M/76	孤発性CJD	自発開眼時間の延長、Eye to Eye コンタクトが可能。	1
M/63	孤発性CJD	投与2週後に痛み刺激に検査者の視覚注視が出現。	1
F/37	医原性CJD	感情失禁、外部からの刺激に笑ったり泣いたり表情の表出、光・音・呼びかけに追視あり、自発運動の出現、PSDの消失、背景脳波の出現。	4
F/72	孤発性CJD	痛覚刺激にて上肢の動きが出現。	4
F/64	孤発性CJD	投与1週後で覚醒状態の改善がみられた。	1
F/62	孤発性CJD	投与1~2週後で発語が少しみられ、意志疎通性が上昇した、自動運動の増加。	1
F/59	遺伝性GSS <sup>10)</sup>	投与10日~3週後に意味のある発語が増加した、投与10日後で坐位保持可となったがすぐに不可となった。	2
M/46	孤発性CJD	投与4~5日後には反射性ミオクローヌス減少、「うー」と唸り声が聞かれるようになり以後持続、投与2~5週後に音の方向を注視する反応あり。	3
F/68	孤発性CJD	指示動作や挨拶が可能。	12
F/59	孤発性CJD	追視、笑顔がみられた、四肢の自発運動は増加した、不随意運動も粗大な運動に変わったが、その後、もとのミオクローヌスに戻った。	4
F/59	孤発性CJD	投与1週後に呼びかけに反応、ミオクローヌスの減弱、家族の話しかけに笑顔、このような変化は2週間後にはもとに戻る。	2

12例では、1例(8%)にしか確かな変化は認められなかった。一方、医原性CJD症例では5例中2例(40%)に覚醒度の改善を認めた。遺伝性プリオン病症例では4例のうち長期経過の1例(GSS<sup>102</sup>)において効果を認めたが、他の3例(いずれもCJD<sup>200</sup>)では無効であった。

治療中止を余儀なくされた副作用として、肝機能障害を16例(52%)に、溶血性貧血、発熱、誤嚥、偽膜性大腸炎、および皮疹をそれぞれ1例に認めた。副作用症状はキナクリン投与中止後に全例で改善した。

プリオン病に対するキナクリン治療は、短期間ではあるが、臨床的に部分的改善を示すことを初めて明らかにした。一方で、半分以上の症例に肝機能障害が出現し、中止を余儀なくされた。これらの点から治療プロトコルの再検討が必要と考えられる。

ペントサンポリサルフェート(PPS)は動物感染実験において、末梢から感染する前に投与すれば発症を遅らせる効果があること、また、神経芽腫細胞におけるPrP<sup>sc</sup>の蓄積を阻害する<sup>18)19)</sup>ことなどがわかっていた。この効果は、PPSがプリオン蛋白の線維形成を阻害するか、あるいは細胞膜上のプリオン蛋白を減少させるためと推察されている<sup>20)21)</sup>。PPSは血液脳関門を通らないために、脳室内に直接投与する必要があった。Doh-uraら<sup>22)</sup>は脳内感染させたマウスに対して、4週間の脳室内薬物投与を感染後10日目および35日目に開始した。使用薬物はPPSの他キナクリン、アンホ

テリシンBなどであった。

このうちアンホテリシンBは感染後10日目の投与で30%、35日目の投与で12%の発症遅延効果を認めた。PPSはアンホテリシンBよりさらに強力に発症を抑制した(10日目投与で173%、35日目投与で93%)。この時、最も有効な投与量は230 μg/kg/dayであった。投与開始が早いほど発症抑制効果は強力であった。脳の免疫組織学的検討やウェスタンブロットでも脳へのPrP<sup>sc</sup>蓄積は著明に抑制されており、また、230 μg/kg/dayの投与量では明らかな副作用は認めず、イヌにおける実験でも230 μg/kg/dayまでの投与量ではいかなる副作用も示さなかった。

PPSは経口投与や静脈内投与では血液脳関門を通過せず、脳室内に直接投与する必要がある。PPSの脳室内持続投与法は、プリオン感染マウスにおける実験で発症を遅延させる効果が証明された。臨床効果のみならず、マウスの脳病理において、異常プリオン蛋白の蓄積が投与側で抑制されていることが認められた。ヒトプリオン病に対する臨床治験は、2003年英国で変異型CJDに対して同治療の1例目が行われて以降、全世界で現在までに15例のプリオン病患者に同治療が行われ、患者での安全性と有効性が評価されているところである(文献23, personal communication)。

