

6. 本研究班による介護予防の具体策と成果

2) テーマ別

ロ. 認知症予防

芳野 弘、櫻井 孝

はじめに

高齢者の認知症が増加している。認知症をきたす2大疾患は血管性痴呆とアルツハイマー病であるが、いずれの疾患も慢性的な脳組織の傷害が基盤となる。その治療では、原因となった脳障害の進行防止と残存脳機能の最大活用が課題となる。近年、血管性痴呆のみならずアルツハイマー病に対してもライフスタイル・生活習慣病が危険因子であることが明らかとなり、原疾患の増悪予防の観点からは、ライフスタイル・生活習慣病の管理が重要である。認知症の前駆状態とされる MCI(Mild cognitive impairment)に対しても、薬物療法、運動・食習慣の予防介入が行われている。また脳の残存機能の活用と言う視点からも、リハビリテーションやケアによる効果は大きい。

高齢者では健常な生活を営んでいる人でも、次第に食が細くなり体力の衰えが生じる。体力の減退は筋力・柔軟性の低下をきたし運動を困難とする。しかし運動の習慣化により、高齢者でも成人と同様に、循環・呼吸機能、糖・脂肪代謝が改善することが知られている。循環・呼吸系機能が改善されると、日常生活の向上に直接反映され、抑うつや不安を軽減し、ADL・QOL の向上が期待できる。介護者からみても運動機能や四肢の可動性が保たれていると、身体的に精神的にも介護負担感は少なく済み、そのことが介護される高齢者にも良い影響をきたす。さらに有酸素運動は中枢神経系の機能の改善に直接的に働くことが明らかとなってきた。そこで本稿では認知症の予防、進展の抑制をめざした運動習慣について述べたい。

運動が高齢者の脳機能に及ぼす作用

高齢者の脳では、正常範囲の脳の老化においても、脳循環量、脳酸素消費率、脳のグルコース代謝率が低下し、種々の神経伝達物質の代謝が低下する。運動により脳循環や脳代謝が改善すれば、脳機能も改善することが期待される。動物実験では有酸素運動により、加齢に伴うドーパミンの減少が抑制されるなどの神経化学的な変化や学習能力の改善が示されている。マウスなどの齧歯類の海馬では一生を通して神経発生が認められるが、マウスを回転輪やトンネルなどの運動具や遊具のある豊かな環境で飼育すると、対照群に比して新生神経細胞が多く残存し、海馬の体積もより大きいと言う(Nature 386: 493-495, 1997)。

人での研究では、運動を行っている高齢者はより高い認知機能を有することが知られている。60-75歳の124人の高齢者にウォーキング(有酸素運動)を半年以上継続したところ、前頭葉や前頭前野に関わる遂行機能が高まったという報告がなされた(Nature

400: 418-419, 1999)。これに対して重量挙げ群（無酸素運動）では効果が見られなかった。前頭葉機能、記憶は加齢により低下しやすい脳機能であるが、有酸素運動により高齢者の脳機能の少なくとも一部分が改善され得ることを示したエビデンスとして注目される。最近、認知障害のない高齢者で一回あたり 15 分以上の運動（ワーキング、自転車、エアロビクス、水泳、筋力トレーニング、ストレッチングなど多種の運動）を週 3 回以上行なう習慣があると、平均 6.2 年の観察期間で痴呆の発症が有意に低下したとの前向き研究が発表された（図 1：Ann Intern Med 144:73-81, 2006）。また身体能力が低い高齢者ほど運動の痴呆予防効果は高いと言う。しかしこれに相反する結果も得られている（N Engl J Med 348: 2508-2516, 2003）。Rogers らは、平均年齢 65 歳の高齢者で、退職をせずに仕事を継続している群、定期的に身体運動に参加している群、運動をほとんどしない退職者群の 3 群に分け、脳機能の変化を観察した（J Am Geriatr Soc 38: 123-128, 1990）。運動をしない退職者では他の 2 群に比べて 4 年後の脳血流、認知テストの成績が低下していた。このことは仕事と身体運動の継続は脳血流と認知機能の低下を抑制できる可能性を示唆している。

運動には有酸素運動のほか、筋力トレーニング、ストレッチングがある。約 3 ヶ月の筋力トレーニングにより、下肢を中心とする全身の運動機能が向上した例があることから、2003 年度からは介護保険でも「高齢者筋力向上トレーニング事業」が追加された。しかし筋力トレーニング、ストレッチングの認知機能に及ぼす直接的な影響についてはなお不明な点が多い。

運動による認知症の予防

認知症の予防のターゲットになるのは、主として脳血管性痴呆であるが、アルツハイマー病に対する進行予防法も検討されている。アルツハイマー病に対して、身体活動の低さは危険因子として働く（Neurology 40: 1698-1707, 1990）。逆に中高年期の活動性の高さは抑制的に働くとの知見もある（PNAS 98: 3440-3445, 2001）。最近のカナダの研究では、規則的な運動習慣がアルツハイマー病の発症を抑制したとされる（Am J Epidemiol 156: 445-453, 2002）。本邦では久山町研究があり、65 歳以上の痴呆のない高齢者を 7 年間観察したところ、定期的に運動する、あるいは中等度～強度の肉体労働を行うものでは、アルツハイマー病が少なかったという。

一方、血管性痴呆に関しては、久山町研究で年齢、収縮期血圧、脳卒中の既往、飲酒、長谷川式簡易知能評価スケール低値が血管性痴呆の独立した危険因子であることが示された（Neurology 45: 1161-1168, 1995）。血管性痴呆の予防には、これらこれらの危険因子のコントロールが必要であり、運動は高血圧、高脂血症、糖尿病、不整脈などの脳血管障害の危険因子の管理に有効である（JAMA 281: 1112-1120, 1999）。

痴呆性高齢者に本格的に運動介入試験を行った報告はいまだ少ない。運動により認知機能に改善が認められたとする研究（Age Ageing 6: 58-64, 1977; J Nutr Health Aging 4:

109-113, 2000)、関連はなかったとする研究 (Neurology 51: 1386-1390, 1998) がみられる。以上のような研究では、歩行や体操などの単純な動作からなる運動での報告であり、スポーツとよべる運動はなかった。“スポーツ”とは一定のルールに沿って行動を企画し、勝敗を競うものであり、認知性高齢者にはルールや面白さの理解は困難と思われる。運動による痴呆の予防にはある程度の期待が持てるが、どのようなスポーツが良いかは不明である。これまでの研究を概観すると、歩行よりもいくらか強い有酸素運動が適当で、物忘れが目立ってきた場合には、体操、卓球、テニスといった簡単な球技で昔の記憶で行えるようなものが良いと思われる。

痴呆性高齢者の運動機能と運動介入

痴呆性高齢者では運動機能が低下している。運動やスポーツをはじめる前に、問診、医学的検査、体力測定が必要であることは言うまでもない。アルツハイマー病、血管性痴呆、び慢性レビー小体病で運動機能を比較した研究では、び慢性レビー小体病で最も障害が強かった (Int J Geriatr Psychiatry 15: 897-903, 2000)。

