

Ferulic acid destabilizes preformed β -amyloid fibrils in vitro

Kenjiro Ono, Mie Hirohata, Masahito Yamada *

Department of Neurology and Neurobiology of Aging, Kanazawa University Graduate School of Medical Science, Kanazawa 920-8640, Japan

Received 4 August 2005

Available online 29 August 2005

Abstract

Inhibition of the formation of β -amyloid fibrils (fA β), as well as the destabilization of preformed fA β in the CNS, would be attractive therapeutic targets for the treatment of Alzheimer's disease (AD). We reported previously that curcumin (Cur) inhibits fA β formation from A β and destabilizes preformed fA β in vitro. Using fluorescence spectroscopic analysis with thioflavin T and electron microscopic studies, we examined the effects of ferulic acid (FA) on the formation, extension, and destabilization of fA β at pH 7.5 at 37 °C in vitro. We next compared the anti-amyloidogenic activities of FA with Cur, rifampicin, and tetracycline. Ferulic acid dose-dependently inhibited fA β formation from amyloid β -peptide, as well as their extension. Moreover, it destabilized preformed fA β s. The overall activity of the molecules examined was in the order of: Cur > FA > rifampicin = tetracycline. FA could be a key molecule for the development of therapeutics for AD.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Alzheimer's disease; Ferulic acid; β -Amyloid fibrils; Thioflavin T; Electron microscopy

Alzheimer's disease (AD) is pathologically characterized by the abundance of the extracellular deposition of the amyloid β -peptide (A β) as amyloid plaques and vascular amyloid, and the intraneuronal accumulation of the neurofibrillary tangles [1]. AD therapy is currently not causal. Many researchers favor other therapeutic approaches that target the formation, deposition, and clearance of A β from nervous tissue. Vaccination [2–4] and secretase inhibitors [5] have been reported as the experimental therapies and for clinical trials.

A large number of studies indicate that oxidative injury may play a role in the development of AD [6]. Many antioxidant compounds, such as vitamin E [7], nordihydroguaiaretic acid (NDGA) [8], and nicotine [9], have been demonstrated to protect the brain from A β neurotoxicity. Using a nucleation-dependent polymerization model to explain the mechanism of the formation of Alzheimer's β -amyloid fibrils (fA β) in vitro [10,11], we previously showed that some phenolic antioxidants, NDGA, curcu-

min (Cur), and rosmarinic acid (RA), inhibit fA β formation dose-dependently in vitro [12,13]. Moreover, we reported that they also destabilize fA β (1–40) and fA β (1–42) in a concentration-dependent manner, based on fluorescence spectroscopic analysis with thioflavin T (ThT) and electron microscopic studies [13,14]. Ferulic acid (4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid) (FA), a phenolic compound and a major constituent of fruit, is structurally related to these compounds (Fig. 1). FA is also well known to be an important antioxidant [15,16]. Long-term administration of FA was reported to protect mice against A β -induced learning and memory deficits in vivo [17,18]. Very recently, Sultana et al. [19] found FA protects neurons against A β (1–42)-induced oxidative stress and neurotoxicity.

Here, we examined the effects of FA to inhibit the formation, extension of fA β (1–40) and fA β (1–42), as well as to destabilize fA β s at pH 7.5 at 37 °C in vitro, using fluorescence spectroscopy with ThT and electron microscopy. We also compared its anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects with the previous-described inhibitory molecules such as Cur, rifampicin (RIF), and tetracycline (TC) [12,13,20,21].

* Corresponding author. Fax: +81 76 234 4253.

E-mail address: m-yamada@med.kanazawa-u.ac.jp (M. Yamada).