現在、福岡大学で作成したプロトコルは、腹部皮下体内埋め込み型微量注入器具の留置および脳室内カテーテルの留置手術を行い、術後8日目より

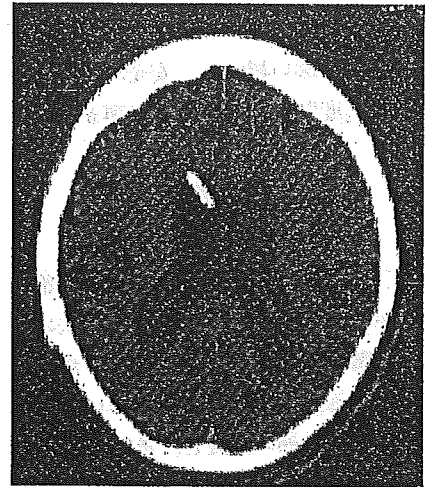


図1 脳室内カテーテルの留置後のCT

PPS投与を低濃度で開始する。その後、漸増し維持量に到達させる。至適維持量に関してはまだ検討中である。その後、4週間ごとに腹部皮下の微量注入器具中の薬液を新しい薬液に交換充填する。本邦では1例目のPPSの脳室内持続投与は孤発性CJDの66歳女性例に行われた<sup>24)</sup>。治療開始は発症から9ヵ月後であった。PPSはプロトコルどおりに腹部に埋め込んだ持続注入ポンプから右側脳室に注入された。手術後1週間はポンプに生食を満たし、頭部CTで出血がないことを確認した後(図1)にPPSを低濃度(1 μg/kg/day, 50 μg/day)より始め、徐々に濃度を上げて60 μg/kg/day (3.0 mg/day)とした。現在、同濃度にて維持療法中である。治療開始7ヵ月現在、明らかな臨床効果を示していない。一方で、血算、生化学、凝固検査、頭部CTで副作用は認められない。現在のところ、PPS脳室内持続投与



法は抗プリオン作用を持つ、最も期待できる方法と考えられるが、今後は経過の注意深い観察と、安全域を考えた治療濃度設定を検討する必要がある。

### おわりに

プリオン病の基礎研究から臨床治療に至るまでを概説したが、治療法の開発に関して、今ようやく始まったばかりである。今後の発展のためには、この疾患の病態の把握と、薬物の機序に関してのさらなる研究、知見や、診断学の向上による早期の発見、治療評価法の確立、そして今回のPPS治療にみられるように、脳外科医、麻酔医や手術室のスタッフの協力など、集学的な取り組みが必要である。

### ●文献

- 1) Prusiner SB: *Annu Rev Microbiol* 48: 655-686, 1994
- 2) Harris DA: *Adv Protein Chem* 57: 203-228, 2001
- 3) Brandner S, Isenmann S, Raeber A et al: *Nature* 379: 339-343, 1996
- 4) 中村好一, 渡邊 至, 佐藤 猛ほか: クロイツフェルトヤコブ病サーベイランス結果. 厚生労働科学研究費補助金 難病性疾患克服研究事業 プリオン病及び遅発性ウイルス感染に

関する調査研究 平成15年度分担研究報告書 pp 33-39

- 5) Hsich G, Kenney K, Gibbs CJ et al: *N Engl J Med* 335: 924-930, 1996
- 6) Beaudry P, Cohen P, Brandel JP et al: *Dement Geriatr Cogn Disord* 10: 40-46, 1999
- 7) Kropp S, Zerr I, Schulz-Schaeffer WJ et al: *Neurosci Lett* 261: 124-126, 1999
- 8) Brandel JP, Beaudry P, Delasnerie-Laupretre N, Laplanche JL: *Rev Neurol* 155: 148-151, 1999
- 9) Tranchant C, Geranton L, Guiraud-Chaumeil C et al: *Neurology* 52: 1244-1249, 1999
- 10) Will RG, Ironside JW, Zeidler M et al: *Lancet* 347: 921-925, 1996
- 11) 山田正仁ほか: CJDサーベイランスにおける問題例: わが国における変異型CJD疑い例および孤発性CJD診断困難例の検討. 厚生労働科学研究費補助金 難病性疾患克服研究事業 プリオン病及び遅発性ウイルス感染に関する調査研究 平成15年度班会議抄録集 pp 10
- 12) Brown P: *Neurology* 58: 1720-1725, 2002
- 13) Love R: *Lancet* 358: 563, 2001
- 14) Doh-Ura K, Iwaki T, Caughey B: *J Virol* 74: 4894-4897, 2000
- 15) Korth C, May BC, Cohen FE, Prusiner SB: *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 9836-9841, 2001
- 16) 山田達夫, 坪井義夫, 中島雅士ほか: クロイツフェルトヤコブ病患者に