痴呆性高齢者が運動を長期間継続できるかについても多くの問題が存在する。アルツハイマー病 30 名 (61-90 歳、MMSE 平均 17.8 点) にトレーニングプログラムを課したところ、約 40% が全プログラムを完了できたが、約 20% がプログラムの 50% 以上を完了し、約 40% はプログラムの 50% に達しなかったという (J Rehabil Res Dev 35:411-419, 1998)。トレーニングにともない、めまい、筋肉痛などの訴えや、転倒あるいは運動への理解が得られずトレーニングの実施すら困難なこともある。痴呆性高齢者で運動介入を行うには、介護者の協力が必要であり十分な説明が必要である。運動継続に対する動機づけに関して Tappen らの報告がある。即ち、高齢アルツハイマー病患者に一回 30 分、週 3 回の歩行あるいは会話、歩行と会話の 3 種類プログラムを 16 週間施行し、生活機能と関連した運動能力に及ぼす影響を観察した (Alzheimer Dis Assoc Disord 14: 196-201, 2000)。その結果、16 週間の運動機能の低下が、歩行のみの群では 18.8%、会話のみの群では 20.9%、歩行と会話の群では 2.5% であった。またプログラムを完了できたものの割合は、会話のみ群 (90%)、歩行と会話群 (75%)、歩行のみ群 (57%) であった。この結果は会話が運動プログラムに対するコンプライアンスの向上に有用であることを示している。会話のほか、音楽、歌などと運動の併用による運動への誘導も重要であろう。著者らは運動による脳機能への効果を視覚的に説明できる手段として近赤外線スペクトロスコピーを用いて運動への動機付けを行っており、6 ヶ月以上にわたり良好な成績を得ている (図2)。

文献

1. 谷崎弓裕、清原 裕：脳血管障害を中心とした生活習慣病 老年精神医学雑誌 15：36-41、2004

2. 西村 健：痴呆性老人と運動 老年精神医学雑誌 12：1387-1390, 2001
3. 朝田 隆：海外における痴呆性老人とスポーツ 老年精神医学雑誌 12：1412-1417, 2001

キーワード

認知症予防、アルツハイマー病、血管性痴呆、有酸素運動、運動機能

図1

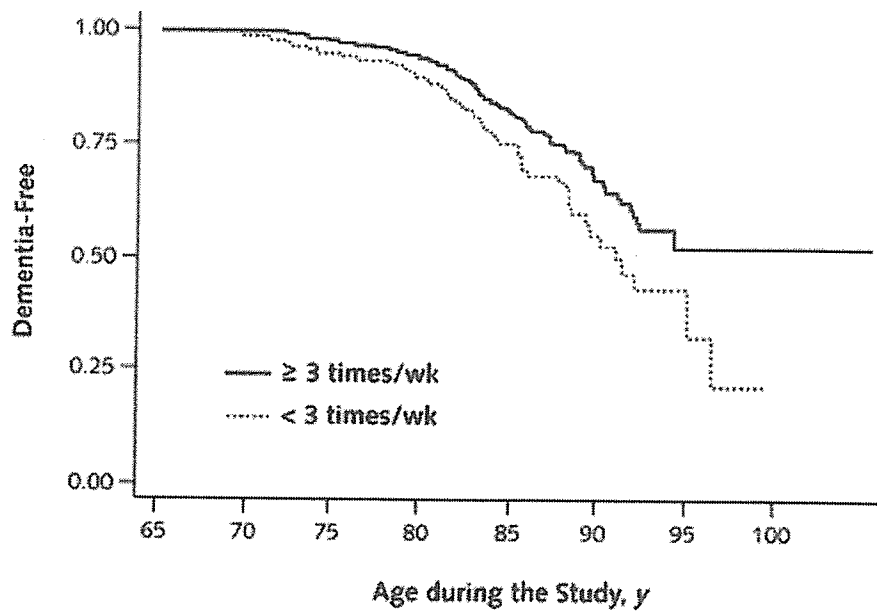
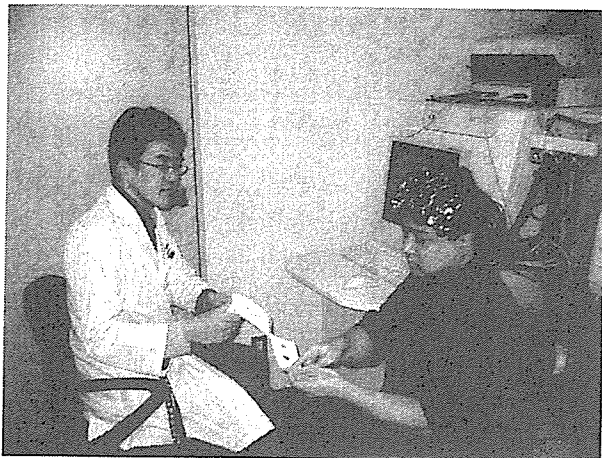


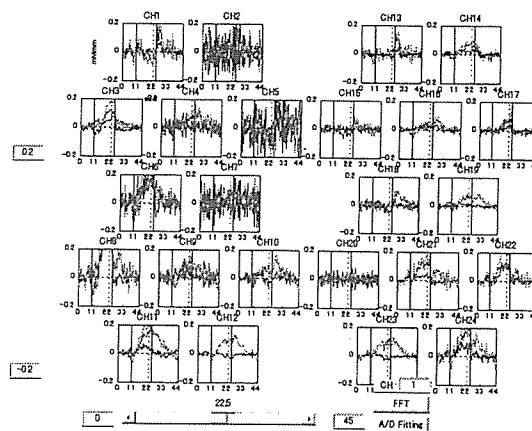
図1 週3回以上の運動する高齢者(実線)では週3回未満の運動(破線)に比べ痴呆発症は少ない。

図2 近赤外線スペクトロスコピーを用いた脳機能測定の実際

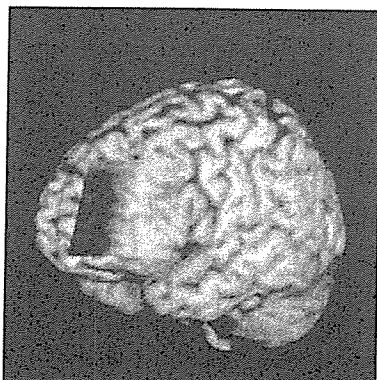
A. 実際の検査の測定風景



B. 測定結果



C. 頭部 MRI 画像との重ね合わせ



Chapter 23

Cerebrospinal fluid phosphorylated tau protein at serine 199 is a useful diagnostic biomarker in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment

K Urakami, H Arai, N Itoh, K Ishiguro, H Oono, M Taniguchi, K Wada-Isoe, Y Wakutani, S Kuzuhara, H Sasaki, K Nakashima, K Imahori

INTRODUCTION

Our recent studies of biological markers in Alzheimer's disease (AD) have focused specifically on analysis of cerebrospinal fluid (CSF) tau protein levels and amyloid β -protein ending at amino acid 42.¹⁻⁴ Although CSF total tau (t-tau) level in AD was significantly higher than in controls, there were overlaps between AD and non-AD dementias.¹⁻³ One possible explanation is that the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit we used detects not only phosphorylated but also normal tau. Therefore, we

developed the sandwich ELISA system for phosphorylated tau at serine 199 (p-tau 199) in CSF⁵ and examined 236 cases with AD, 206 cases with non-AD demented and non-demented disease controls, and 95 age-matched normal controls.⁶

SUBJECTS AND METHODS

Table 23.1 shows a summary of the patients' demographic data. We surveyed a total of 537 CSF samples. We also examined CSF p-tau 199

Table 23.1 Summary of patients' demographic data

	No. of patients	Age (years)	Gender (M/F)
Alzheimer's disease (AD)	235*	71 \pm 9	66/172
Normal control	95	57 \pm 16	51/44
Neurological disease control	122	59 \pm 13	70/52
Frontotemporal dementia (FTD)	16*	63 \pm 12	9/7
Progressive supranuclear palsy	21	63 \pm 7	10/11
Corticobasal degeneration	15	64 \pm 4	8/7
Dementia with Lewy body (DLB)	13*	63 \pm 10	8/5
Vascular dementia	23	71 \pm 6	16/7
Meningoencephalitis	18	51 \pm 21	7/11
Creutzfeldt-Jakob disease (CJD)	11*	71 \pm 6	6/5