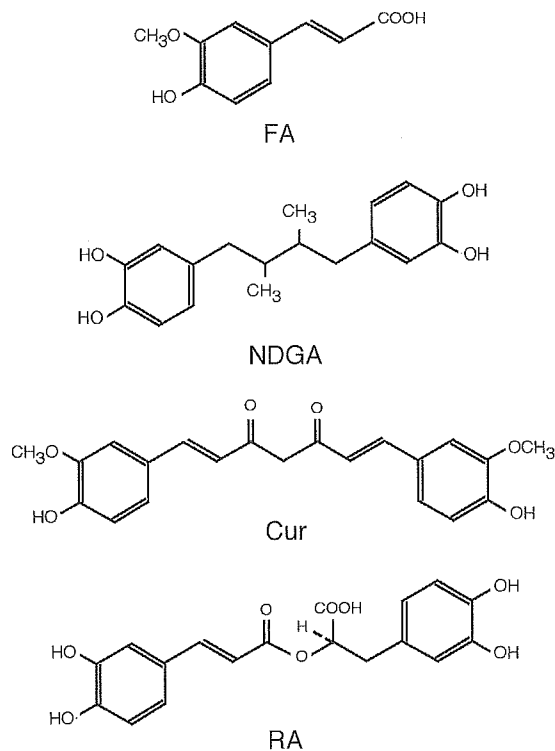


Fig. 1. Structure of FA, NDGA, Cur, and RA.

Materials and methods

Preparation of A β and fA β solutions. A β (1–40) (a trifluoroacetate salt, Peptide Institute, Osaka, Japan) and A β (1–42) (a trifluoroacetate salt, Peptide Institute) were dissolved by brief vortexing in a 0.02% ammonia solution at a concentration of 500 μ M (2.2 mg/mL) and 250 μ M, respectively, in a 4 °C room and stored at –80 °C before assaying (fresh A β (1–40) and A β (1–42) solutions). fA β (1–40) and fA β (1–42) were formed from the fresh A β (1–40) and A β (1–42) solutions, respectively, sonicated, and stored at 4 °C as described elsewhere [22].

Fresh, non-aggregated fA β (1–40) and fA β (1–42) were obtained by extending sonicated fA β (1–40) or fA β (1–42) with fresh A β (1–40) or A β (1–42) solutions, respectively, just before the destabilization reaction [13,14,23]. The reaction mixture was 600 μ L and contained 10 μ g/mL fA β (1–40) or fA β (1–42), 50 μ M A β (1–40) or A β (1–42), 50 mM phosphate buffer, pH 7.5, and 100 mM NaCl. Measurement of the fluorescence of ThT showed that the extension reaction proceeded to equilibrium after incubation at 37 °C for 3–6 h under non-agitated conditions. In the following experiment, the concentration of fA β (1–40) and fA β (1–42) in the final reaction mixture was regarded as 50 μ M.

Fluorescence spectroscopy, electron microscopy, and polarized light microscopy. A fluorescence spectroscopic study was performed on a Hitachi F-2500 fluorescence spectrophotometer as described elsewhere [24]. Optimum fluorescence measurements of fA β (1–40) and fA β (1–42) were obtained at the excitation and emission wavelengths of 445 and 490 nm, respectively, with the reaction mixture containing 5 μ M ThT (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) and 50 mM of glycine–NaOH buffer, pH 8.5. Electron microscopic and polarized light microscopic studies of the reaction mixtures were performed as described elsewhere [22].

Polymerization assay. Polymerization of A β with or without fA β added as seeds was assayed as described elsewhere [12]. Briefly, the reaction mixture contained 50 μ M A β (1–40), or 25 or 50 μ M A β (1–42), 0 or 10 μ g/mL fA β (1–40) or fA β (1–42), 0–50 μ M FA, Cur, RIF, or TC (Sigma Chemical, St. Louis, MO), 1% dimethyl sulfoxide (DMSO), 50 mM phosphate buffer, pH 7.5, and 100 mM NaCl.

Thirty microliter aliquots of the mixture were put into oil-free PCR tubes (Takara Shuzo, Otsu, Japan). These tubes were then put into a DNA

thermal cycler (PJ480, Perkin Elmer Cetus, Emeryville, California). Starting at 4 °C, the plate temperature was elevated at maximal speed, to 37 °C. Incubation times ranged between 0 and 8 days as indicated in each figure. The tubes were not agitated during the reaction. Five microliter aliquots from each tube in triplicate were subjected to fluorescence spectroscopy and the mean of the three measurements was determined. In the ThT solution, the concentration of FA, Cur, RIF, and TC examined in this study was diluted up to 1/200 of that in the reaction mixture. We confirmed that these compounds did not quench ThT fluorescence at the diluted concentration (data not shown).