おける抗マリア薬、キナクリン、キニーネ治療の効果と副作用に関する研究. 厚生科学研究費補助金 こころの健康科学研究事業 即戦力的クロイツフェルト・ヤコブ病治療用の確立に関する研究. 平成15年度分担研究報告書 pp 11-22

- 17) 山田達夫, 坪井義夫, 中島雅士ほか: クロイツフェルトヤコブ病患者に対するキナクリン治療-31症例における効果、副作用の分析-厚生労働科学研究費補助金 難病性疾患克服研究事業 プリオン病及び遅発性ウイルス感染に関する調査研究 平成15年度分担研究報告書 pp 113-124
- 18) Caughey B: *Biochem Neurodegen Disord* 22: 163-167, 1994
- 19) Caughey B, Raymond G: *J Virol* 67: 643-650, 1993
- 20) Perez M, Wandosell F, Colaco C, Avila J: *Biochem J* 335: 369-374, 1998
- 21) Shyng SL, Lehmann S, Moulder K, Harris D: *J Biol Chem* 270: 30221-30229, 1995
- 22) Doh-ura K, Ishikawa K, Murakami-Kubo I et al: *J Virol* 78: 4999-5006, 2004
- 23) Todd NV, Morrow J, Doh-ura K et al: *J Infect Dis* 50: 394-396, 2005
- 24) 山田達夫, 坪井義夫: ペントサンポリサルフェート脳室内持続投与法の臨床試験に関する研究. 厚生科学研究費補助金 こころの健康科学研究事業 プリオン病の画期的治療法に関する臨床研究と基礎研究 平成16年度分担研究報告書 pp 8-9

# プリオンイメージングの試み

石川 謙介 堂浦 克美

## ■ はじめに

近年の我が国や世界各国での BSE 発生により、感染牛由来品の摂取を原因とする変異型 CJD の勃発が危惧されている。多発している汚染脳硬膜移植による医原性 CJD を加えると、潜在的なハイリスク群が少なからず想定され、プリオン病の予防・治療法の確立が急務となっている。現在、臨床研究が加速しており、ペントサン硫酸の脳室内持続投与など、日本発のプリオン病治療法の有効性が日本や海外で検討されている<sup>1,2)</sup>。

プリオン病治療の臨床試験では、2つの大きな問題に直面する。まず画像検査や生化学的検査による発症前診断が不可能であるため、治療的介入は症状出現後の進行した状態となりやすいこと、さらに、その効果については比較できる客観的な評価に至りがたいことである。治療を早期から開始し患者の生命予後改善を目指すには、現在よりも特異的かつ迅速な診断法の開発が不可欠である。そこで、我々は、プリオン病に特異的である異常なプリオン蛋白の脳組織への沈着を画像化する方法(プリオンイメージング)の開発研究を行っている。

## プリオンイメージングの試み

プリオン病の画像診断に関しては、頭部 MRI 拡散強調画像(DWI)が早期から異常信号を捉えることが可能で、臨床的に有用であると近年報告されている<sup>3)</sup>。その所見は特異的ではあるものの、病勢の進行とともに信号域や強度が変化し、対応する病理所見は海綿状変化やグリオシスなどとされるが、定説には至っていない。病勢診断には、プリオン病共通の病理所見である異常プリオン蛋白沈着を反映するイメージングが望まれる。