* Two patients with AD, one patient with FTD, one patient with DLB and four patients with CJD were confirmed by autopsy

levels in a population with mild cognitive impairment (MCI). The MCI group was later subdivided into two different categories. One category was that which eventually later progressed to AD (progressive MCI). The other category was that which later did not progress to AD (non-progressive MCI). Memory complainers were patients who complained about memory disturbance, but were not demented. These constituted the control group. CSF samples were taken into polypropylene tubes by lumbar puncture after informed consent was obtained from each patient and/or family members. Bloody or traumatic CSF samples were excluded from this study. After centrifugation at 1500 rpm for 10 min, the aliquots were stored at -80°C until analysis. CSF levels of

p-tau 199 were measured by a sensitive sandwich ELISA.^{5,6} CSF level of t-tau protein was measured using the sandwich ELISA assay provided by the Innogenetics Company, Belgium.⁷

RESULTS

CSF p-tau 199 levels in the AD group were significantly elevated ($p < 0.001$) compared to those in all the other non-AD groups, including patients with acute neurological conditions such as meningoencephalitis and Creutzfeldt–Jakob disease (CJD) (Figure 23.1). On the other hand, CSF t-tau levels were occasionally very high in the meningoencephalitis and CJD groups,

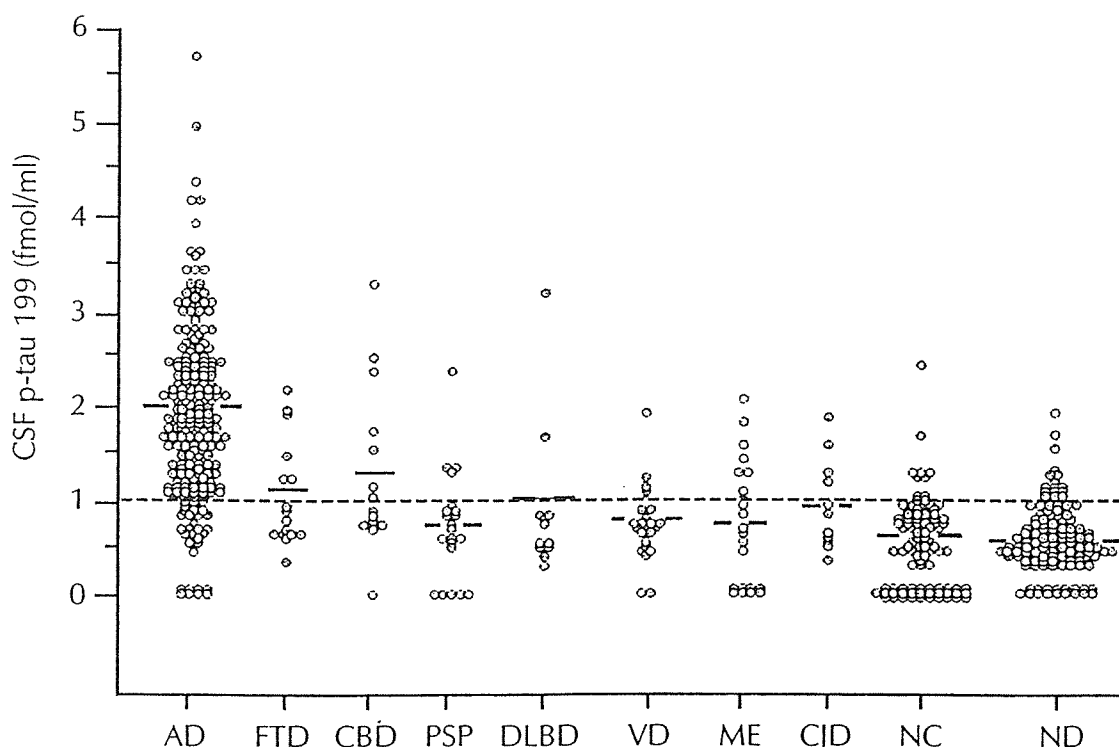


Figure 23.1 The results of cerebrospinal fluid (CSF) phosphorylated tau at serine 199 (p-tau 199) levels, among groups with Alzheimer's disease (AD), frontotemporal dementia (FTD), corticobasal degeneration (CBD), progressive supranuclear palsy (PSP), dementia with Lewy body disease (DLBD), vascular dementia (VD), meningoencephalitis (ME), Creutzfeldt–Jakob disease (CJD), normal controls (NC) and neurological disease controls (ND)

although most CSF t-tau levels were significantly increased in the AD group compared to normal control groups (Figure 23.2).

A receiver operating characteristics (ROC) curve analysis demonstrated that CSF p-tau 199

was more amenable than CSF t-tau to differentiating between AD and non-AD subjects (Table 23.2).

The results of CSF p-tau 199 levels in the progressive MCI group were significantly

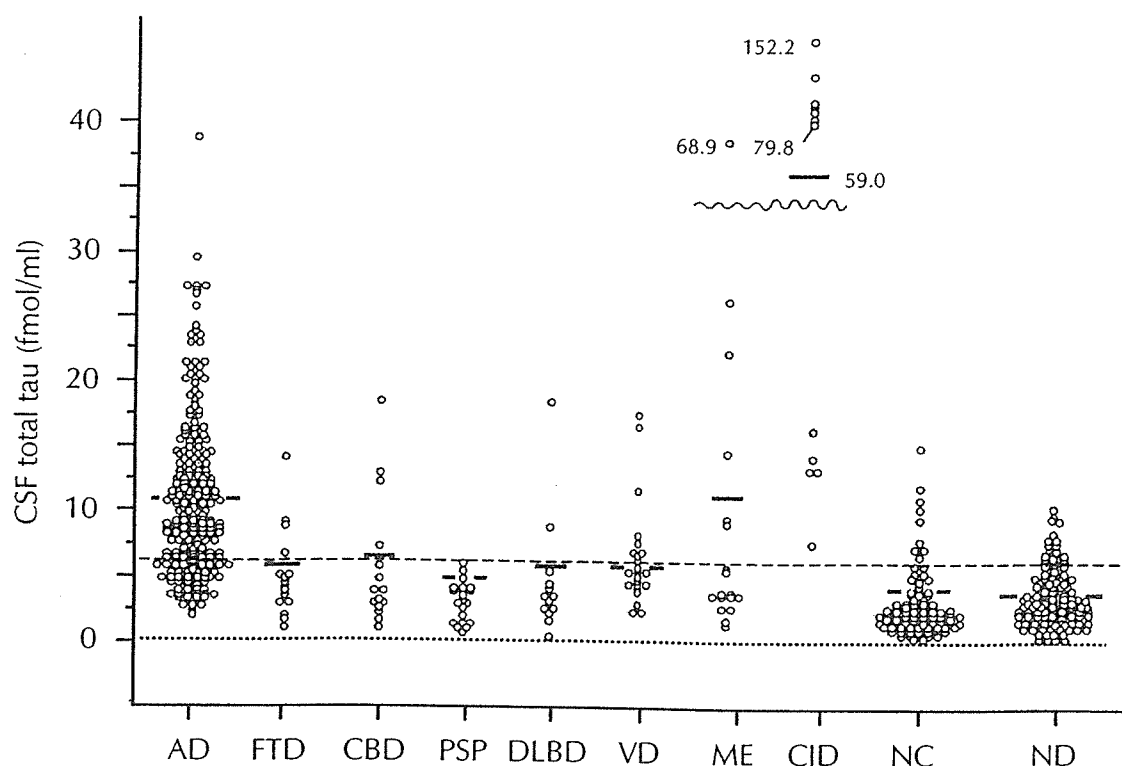


Figure 23.2 The results of cerebrospinal fluid (CSF) total tau levels, among groups with Alzheimer's disease (AD), frontotemporal dementia (FTD), corticobasal degeneration (CBD), progressive supranuclear palsy (PSP), dementia with Lewy body disease (DLBD), vascular dementia (VD), meningoencephalitis (ME), Creutzfeldt-Jakob disease (CJD), normal controls (NC) and neurological disease controls (ND)

Table 23.2 Receiver operating curve analysis

	Cut-off level (fmol/ml)	Sensitivity (%)	Specificity (%)
<i>Alzheimer's disease vs. neurological disease controls and normal controls</i>			
Total tau	4.8	82.7	82.0
p-tau 199	0.96	87.3	87.4
<i>Alzheimer's disease vs. others</i>			
Total tau	6.0	77.1	77.6
p-tau 199	1.05	85.2	85.0

p-tau 199, phosphorylated tau at serine 199

elevated ($p < 0.001$) compared to those in the non-progressive MCI and the control groups (Figure 23.3). We thus propose that CSF p-tau 199 may also be useful for the diagnosis of MCI as it is for AD.