Measurement of fibril-destabilizing activity. Destabilization of fA β was assayed as described elsewhere [14]. Briefly, the reaction mixture contained 25 μ M fresh fA β (1–40) or fA β (1–42), 0–50 μ M FA, Cur, RIF, or TC, 1% DMSO, 50 mM phosphate buffer, pH 7.5, 100 mM NaCl, and 1% (wt/vol) polyvinyl alcohol (Wako Pure Chemical Industries) to avoid the aggregation of fA β and the adsorption of fA β onto the inner wall of the reaction tube during the reaction.

After being mixed by pipetting, triplicate 5- μ L aliquots of the reaction mixture were subjected to fluorescence spectroscopy and 30- μ L aliquots were put into PCR tubes. The reaction tubes were then transferred into a DNA thermal cycler. Starting at 4 °C, the plate temperature was elevated at maximal speed to 37 °C. Incubation times ranged between 0 and 6 h as indicated in each figure. The reaction tubes were not agitated during the reaction. Five microliter aliquots from each tube in triplicate were subjected to fluorescence spectroscopy and the mean of the three measurements was determined. At the diluted concentration, FA, Cur, RIF, and TC did not compete with ThT for fA β at either 4 or 37 °C for 1 min (data not shown).

Other analytical procedures. Protein concentrations of the supernatants of the reaction mixtures after centrifugation were determined by the method of Bradford [25] with a protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). The A β (1–40) solution quantified by amino acid analysis was used as the standard. The statistical significance of the data was analyzed by the linear least-squares fit. The effective concentration EC₅₀ was defined as the concentration of FA, Cur, RIF, or TC to inhibit the formation or extension of fA β s to 50% of the control value, or the concentration to destabilize fA β s to 50% of the control value. EC₅₀ was calculated by the sigmoidal curve fitting of the data, using Igor Pro ver.4 (WaveMetrics, Lake Oswego, OR, USA).

Results and discussion

As shown in Figs. 2A and B, when fresh A β (1–40) or A β (1–42) was incubated at 37 °C, the fluorescence of ThT followed a characteristic sigmoidal curve. This curve is consistent with a nucleation-dependent polymerization model [10]. When A β (1–40) was incubated with 10 and 50 μ M FA, the final equilibrium level decreased dose-dependently (Fig. 2A). A similar effect of FA was observed with A β (1–42) (Fig. 2B). As shown in Figs. 2C and D, when fresh A β (1–40) or A β (1–42) was incubated with fA β (1–40) or fA β (1–42), respectively, at 37 °C, the fluorescence increased hyperbolically without a lag phase and proceeded to equilibrium much more rapidly than without seeds (compare Figs. 2A and B with C and D). This curve is consistent with a first-order kinetic model [24]. When A β (1–40) and fA β (1–40) were incubated with FA, the final equilibrium level decreased (Fig. 2C). A similar effect of FA was observed for the extension of fA β (1–42) (Fig. 2D). We observed that 50 μ M FA inhibited the extension of sonicated fA β (1–40) and fA β (1–42) electron-microscopically (data not shown).

As shown in Figs. 3A and B, the fluorescence of ThT was almost unchanged during the incubation of fresh