いしかわ けんすけ 東北大学/大学院医学系研究科プリオン蛋白分子解析分野  
 どううら かつみ 同 教授

0289-0585/06/¥500/論文/JCLS

プリオン病のみならず神経変性疾患の治療や診断については展望が開けつつあり、非侵襲的な画像診断に PET(ポジトロン断層撮影)や SPECT(シングルフォトン断層撮影)などの核医学的検査を用いて、脳内の循環代謝や神経伝達機能、神経病理学的変化に関する情報を得ることが有用とされている。特にアルツハイマー病患者の脳内アミロイド沈着(老人斑および神経原線維変化)をモニターする診断用プローブの報告が相次いでいる。プリオン仮説に従えば、プリオン病の病原因子とされる異常型プリオン蛋白は宿主に存在する正常型プリオン蛋白の異性体で、プリオン蛋白内の  $\alpha$  ヘリックス構造が  $\beta$  シート構造に高次構造変換されたものである。この異常型プリオン蛋白はアミロイド様線維として存在するため、我々は既存の  $\beta$  アミロイド画像化プローブをプリオン病へ応用し検討を行った<sup>4)</sup>。

アルツハイマー病脳に特徴的な病理所見、特に  $\beta$  アミロイドからなる老人斑を標的としたプローブ候補として報告されている化合物は主に、以前からアミロイド染料として使用されてきたチオフラビン T やコンゴレッドに由来する。我々はまず、チオフラビン T 類似化合物 BTA-1(2-[4'-(methylamino)phenyl] benzothiazole)、およびコンゴレッド類似化合物 BSB[(trans, trans)-1-bromo-2,5-bis-(3-hydroxycarbonyl-4-hydroxy)styrylbenzene] に注目した(図 1)。BTA-1 はチオフラビン T からメチル基を除き、電荷を中性化して脳内移行性を改善したもので、他方の BSB はコンゴレッドのジアゾ結合による発癌性などの問題をクリアしたうえで、分子量を小さくして脳に入りやすくしたものである。両化合物は患者脳病理組織中のアミロイド病変や、アルツハイマー病モデルマウスの脳内アミロイド病変と結合し、蛍光顕微鏡下ではシグナルを発することが知られている<sup>5,6)</sup>。特に BTA-1 誘導体を標的とした化合物は Pittsburgh Compound-B として既に海外で PET 臨床試験が行われ、アルツハイマー病患者群では病

部位にプローブが集積することが報告されている<sup>7)</sup>。特異的なプリオン病診断法が未だ存在しない中で、他の脳アミロイドーシスのために開発されたプローブ化合物をプリオン病モデルに応用することは重要であり、治験過程においてクリアすべき安全性試験などを考慮すると臨床研究に直結しやすいといえる。

まず、化合物溶解液を様々な種類のヒトプリオン病の脳病理組織にふりかけて、病変が描出されるかを検討した。比較検討のために同一標本において抗プリオン蛋白抗体による免疫染色を行った。遺伝性プリオン病である Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) 病、変異型 CJD (vCJD) の標本において、プラーク型の異常プリオン蛋白沈着(大型のアミロイド斑)を蛍光染色した(図2, BSB による描出)。一方、散発性 CJD (sCJD) 脳においては、約 10% の症例に認められるアミロイド斑は染色されたが、多くを占めるびまん性の微細顆粒状沈着(いわゆるシナプス型分布)は描出されなかった。また、硬膜移植後 CJD 症例における空胞周囲の異常プリオン沈着も蛍光染色されなかった。いずれの化合物による組織染色も約 1 時間で終了し、免疫染色に比べると大幅な簡略化が可能であった。

検討したプローブ化合物は、プリオン病モデルマウス脳組織標本においてもプラーク型の異常プリオン蛋白沈着を検出したことから、次に *in vivo* での有用性を検討した。モデルマウスはプリオン蛋白を過剰発現した遺伝子改変マウスにプリオン感染脳乳剤を脳内接種したもので、ほぼ一定期間内に失調などの神経症状を発症し死亡する。実験には、明らかな臨床症状は呈さないが、免疫染色で脳内病変が確認されている時期(接種して約 6 週後)のマウスを用いて、化合物溶解液を尾静脈より投与した。一定時間後に取り出した脳の凍結切片を作成して蛍光顕微鏡で観察したところ、脳室に沿った白質にプラーク型の異常プリオン蛋白沈着を示す蛍光シグナルが検出され、抗プリオン蛋白抗体を用いた免疫染色で特異性を確認した(図 3)。化合物投与後の様々な経過時間でシグナルを観察すると、直後には髄膜血管などへの非特異的な沈着が強く認められ、18 時間後ま