DISCUSSION

In the present study, we examined CSF p-tau 199 levels in a total of 570 living ($n = 562$) or autopsy-confirmed ($n = 8$) subjects with AD and other dementing disorders that resemble AD, as well as normal and neurological diseased controls. A combination of HT-7 (phosphorylation-independent monoclonal antibody; Innogenetics) and the anti-p-tau 199 antibody anti-PS199 allowed us to detect and quantitate

CSF levels of the p-tau 199 by a newly constructed sandwich ELISA.^{5,6} We reported p-tau 199 to be elevated in AD using different diagnostic antibodies that uniquely recognize specific phosphorylation epitopes of tau. We also monitored the CSF t-tau levels side by side in the same patients to assess and compare the sensitivity and specificity by ROC. Here, it should be noted that CSF p-tau 199 is not only the first biomarker that exceeds (over 85%) both sensitivity and specificity as a sole biomarker of AD, but also meets many other recommended criteria as an ideal biomarker.⁸ The improvement of the diagnostic accuracy using CSF p-tau 199 seems to be accomplished not only by enhancing the lowest detection limit but also by eliminating a subset of non-AD patients with high CSF t-tau levels. Indeed, it is noteworthy that a subset of CJD patients with extremely high CSF t-tau levels showed only a mild elevation or an elevation under the cut-off level of CSF p-tau 199.

Nonetheless, our study suggests that there might be a limitation even in the use of the p-tau assay for a clear-cut distinction to be made between AD and certain tauopathies. In fact, the CSF p-tau 199 levels were over the cut-off value in approximately 30% (16/52) of the non-AD tauopathy group (Figure 23.2). Additional studies reported that pathological tau isoforms purified from tauopathy brains were occasionally hyperphosphorylated at serine 199.^{9,10} Therefore, the CSF p-tau 199 testing may be less accurate in distinguishing AD from other types of degenerative dementia or tauopathies. New and/or modified biomarkers would be necessary to differentiate AD from tauopathies in the future.^{11,12}

A substantial proportion of subjects with MCI later developed clinical AD.¹³ At autopsy, subjects with MCI showed a broad spectrum of morphological brain changes including typical AD pathological characteristics. Therefore, MCI

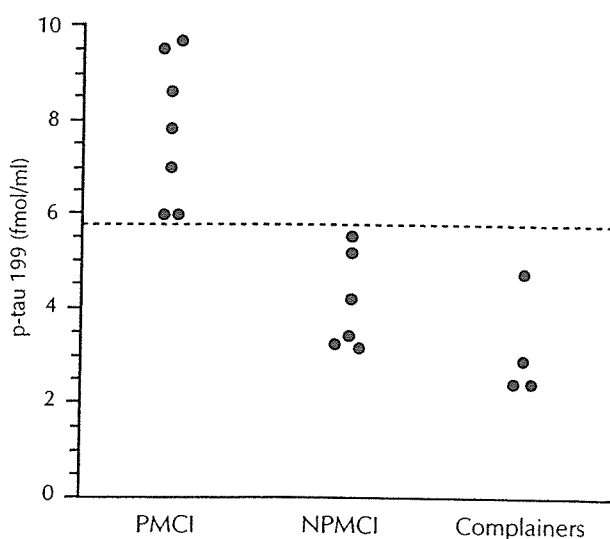


Figure 23.3 The results of cerebrospinal fluid (CSF) phosphorylated tau at serine 199 (p-tau 199) in mild cognitive impairment (MCI). PMCI, progressive MCI (Alzheimer's disease; AD); NPMCI, non-progressive MCI (non-AD). With a cut-off of 5.8 fmol/ml, sensitivity for PMCI 100% (7/7), and specificity for NPMCI 100% (6/6)

partly represents a predementia stage of AD. To maximize the benefit of therapeutic strategies, it is important to identify AD at the stage of MCI. Biochemical markers will be required to establish the diagnosis of MCI.¹⁴ This study showed that CSF p-tau 199 levels in the progressive MCI group were significantly elevated compared to those in the non-progressive MCI and the control groups. We found that CSF p-tau

199 increased in an early stage of AD, the so-called MCI state, and confirmed that CSF p-tau 199 may be useful for the diagnosis of MCI as well as AD.

CONCLUSION

Our results suggest that CSF p-tau 199 is useful for an early diagnosis of AD.

REFERENCES

1. Isoe K, Urakami K, Shimomura T, et al. Tau proteins in cerebrospinal fluid from patients with Alzheimer's disease: a longitudinal study. *Dementia* 1996; 7: 175–6
2. Kanai M, Matsubara E, Isoe K, et al. Longitudinal study of cerebrospinal fluid levels of tau, A β 1-40 and A β 1-42(43) in Alzheimer's disease: a study in Japan. *Ann Neurol* 1998; 44: 17–26
3. Andreasen N, Minthon L, Davidsson P, et al. Evaluation of CSF-tau and CSF-A beta42 as diagnostic markers for Alzheimer disease in clinical practice. *Arch Neurol* 2001; 58: 373–9
4. Takeda M, Tanaka T, Arai H, et al. Basic and clinical studies on the measurement of beta-amyloid (1-42) in cerebrospinal fluid as a diagnostic marker for Alzheimer's disease and related disorders: multicenter study in Japan. *Psychogeriatrics* 2001; 1: 56–63
5. Ishiguro K, Ohno H, Arai H, et al. Phosphorylated tau in human cerebrospinal fluid is a diagnostic marker for Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1999; 270: 91–4
6. Itoh N, Arai H, Urakami K, et al. Large-scale, multicenter study of cerebrospinal fluid tau protein phosphorylated at serine 199 for the antemortem diagnosis of Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 2001; 50: 150–6
7. Vandermeeren M, Mercken M, Vanmechelen E, et al. Detection of tau proteins in normal and Alzheimer's disease cerebrospinal fluid with a sensitive sandwich enzyme-immunosorbent assay. *J Neurochem* 1993; 61: 1828–34
8. The Ronald and Nancy Reagan Research Institute of the Alzheimer's Association and the National Institute on Aging Working Group. Consensus Report of the Working Group on Molecular and Biochemical Markers in Alzheimer's Disease. *Neurobiol Aging* 1998; 19: 109–16
9. Delacourte A, Seargent N, Wattez A, et al. Vulnerable neuronal subsets in Alzheimer's and Pick's disease are distinguished by their tau isoform distribution and phosphorylation. *Ann Neurol* 1998; 43: 193–204
10. Seargent N, Wattez A, Delacourte A. Neurofibrillary degeneration in progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration: tau pathologies with exclusively 'exon 10' isoforms. *J Neurochem* 1999; 72: 1243–9
11. Urakami K, Mori M, Wada K, et al. A comparison of tau protein in cerebrospinal fluid

- between corticobasal degeneration and progressive supranuclear palsy. *Neurosci Lett* 1998; 259: 1–3
12. Urakami K, Wada K, Arai H, et al. Diagnostic significance of tau proteins in cerebrospinal fluids from patients with corticobasal degeneration or progressive supranuclear palsy. *J Neurol Sci* 2001; 183: 95–8
13. Ritchie K, Touchon J. Mild cognitive impairment: conceptual basis and current nosological status. *Lancet* 2000; 355: 225–58
14. Riemenschneider M, Lautenschlager N, Wagenpfeil S, et al. Cerebrospinal fluid tau and beta-amyloid 42 proteins identify Alzheimer disease in subjects with mild cognitive impairment. *Arch Neurol* 2002; 59: 1729–34

REVIEW ARTICLE

Studies on diagnostic markers for Alzheimer's disease

Katsuya URAKAMI,¹ Miyako TANIGUCHI,¹ Masashi INOUE,² Kenji WADA-ISOE,³ Yosuke WAKUTANI³ and Kenji NAKASHIMA³

¹Section of Environment and Health Science, Department of Biological Regulation, Faculty of Medicine, ²Information Media Center and ³Department of Neurology, Institute of Neurological Sciences, Faculty of Medicine, Tottori University, Nishimachi, Yonago, Japan

Correspondence: Dr Katsuya Urakami, Section of Environment and Health Science, Department of Biological Regulation, Faculty of Medicine, Tottori University, Nishimachi 86, Yonago 683-8503, Japan. Email: kurakami@grape.med.tottori-u.ac.jp

Received 8 January 2004; accepted 15 January 2005.