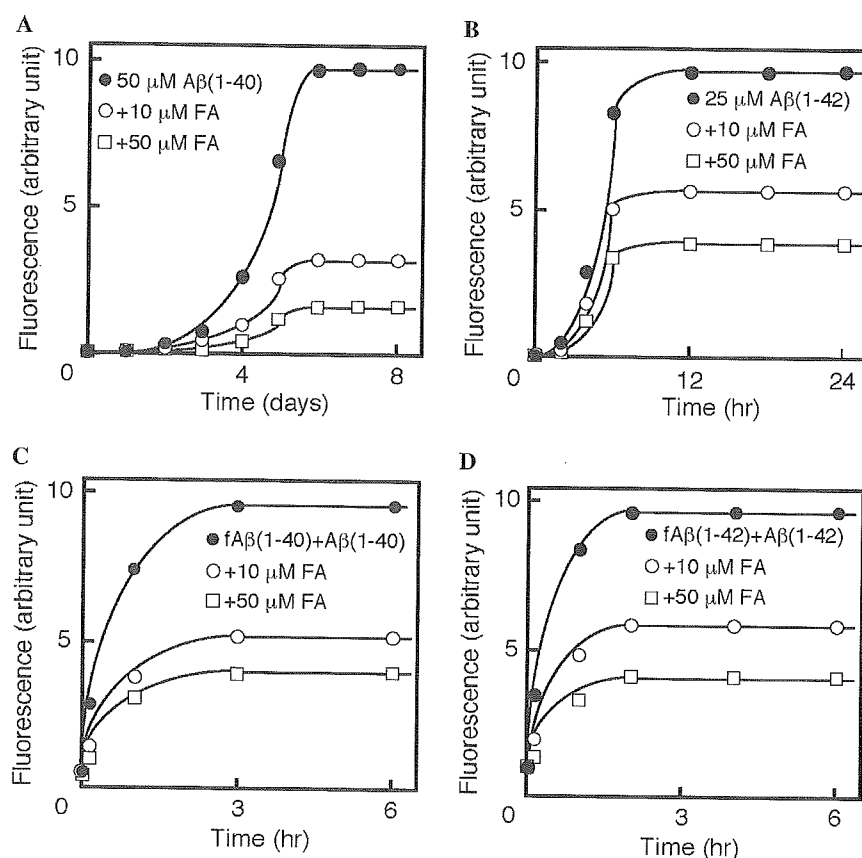


Fig. 2. FA inhibits the formation of fAβ. Effects of FA on the kinetics of formation of fAβ(1–40) (A) and fAβ(1–42) (B) from fresh Aβ(1–40) and Aβ(1–42), respectively. The reaction mixtures containing 50 μM Aβ(1–40) (A) or 25 μM Aβ(1–42) (B), 50 mM phosphate buffer, pH 7.5, 100 mM NaCl, and 0 (●), 10 (○), or 50 μM (□) of FA were incubated at 37 °C for the indicated times. Effects of FA on the kinetics of fAβ(1–40) (C) and fAβ(1–42) (D) extension. The reaction mixtures containing 10 μg/mL sonicated fAβ(1–40) (C) or fAβ(1–42) (D), 50 μM Aβ(1–40) (C) or Aβ(1–42) (D), 50 mM phosphate buffer, pH 7.5, 100 mM NaCl, and 0 (●), 10 (○), or 50 μM (□) of FA were incubated at 37 °C for the indicated times. Each figure shows a representative pattern of three independent experiments.

fAβ(1–40) or fAβ(1–42) at 37 °C without additional molecules. On the other hand, the ThT fluorescence decreased immediately after addition of FA to the reaction mixture (Figs. 3A and B). After incubation of 25 μM fresh fAβ(1–40) with 50 μM FA for 1 h, many short, sheared fibrils were observed (Fig. 4B). At 6 h, the number of fibrils was reduced markedly, and small amorphous aggregates were occasionally observed (Fig. 4C). Similar morphology was observed when 25 μM fresh fAβ(1–42) was incubated with 50 μM FA (data not shown).

After incubation with 50 μM FA for 6 h, fAβ(1–40) and fAβ(1–42) were stained with Congo red much more weakly than fresh fAβ(1–40) and fAβ(1–42). However, they all showed orange-green birefringence under polarized light. This means that a significant amount of intact fAβ(1–40) and fAβ(1–42) still remains in the mixture after the reaction. When the protein concentration of the supernatant after centrifugation at 4 °C for 2 h at $1.6 \times 10^4 g$ was measured by the Bradford assay, no proteins were detected in the supernatant. This implies that although these agents could destabilize fAβ(1–40) and fAβ(1–42) to visible aggregates (Fig. 4C), they could not depolymerize fAβ(1–40) and fAβ(1–42) to monomers or oligomers of Aβ(1–40) and Aβ(1–42). When fresh 50 μM Aβ(1–40) or Aβ(1–42) was

incubated with the pellet at 10 μg/mL, no increase in the fluorescence was observed for 6 h. This implies that destabilized fAβ(1–40) and fAβ(1–42) could not function as seeds.