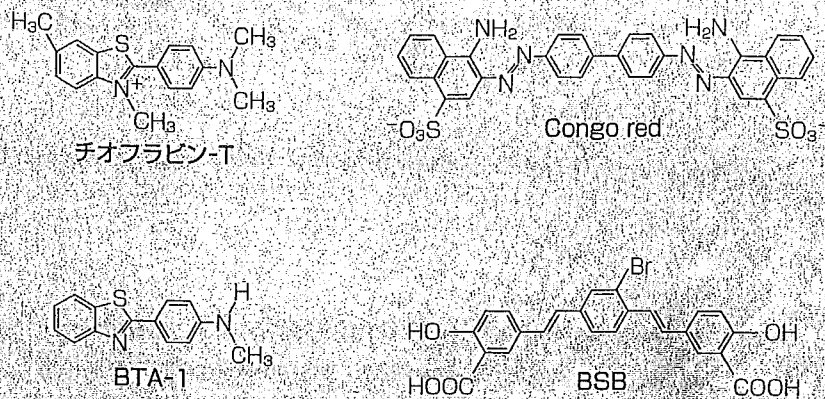


図1 チオフラビン-T類似化合物BTA-1および Congo red類似化合物BSB

することは困難であった。以降は非特異的背景を認めず、化合物のシグナルは投与 42 時間後においても確認された。

さらに我々は検出感度の問題を考慮して、類似のプローブ候補化合物を放射性標識し、病理組織標本およびモデルマウス生体を用いて同様の検討を行ったが、非特異的な結合によるノイズが問題となっている。アミロイド親和的な化合物は脂質にも親和性を有するため、脳白質線維や血管内の沈着物(アテローム動脈硬化や脳血管アミロイドーシスなど)に結合してしまう可能性が大きい。組織染色では分別(染色液の洗浄)条件、マウス実験では化合物投与量と経時的な条件の更なる検討が必要である。

### プリオンイメージングの現状および展望

本研究では、*in vitro* および *in vivo* のレベルで  $\beta$  アミロイドプローブ化合物がプリオン病脳のプラーク型異常プリオン蛋白沈着を描出可能であることが明らかになった。しかしプリオン病の多くを占めているのは sCJD であり、その病理所見の中心となるシナプス型のプリオン蛋白沈着を検出することが今後の大きな課題である。プリオンイメージングについては、我々の他には主に UCLA の研究グループからの報告があるが、病理組織標本におけるプラーク型病変の検出に留まっている<sup>8)</sup>。今後は脳内移行性のみならず、細胞内への移行性も高い化合物をみつける必要がある。

上述の化合物 BSB では、他のコンフォメーション病の病理組織標本におけるアミロイド染色も報告されてい

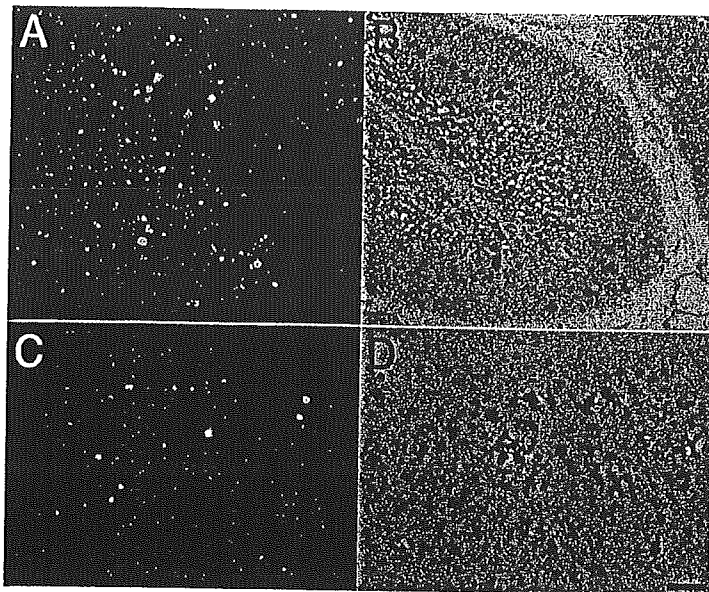


図2 ヒトプリオン病剖検脳組織標本における異常プリオン蛋白沈着のイメージング  
 プラーク型のプリオン蛋白沈着がBSB溶解液により蛍光染色され(A, C), 続いて免疫染色で比較検討した(B, D). 上段A, BはGSS病患者の小脳, 下段C, DはvCJD患者の大脳皮質. スケールバーは100ミクロン.