Key words: acetylcholine receptor $\alpha 7$, cerebrospinal fluid, genetic polymorphism, phosphorylated tau protein, touch panel computer.

Abstract

In recent years, Alzheimer's disease (AD) has increased in incidence in Japan and elsewhere, and the marketing of donepezil hydrochloride (Aricept®) has allowed for the treatment of AD. These circumstances have encouraged the development of and research in markers for the early diagnosis of AD. Currently, the measurement of phosphorylated tau protein in the cerebrospinal fluid is considered to provide the most reliable and useful diagnostic marker for AD. For this purpose, a screening test using a touch panel computer can be recommended. The results of our study also suggest that the analysis of acetylcholine receptor $\alpha 7$ genetic polymorphism may be useful as a marker in the treatment with acetylcholine esterase inhibitors.

INTRODUCTION

In recent years, Alzheimer's disease (AD) has increased in incidence in Japan and elsewhere, and it accounts for about half the dementing diseases.^{1,2} The recent marketing of donepezil hydrochloride (Aricept®) has allowed AD to be treated, and researchers have reported its usefulness.^{3,4} Thus, the key to the treatment of AD is whether it can be diagnosed early and reliably. Unfortunately, AD is currently diagnosed solely by exclusion, and the development of diagnostic markers that are more easily accessible to everyone is highly desired. Researchers have tried many approaches in the development of diagnostic markers, of which tau protein-related ones have yielded the best results. This paper reports on the studies of tau protein-related markers and other markers.

DIAGNOSTIC MARKERS FOR AD

The Reagan Institute established to eradicate AD specifies that diagnostic biomarkers for AD must have the following characteristics:⁵ They must reflect the disease status, be minimally invasive to the patient and have a high diagnostic accuracy in the differenti-

ation between AD and other dementing diseases; that is, have a detection rate (sensitivity) of more than 80% for AD patients and a non-detection rate (specificity) of more than 80% for non-AD patients. We have previously reported that cerebrospinal fluid total tau protein satisfies most of the above requirements fairly well, but it does not have a sensitivity or specificity of over 80%. However, in combination with amyloid β -protein, it achieves a sensitivity and specificity of over 80% (called the AD index or AD unit).^{6,7} The use of total tau protein as a biomarker for AD poses particular problems in that meningoencephalitis and Creutzfeldt-Jakob disease are associated with extremely high levels of total tau protein in the cerebrospinal fluid (Fig. 1).⁸ To develop a single marker that meets the above requirements, we analyzed phosphorylated tau protein in the cerebrospinal fluid. Since tau protein in the degenerated neurofibrils in the brains of AD patients is hyperphosphorylated, we postulated that the selective measurement of phosphorylated tau protein would yield better results than the measurement of total tau protein. Focusing on phosphorylation at serine 199, our research group developed a sandwich enzyme-linked immunosor-

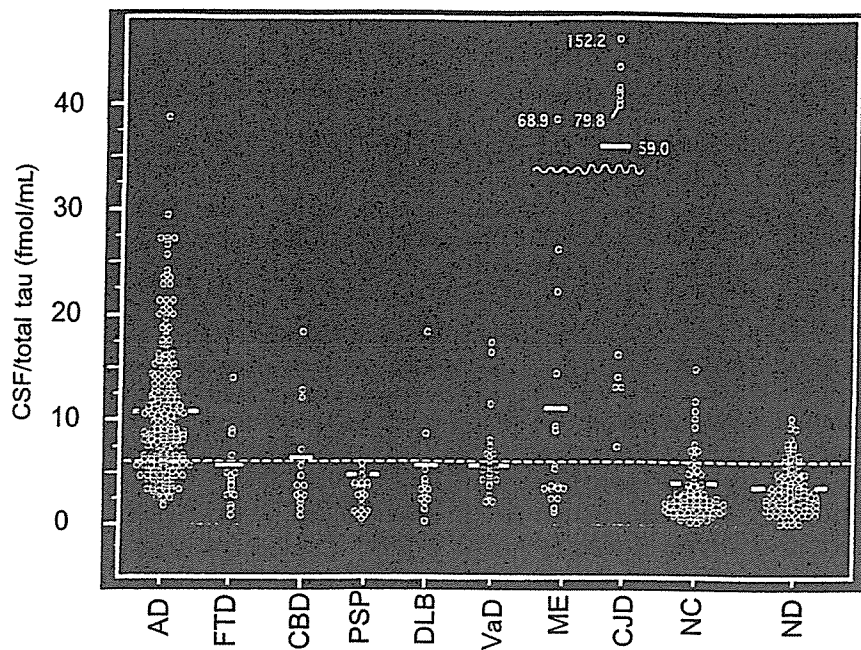


Figure 1 Quantification of total tau in cerebrospinal fluid (CSF). Total tau in CSF was assayed by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) employing anti-tau antibodies. AD, Alzheimer's disease; CBD, corticobasal degeneration; CJD, Creutzfeldt-Jakob disease; DLB, dementia with Lewy body; FTD, frontotemporal dementia; ME, meningoencephalitis; NC, normal controls; ND, non-dementia; PSP, progressive supranuclear palsy; VaD, vascular dementia.

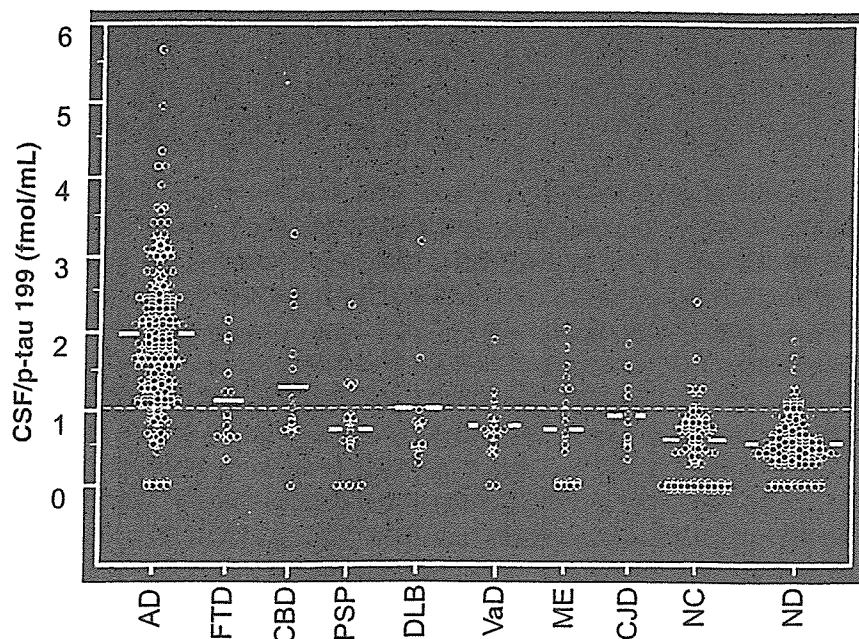


Figure 2 Quantification of phosphorylated tau at Ser 199 in cerebrospinal fluid (CSF). Phosphorylated tau in CSF was assayed by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) employing antiphosphorylated tau antibodies. AD, Alzheimer's disease; CBD, corticobasal degeneration; CJD, Creutzfeldt-Jakob disease; DLB, dementia with Lewy body; FTD, frontotemporal dementia; ME, meningoencephalitis; NC, normal controls; ND, non-dementia; PSP, progressive supranuclear palsy; VaD, vascular dementia.