We calculated EC_{50} , the concentrations of Cur, RIF, TC, or FA to inhibit the formation or extension of fAβs to 50% of the control value, or the concentrations to destabilize fAβs to 50% of the control value, by the sigmoidal curve fitting of the data as shown (Table 1). The overall activity of the molecules examined was in the order of: Cur > FA > RIF = TC.

In this study, we showed that FA dose-dependently inhibits fAβ formation from fresh Aβ, as well as destabilizing preformed fAβ in vitro. The anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of FA were slightly weaker than Cur. Recently, our systematic in vitro study indicated that the overall activity of the anti-amyloidogenic molecules was in the order of: NDGA = Cur = RA \gg RIF = TC > poly(vinylsulfonic acid, sodium salt) = 1,3-propanedisulfonic acid, disodium salt > β-sheet breaker peptide (iAβ5) > nicotine [13,14,23]. NDGA, Cur, and RA are smaller than RIF, and have two 3,4-dihydroxyphenyl rings (NDGA, RA) or 3,4-methoxyhydroxyphenyl rings (Cur) symmetrically bound to a short carbohydrate chain (Fig. 1). Similarly, FA structurally contains one 3,4-meth-

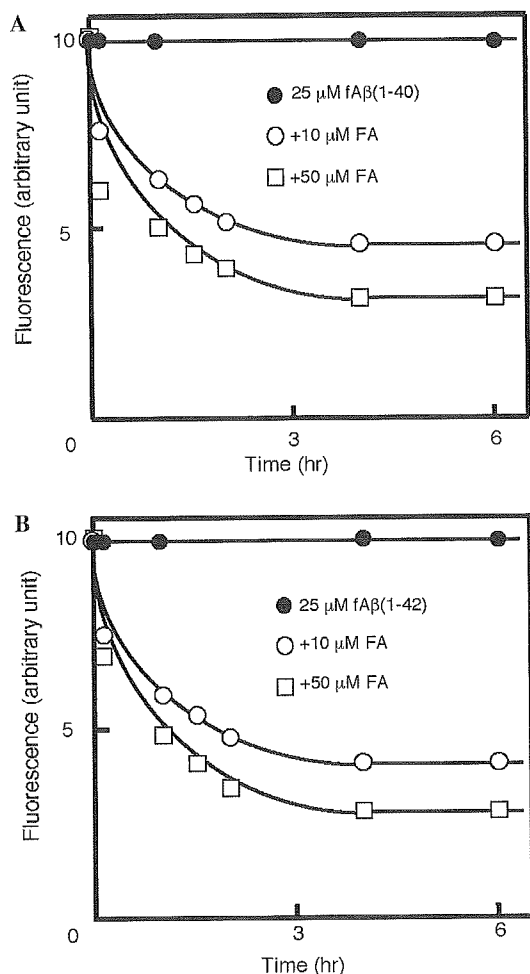


Fig. 3. Effects of FA on the kinetics of destabilization of fA β (1–40) (A) and fA β (1–42) (B). The reaction mixtures containing 25 μ M fA β (1–40) (A) or fA β (1–42) (B), 50 mM phosphate buffer, pH 7.5, 100 mM NaCl, and 0 (●), 10 (○), or 50 μ M (□) of FA were incubated at 37 °C for the indicated times. Each figure shows a representative pattern of three independent experiments.