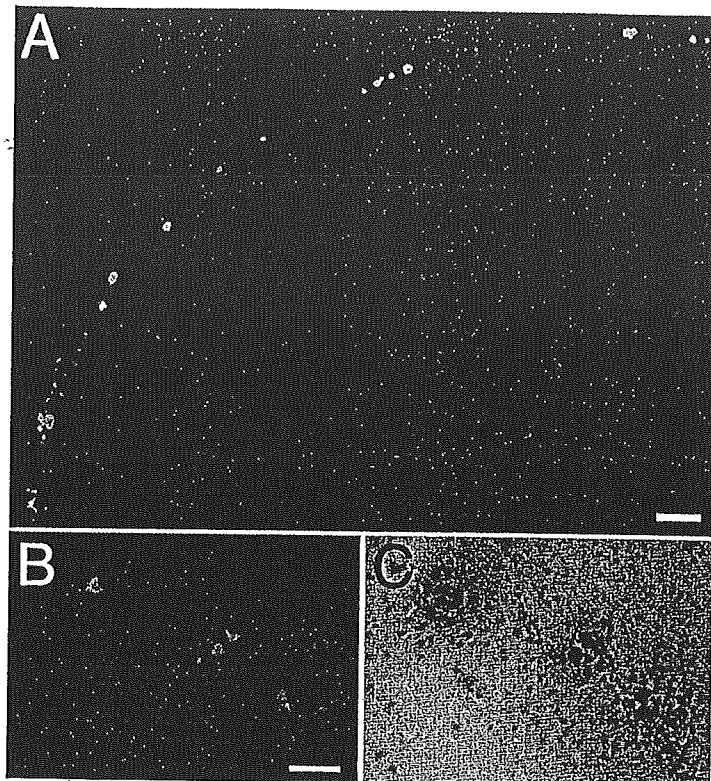


図3 プリオン病モデルマウス脳における病変の生体イメージング (文献4より一部改変)  
 発症前の罹患マウスにBSB溶解液を静脈内投与し, 24時間後に取り出した脳組織においてプラーク型病変が蛍光顕微鏡下で観察された(A, 冠状断). BTA-1においても同様に大脳皮質と海馬間の大脳白質におけるシグナルを認め(B), 免疫染色で特異性を確認した(C). スケールバーは100ミクロン(A)と25ミクロン(B, C).

る<sup>9,10</sup>. アルツハイマー病の老人斑や神経原線維変化に加えて, ピック病のピック小体, 進行性核上性麻痺の coiled body なども描出され, 多種類の脳アミロイド蛋白に結合する. イメージングに際しては疾患特異性も今後の課題であるが, 検出された病変の分布によって, 診断に有意な情報が得られるものと期待される. また, プリオン病治療の評価においても, 病変の縮小など客観的な効果判定には一助となるであろう.

高次脳機能を解明する核医学的画像検査の中心的役割を果たしてきたPETは, 半減期が短いポジトロン標識化合物を使用するために, プロープの安定的供給とサイクロトロン併設が不可欠である. 汎用性や医療経済的な障壁は存在するが, 今後あらかじめ症例を絞り込んだ研究ベースで治験対象の適否や治療効果判定には使用されていくであろう. 近年, プリオン病モデルマウスに対し9.4テスラの超高磁場MRI装置を用いたイメージング<sup>11</sup>や, アルツハイマー病モデルマウスに対しフッ素による核磁気共鳴に着目したMRI画像化が報告されている<sup>12</sup>. PET画像検査での成果は, 着実にSPECTそしてMRIに移行しつつあるが, 微細な構造物の検出や疾患特異性を高めるには, 異常プリオン蛋白沈着を直接の標的としたプロープ化合物の開

発がやはり不可欠となる. 現在, アミロイドイメージングに関しては複数の研究グループから報告が相次いでいるが, コンゴレッド類似化合物は分子量が大きく脳移行性の問題があるため, プロープ候補化合物開発はチオフラビン類似化合物, もしくはまったく新しい骨格を有するものがリードしている.