bent assay (ELISA) to quantify N-terminal fragments of phosphorylated tau protein,⁹ which gave better results than total tau protein measurement. In particular, phosphorylated tau protein levels are low in patients with meningoencephalitis and Creutzfeldt-Jakob disease, which are associated with high total tau protein levels (Fig. 2). Thus, the receiver operating

characteristic (ROC) analysis also showed improved results, with a sensitivity and specificity of over 80% (Table 1).¹⁰ In addition to our method of quantifying tau protein phosphorylated at serine 199, methods of quantifying tau protein phosphorylated at threonine 181 and threonine 231 have been reported. All these methods have yielded good results, making them the

most reliable diagnostic markers. To further increase the diagnostic accuracy of biomarkers, attempts have been made to increase the ability to differentiate AD from tauopathies typified by corticobasal degeneration (CBD) and progressive supranuclear palsy (PSP),^{11,12} such as the method of separately determining the levels of tau isoforms in the cerebrospinal fluid. As tau protein occurs mainly as the 4-repeat isoform in AD, and as the 3-repeat isoform in CBD and PSP, its differentiation is theoretically possible.

SCREENING TEST FOR AD

As described above, the measurement of phosphorylated tau in the cerebrospinal fluid is currently the most reliable marker, but it is not easy to perform a cerebrospinal fluid examination. Therefore, a simple screening test is necessary. One approach is to

Table 1 Receiver operating characteristic (ROC) analysis of total tau and phosphorylated tau assays

	Cut-off level	Sensitivity	Specificity
AD vs NC + ND			
Total tau	4.8 fmol/mL	82.7%	82.0%
p-tau 199	0.96	87.3	87.4
AD vs others			
Total tau	6.0 fmol/mL	77.1%	77.6%
p-tau 199	1.05	85.2	85.0

ROC analysis also showed an improved sensitivity and specificity of over 80% in the case of phosphorylated tau in the cerebrospinal fluid (CSF) assay. AD, Alzheimer's disease; NC, normal controls; ND, non-demented controls.

develop a test that can be performed on blood or urine. Regrettably, no useful markers have been developed so far. Although our group has been measuring blood tau and A β levels, we have not achieved satisfactory results. Thus, as another approach, we developed a simple screening method for AD using a touch panel computer.¹³ We used questions assessing temporal orientation, delayed recognition and space perception (choosing cubes and triangular prisms), which are sensitive test items. The computer program was developed using Microsoft Visual Basic 6.0, and was made to operate on a PC running a Windows operating system. Hardware with an audio output was used to provide audio information as well as visual information. As elderly individuals are not accustomed to using a mouse, a touch panel was adopted. Incorrect answers were given a mark of 0, and results were graded on a scale of 0 to 15. Tests on 49 AD patients and 30 control subjects showed that almost all the subjects in the control group obtained full marks (with one or two incorrect answers, if any), whereas subjects in the AD group failed to give the correct answer to three or more questions (Fig. 3). Thus, at a cut-off value of 12, the ROC analysis indicated that the screening test has a very high accuracy with a sensitivity of 96% and a specificity of 97%. Because this test can be easily performed anywhere, and is non-invasive, highly sensitive, and highly specific, it is extremely useful.

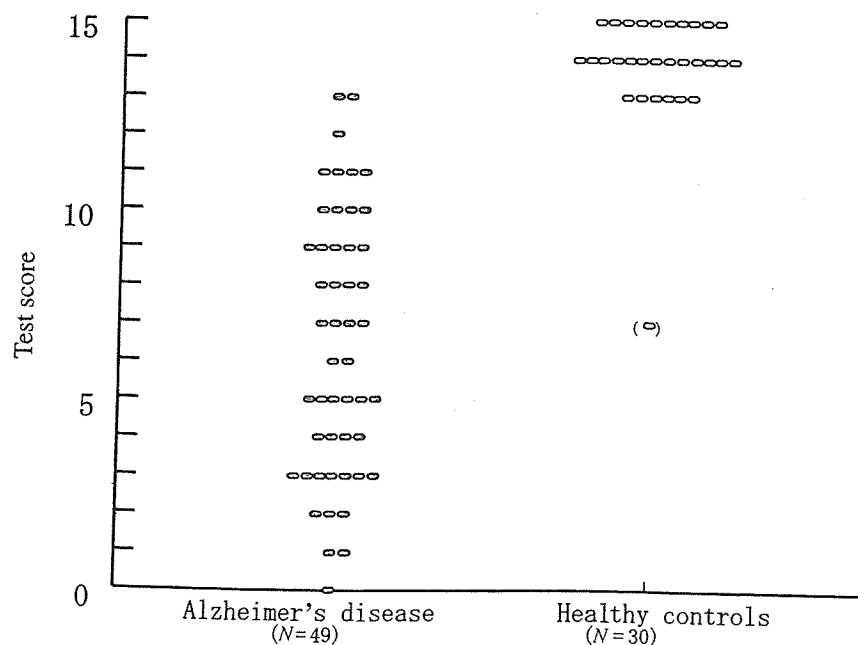


Figure 3 Results of the simple screening test for dementia using a touch panel computer. A simple screening method for Alzheimer's disease (AD) using a touch panel computer was developed. Tests on 49 AD patients and 30 control subjects showed that almost all subjects in the control group obtained full marks.

Table 2 Efficacy of donepezil hydrochloride and acetylcholine receptor (AChR) $\alpha 7$ polymorphism

	No.	Genotype			χ^2 -test
		W/W	W/M	M/M	
Responder (improved)	21	10	11	0	$P < 0.05$
Non-responder (not improved)	22	17	5	0	

Donepezil hydrochloride responders were more frequently heterozygous for a 2-base deletion in the AChR $\alpha 7$ gene ($P < 0.05$).

MARKERS FOR THE PREDICTION OF DRUG EFFICACY

With the marketing of donepezil hydrochloride, there is now a treatment for AD. However, responder and non-responder groups exist. Methods to differentiate these groups have also been investigated. As this drug is an acetylcholine esterase inhibitor, we focused our attention on acetylcholine receptor $\alpha 7$ genetic polymorphism, and found that donepezil hydrochloride responders were more frequently heterozygous for a 2-base deletion in the acetylcholine receptor $\alpha 7$ gene ($P < 0.05$, Table 2).³ This polymorphism requires further analysis not only as a marker for the early detection of AD, but also as a diagnostic marker for predicting the drug efficacy.

CONCLUSION

We consider that the quantification of phosphorylated tau in the cerebrospinal fluid is currently the most reliable and useful biomarker for AD. The method involving the use of a touch panel computer can be recommended as a preliminary screening test. Acetylcholine receptor $\alpha 7$ genetic polymorphism may be a useful marker in the treatment with acetylcholine esterase inhibitors.