oxyhydroxyphenyl ring (Fig. 1) and been identified as the degradation products of Cur [26]. This compact structure might be quite suitable for specifically binding to free A β and subsequently inhibiting the polymerization of A β into fA β . Alternatively, this structure might be suitable for specific binding to fA β and subsequent destabilization of the β -sheet rich conformation of A β molecules in fA β . Tomiyama et al. [20] suggested that RIF binds to A β by hydrophobic interactions between its lipophilic ansa chain and the hydrophobic region of A β , thus blocking the association between A β molecules that lead to fA β formation. The anti-amyloidogenic activity of NDGA, TCs, small-molecule anionic sulfonates or sulfates, melatonin, iA β 5, and nicotine may also be related to the propensity to bind to specific sites of A β [14,21,27–30]. Interestingly, FA, NDGA, Cur, RA, RIF, melatonin, and nicotine have all been reported to have antioxidant activity [8,15,16,20, 28,31–33]. Thus, FA with potent antioxidant motifs could bind to A β and/or fA β , inhibit fA β formation, and/or destabilize preformed fA β .

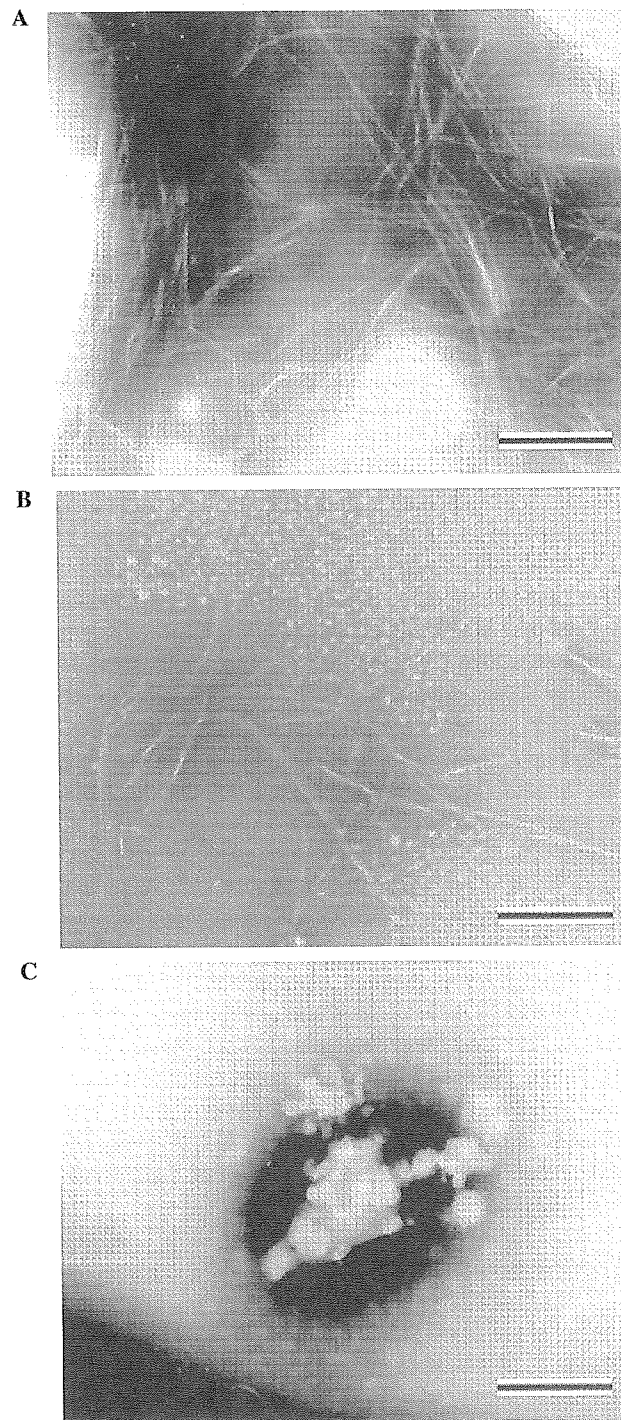


Fig. 4. Electron micrographs of destabilized fA β (1–40). The reaction mixture containing 25 μ M fA β (1–40), 50 mM phosphate buffer, pH 7.5, 100 mM NaCl, and 50 μ M FA was incubated at 37 °C for 0 (A), 1 (B) or 6 h (C). Scale bars indicate a length of 250 nm.