### プロープ化合物のさらなる可能性

ところで, いくつかのアミロイド結合化合物は, 基礎実験レベルにおいてアミロイド凝集を阻害することが以前から知られている. 我々はプリオン病モデル培養細胞を用いて, アミロイドプロープ化合物が異常型プリオン蛋白の産生を阻害することを明らかにし, モデルマウスでも有意な治療効果(延命効果)を確認した<sup>4</sup>. イメージングの結果と合わせると, 異常なプリオン蛋白凝集と直接結合すること

による抗プリオン作用が推定される。プローブ化合物はプリオン病の診断薬のみならず、治療薬としても応用可能であり、その適性は脳内移行性や滞留時間によって検討される。つまり、診断プローブは脳からのクリアランスは短い方が臨床的に望ましいが、治療薬の場合は脳内滞留が長いほど異常なプリオン蛋白凝集との結合による効果が期待される。

現在におけるプリオン病治療戦略の中心は、異常型プリオン蛋白の産生阻害である。先述のプリオン仮説は未だ直接の実証には至っていないが、病変における異常なプリオン蛋白沈着に注目して、病勢や薬物治療効果を評価することは今後も優先されるであろう。我々は新たな構造をもつ

プローブ候補化合物で同様の検討を行っており、マウス体重当りの投与量はこれまでの1/100以下でプリオンイメージングが可能となった。これらはアルツハイマー病脳組織標本では、老人斑のみならず微細な細胞内アミロイドである神経原線維変化を描出していることから、シナプス型の異常プリオン蛋白沈着の検出も十分に期待される。また、神経系における異常なプリオン蛋白凝集のイメージングのみならず、体液などを用いた体外診断への応用も考えられる。さらに、このプリオンイメージングの試みにより、感染の成立機序などプリオン病の病態に関わる新たな手掛りが得られる可能性も期待される。

#### 文 献

- 1) Doh-ura K, Ishikawa K, Murakami-Kubo I, et al. Treatment of transmissible spongiform encephalopathy by intraventricular drug infusion in animal models. *J Virol.* 2004 ; 78 : 4999-5006.
- 2) Todd NV, Morrow J, Doh-ura K, et al. Cerebroventricular infusion of pentosan polysulphate in human variant Creutzfeldt-Jakob disease. *J Infect.* 2005 ; 50 : 394-6.
- 3) Shiga Y, Miyazawa K, Sato S, et al. Diffusion-weighted MRI abnormalities as an early diagnostic marker for Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology.* 2004 ; 63 : 443-9.
- 4) Ishikawa K, Doh-ura K, Kudo Y, et al. Amyloid imaging probes are useful for detection of prion plaques and treatment of transmissible spongiform encephalopathies. *J Gen Virol.* 2004 ; 85 : 1785-90.
- 5) Mathis CA, Bacskai BJ, Kajdasz ST, et al. A lipophilic thioflavin-T derivative for positron emission tomography (PET) imaging of amyloid in brain. *Bioorg Med Chem Lett.* 2002 ; 12 : 295-8.
- 6) Skovronsky DM, Zhang B, Kung MP, et al. In vivo detection of amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000 ; 97 : 7609-14.
- 7) Klunk WE, Engler H, Nordberg A, et al. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann Neurol.* 2004 ; 55 : 306-19.
- 8) Bresjanac M, Smid LM, Vovko TD, et al. Molecular-imaging probe 2-(1-[6-[(2-fluoroethyl) (methyl) amino]-2-naphthyl] ethylidene)malononitrile labels prion plaques in vitro. *J Neurosci.* 2003 ; 23 : 8029-33.
- 9) Schmidt ML, Schuck T, Sheridan S, et al. The fluorescent Congo red derivative, (trans, trans)-1-bromo-2,5-bis-(3-hydroxycarbonyl-4-hydroxy)styrylbenzene (BSB), labels diverse beta-pleated sheet structures in postmortem human neurodegenerative disease brains. *Am J Pathol.* 2001 ; 159 : 937-43.
- 10) Ando Y, Haraoka K, Terazaki H, et al. A novel tool for detecting amyloid deposits in systemic amyloidosis in vitro and in vivo. *Lab Invest.* 2003 ; 83 : 1751-9.
- 11) Sadowski M, Tang CY, Aguinaldo JG, et al. In vivo micro magnetic resonance imaging signal changes in scrapie infected mice. *Neurosci Lett.* 2003 ; 345 : 1-4.
- 12) Higuchi M, Iwata N, Matsuba Y, et al. 19 F and 1 H MRI detection of amyloid beta plaques in vivo. *Nat Neurosci.* 2005 ; 8 : 527-33.