REFERENCES

- 1 Urakami K, Adachi Y, Wakutani Y *et al.* Epidemiologic and genetic studies of dementia of the Alzheimer type in Japan. *Dement Geriatr Cogn Disord* 1998; **9**: 294–298.
- 2 Wakutani Y, Ishizaki K, Adachi Y *et al.* Epidemiologic study on dementia of Daisen-cho, Tottori prefecture in 2000. *Dementia Jpn* 2001; **15**: 140 (in Japanese).
- 3 Urakami K, Taniguchi M, Sakuma K *et al.* Association between efficacy of donepezil hydrochloride and gene polymorphism of acetylcholine receptor gene in Alzheimer's disease. *Jpn J Int Med* 2002; **14**: 424–428 (in Japanese).
- 4 Rogers SL, Farlow MR, Doody RS, Mohs R, Friedhoff LT. A 24-week, double-blind, placebo-controlled trial of donepezil in patients with Alzheimer's disease. Donepezil Study Group. *Neurology* 1998; **50**: 136–145.
- 5 The Ronald and Nancy Reagan Research Institute of the Alzheimer's Association and National Institute on Aging Working Group. Consensus report of the working group on: 'molecular and biochemical markers of Alzheimer's disease.' *Neurobiol Aging* 1998; **19**: 109–116.
- 6 Kanai M, Matsubara E, Isoe K *et al.* Longitudinal study of cerebrospinal fluid levels of tau, $A\beta 1-40$ and $A\beta 1-42$ (43) in Alzheimer's disease: a study in Japan. *Ann Neurol* 1998; **44**: 17–26.
- 7 Takeda M, Tanaka T, Arai H *et al.* Basic and clinical studies on the measurement of beta-amyloid (1–42) in cerebrospinal fluid as a diagnostic marker for Alzheimer's disease and related disorders: multicenter study in Japan. *Psychogeriatrics* 2001; **1**: 56–63.
- 8 Otto M, Wiltfang J, Tumani H *et al.* Elevated levels of tau-protein in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci Lett* 1997; **225**: 210–212.
- 9 Ishiguro K, Ohno H, Arai H *et al.* Phosphorylated tau in human cerebrospinal fluid is a diagnostic marker for Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1999; **270**: 91–94.
- 10 Itoh N, Arai H, Urakami K *et al.* Large-scale, multicenter study of cerebrospinal fluid tau protein phosphorylated at serine 199 for the antemortem diagnosis of Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 2001; **50**: 150–156.
- 11 Urakami K, Mori M, Wada K *et al.* A comparison of tau protein in cerebrospinal fluid between corticobasal degeneration and progressive supranuclear palsy. *Neurosci Lett* 1998; **259**: 1–3.
- 12 Urakami K, Wada K, Arai H *et al.* Diagnostic significance of tau proteins in cerebrospinal fluids from patients with corticobasal degeneration or progressive supranuclear palsy. *J Neurol Sci* 2001; **183**: 95–98.
- 13 Urakami K, Taniguchi M, Sakuma K *et al.* Genetic polymorphism and simple screening method in Alzheimer's disease. *Jpn J Geriatr Psychiatr* 2002; **13**: 5–10 (in Japanese).

5. 痴呆性疾患における生物学的診断マーカー

鳥取大学医学部保健学科・生体制御学¹⁾ 鳥取大学医学部脳神経内科²⁾

浦上克哉¹⁾, 谷口美也子¹⁾

和田健二²⁾, 涌谷陽介²⁾, 中島健二²⁾

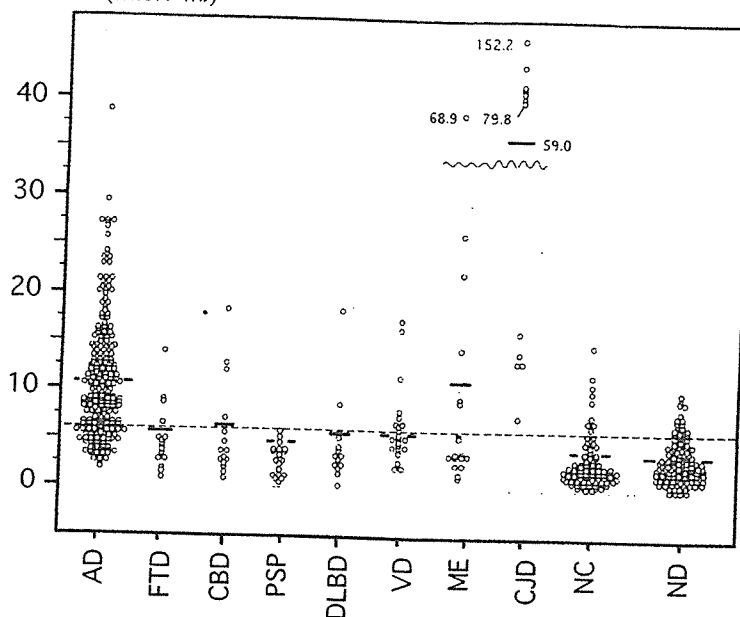
はじめに

痴呆性疾患は近年増加し、65 歳以上の 10 人に 1 人は痴呆症という状況になってきている。その中でアルツハイマー型痴呆 (AD) は近年本邦でも増加してきており、痴呆性疾患の約半数を占めている^{1,2)}。また、近年塩酸ドネペジル (アリセプト®) が発売され治療が可能となり、有用性が報告されている³⁾。このことから、痴呆性疾患の中でも特に AD の診断が早期にかつ的確にできるか否かが重要なポイントとなってくる。しかし、現在の AD 診断は徹底した除外診断に基づいてなされており、より容易に誰でもできる診断マーカーの開発が望まれている。これまでに多くの診断マーカー開発のアプローチがなされているが、最も良い成績が出ているのはタウ蛋白関連のものである。そこで、タウ蛋白に関連した診断マーカー研究と新規マーカーである WGA 結合糖蛋白質について報告する。

■A. AD 診断のためのマーカー

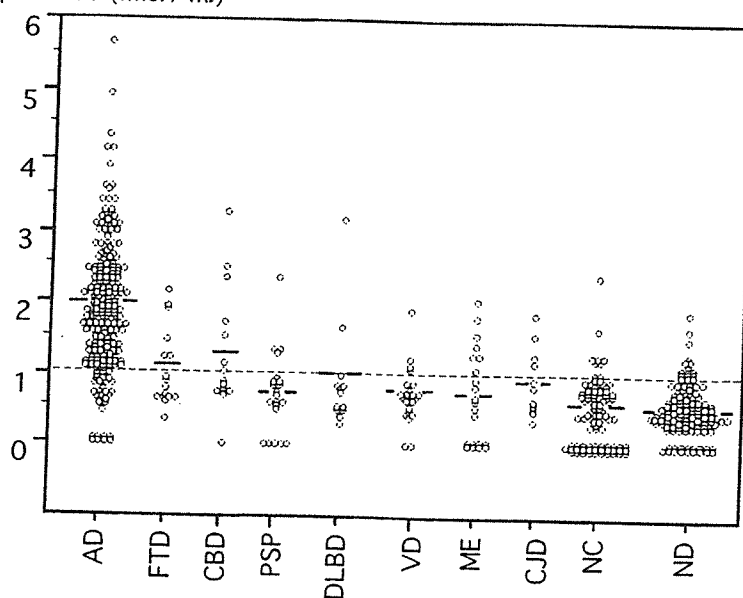
AD 撲滅のために設立したレーガン研究所は、AD の生物学的診断マーカーの条件として、病態を良く反映し、患者への侵襲性が少なく、他の痴呆性疾患を区別して診断する精度が高いこと、つまり AD 患者を検出する率 (感度) と非患者を検出しない率 (特異度) が共に 80% を超えることを要求している。髄液中総タウ蛋白は上記基準をかなり満たすが、感度と特異度が共に 80% 以上は難しく、アミロイドβ蛋白と組み合わせることにより、AD index, AD unit という表現を用いているが、感度と特異度が共に 80% 以上という結果が得られている^{4,5)}。総タウ蛋白で特に問題なのは、髄膜脳炎やクロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) などで極端に高値を示すことである (図 1)。そこで、単独でこの基準をクリアする方法はないかと考え、髄液中リン酸化タウ蛋白を検討した。AD 患者脳にみられる神経原線維変化のタウ蛋白は高度にリン酸化されている。このため、リン酸化タウを選択的に測定できれば、総タウより良い結果が期待できる。そこで、我々のグループはセリン 199 のリン酸化部位に着目してリン酸化タウ N 末端断片を定量するサンドイッチ ELISA を開発した⁶⁾。その結果、総タウより良い結果が得られ、特に総タウで高値を示していた髄膜脳炎やクロイツフェルト・ヤコブ病が低値であった (図 2)。このため ROC 解析でも明らかに改善し、単独で感度、特異度ともに 80% 以上を示すという結果が得られた (表 1)⁷⁾。現

CSF/total-tau (fmol / ml)



■ 図 1

CSF/p-tau199 (fmol / ml)



■ 図 2

在リン酸化タウは我々のグループが報告しているセリン 199 のリン酸化部位をみる方法以外に、スレオニン 181, スレオニン 231 のリン酸化部位をみる方法が報告されている。いずれも良い成績であり、現時点では髄液中リン酸化タウ測定が最も信頼性のおける診断マーカーと考えられる。さらに、診断精度を上げるためには、大脳皮質基底核変性症 (CBD) や進行性核上性麻痺 (PSP) などに代表されるタウオパチーとの鑑別力をあげていく試みが必要と思われる^{8,9)}。

表 1 ROC Analysis

AD vs NC+ND

	Cut off level	Sensitivity	Specificity
total tau	4.8 fmol/ml	82.7%	82.0%
p-tau 199	0.96	87.3	87.4

AD vs Others

	Cut off level	Sensitivity	Specificity
total tau	6.0 fmol/ml	77.1%	77.6%
p-tau 199	1.05	85.2	85.0

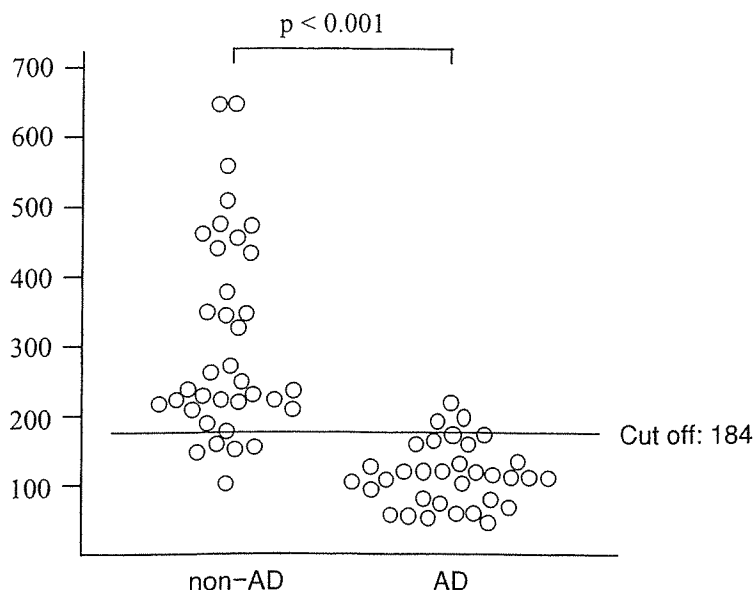
■B. WGA 結合糖蛋白測定を試み

WGA (小麦胚芽レクチン, Wheat Germ Agglutinin) は、特異的な糖鎖を認識して結合するレクチンの一種である。我々は、250 kDa の WGA 結合糖蛋白が AD の髄液中で減少しているという報告があり¹⁰⁾、アルツハイマー型痴呆 (AD) の髄液中診断マーカーとしての有用性を検討した。対象は、AD 58 例 (男/女:19/39)、AD 以外の痴呆: 脳血管性痴呆 (VD)、正常圧水頭症 (NPH)、レビー小体型痴呆 (DLB)、CJD、CBD、PSP の計 31 例 (20/11)、コントロールとして痴呆のない症例 50 例 (28/22) の髄液において、レクチンブロット法を用いて検討を行った。総蛋白 5 μ g にあたる髄液を 5~20% gradient gel にアプライして SDS-PAGE で電気泳動して PVDF メンブレンにブロッティングし、一次抗体に WGA-Biotin、二次抗体はアルカリホスファターゼ標識 Streptavidin を反応させ、Western Blue で発色したバンドを検討した。リン酸化タウ蛋白 (Tau pS199) の測定は、ヒトリン酸化タウ (pS199) ELISA キット (BioSource 社) を用いて測定した。

AD で低値を示す WGA 結合糖蛋白は 3 種を候補としており、これらのうち多症例での検討によりさらに約 75 kDa と約 25 kDa の 2 種の蛋白 (それぞれ a, c とする) が診断マーカーとして有用であることが示唆された。いずれの蛋白も、AD 群と non-AD 群と比較して検討すると、有意に ($p < 0.001$) 低値を示した。さらにリン酸化タウ蛋白を同じ症例で測定し、比較検討した。その結果 2 種の蛋白のうち、WGA 結合糖蛋白-a は、AD で減少し、リン酸化タウ蛋白は増加していたため、WGA 結合糖蛋白-a に対するリン酸化タウ蛋白の比を検討したところ、AD 群で non-AD 群よりも明らかに高値を示し ($p < 0.001$)、この指標は WGA 結合糖蛋白単独よりもさらに精度の高いマーカーとなる可能性が示唆された (図 3)。さらに DLB では、AD 群と比較して明らかに低値を示しており、この指標によりタウオパチーである DLB と AD との鑑別診断への有用性が期待できる。今後、これらの蛋白の同定と、その働きに注目する必要がある。

まとめ

現時点では、AD の診断マーカーとして髄液中リン酸化タウ測定が最も信頼性があり、有用であると考えられる。リン酸化タウで鑑別困難なタウオパチーの鑑別に髄液中 WGA と結合する髄



■ 図3 WGA-binding-a/Tau pS199

液中糖蛋白が有用である可能性がされた。

■文献

- 1) Urakami K, Adachi Y, Wakutani Y, et al. Epidemiologic and genetic studies of dementia of the Alzheimer type in Japan. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 1998; 9: 294-8.
- 2) 涌谷陽介, 石崎公郁子, 足立芳樹, 他. 鳥取県大山町における 2000 年度痴呆性疾患疫学調査. *Dementia Japan*. 2001; 15: 140.
- 3) 浦上克哉, 谷口美也子, 佐久間研司, 他. アルツハイマー病における塩酸ドネペジルの有効性とアセチルコリンレセプター遺伝子多型との関連の検討. *内科専門医会誌*. 2002; 14: 424-8.
- 4) Kanai M, Matsubara E, Isoe K, et al. Longitudinal study of cerebrospinal fluid levels of tau, A β 1-40 and A β 1-42 (43) in Alzheimer's disease: A study in Japan. *Ann Neurol*. 1998; 44: 17-26.
- 5) Takeda M, Tanaka T, Arai H, et al. Basic and clinical studies on the measurement of beta-amyloid (1-42) in cerebrospinal fluid as a diagnostic marker for Alzheimer's disease and related disorders: multicenter study in Japan. *Psychogeriatrics*. 2001; 1: 56-63.
- 6) Ishiguro K, Ohno H, Arai H, et al. Phosphorylated tau in human cerebrospinal fluid is a diagnostic marker for Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 1999; 270: 91-4.
- 7) Itoh N, Arai H, Urakami K, et al. Large-Scale, multicenter study of cerebrospinal fluid tau protein phosphorylated at serine 199 for the antemortem diagnosis of Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 2001; 150 (2): 150-6.
- 8) Urakami K, Mori M, Wada K, et al. A comparison of tau protein in cerebrospinal fluid between corticobasal degeneration and progressive supranuclear palsy. *Neurosci Lett*. 1998; 259: 1-3.
- 9) Urakami K, Wada K, Arai H, et al. Diagnostic significance of tau proteins in cerebrospinal fluids from patients with corticobasal degeneration or progressive supranuclear palsy. *J Neurol Sci*. 2001; 183: 95-8.
- 10) Lisa RF, et al. Wheat Germ Agglutinin-binding glycoproteins are decreased in Alzheimer's disease cerebrospinal fluid. *J Neurochem*. 2001; 79: 1022-6.