FA is a phytochemical which exhibits both antioxidant and anti-inflammatory properties that may be of interest in the therapy for AD. For example, long-term, low-dose FA administration via the drinking water induced a resistance of the brain's toxicity to exposure to A β [17] similar to that reported following oral administration of the phytochemical Cur [34], a molecule chemically related to FA [24].

Table 1

The effective concentrations (EC₅₀) of Cur, FA, RIF, and TC for the formation, extension, and destabilization of fAβ(1–40) and fAβ(1–42)

Compounds	Formation ^a (μM)		Extension ^b (μM)		Destabilization ^c (μM)	
	fAβ(1–40)	fAβ(1–42)	fAβ(1–40)	fAβ(1–42)	fAβ(1–40)	fAβ(1–42)
Cur	0.29	1.1	0.26	0.81	0.83	0.60
FA	1.8	5.5	10	9.3	5.3	4.9
RIF	9.7	9.1	7.7	10	22	31
TC	10	10	8.0	16	23	45

^a The reaction mixtures containing 50 μM Aβ(1–40) or 25 μM Aβ(1–42), 50 mM phosphate buffer, pH 7.5, 100 mM NaCl, and 0, 0.01, 0.1, 1, 10, and 50 μM Cur, FA, RIF, or TC were incubated at 37 °C for 7 days and 24 h, respectively.

^b The reaction mixtures containing 10 μg/mL (2.3 μM) sonicated fAβ(1–40) or fAβ(1–42), 50 μM Aβ(1–40) or Aβ(1–42), 50 mM phosphate buffer, pH 7.5, 100 mM NaCl, and 0, 0.01, 0.1, 1, 10, and 50 μM Cur, FA, RIF, or TC were incubated at 37 °C for 1 h.

^c The reaction mixtures containing 25 μM fAβ(1–40) or fAβ(1–42), 50 mM phosphate buffer, pH 7.5, 100 mM NaCl, and 0, 0.01, 0.1, 1, 10, and 50 μM Cur, FA, RIF, or TC were incubated at 37 °C for 6 h.

Similarly, Kim et al. [18] demonstrated that long-term administration of about 300 μM FA effectively protects against Aβ(1–42) toxicity by inhibiting microglial activation in vivo. Very recently, Sultana et al. [19] showed that 10–50 μM FA significantly exerts protective effects against Aβ(1–42) toxicity by modulating oxidative stress directly and by inducing protective genes in hippocampal cultures. Finally, as shown in this paper, FA dose-dependently inhibits fAβ formation from fresh Aβ, as well as destabilizing preformed fAβ in vitro. EC₅₀ of FA for the formation, extension, and destabilization of fAβ were of the order of 1–10 μM. Thus, it may be reasonable to speculate that FA could prevent the development of AD, not only through scavenging reactive oxygen species, but also through directly inhibiting the deposition of fAβ in the brain. Although the exact mechanism of anti-amyloidogenic activity of FA is unclear, these compounds could be key molecules for the development of therapeutics for AD. Further studies, such as nuclear magnetic resonance experiments, are essential to reveal the exact structure–activity relationships for the antioxidants and other organic compounds which exhibit anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects.

Acknowledgments

The authors thank Drs. Souichi Okino and Kazuo Iwasa (Kanazawa University) for cooperation in the experiments. This work was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research (M.Y.), a grant for the 21st Century COE Program (on Innovative Brain Science for Development, Learning and Memory) (M.Y.), a grant for the Knowledge Cluster Initiative [High-Tech Sensing and Knowledge Handling Technology (Brain Technology)] (M.Y.), and a grant to the Amyloidosis Research Committee from the Ministry of Health, Labour, and Welfare, Japan (M.Y.).

References

- [1] D.J. Selkoe, Alzheimer's disease is a synaptic failure, *Science* 298 (2002) 789–791.

- [2] D. Schenk, R. Barbour, W. Dunn, G. Gordon, H. Grajeda, T. Guido, K. Hu, J. Huang, K. Johnson-Wood, K. Khan, D. Kholodenko, M. Lee, Z. Liao, I. Lieberburg, R. Motter, L. Mutter, F. Soriano, G. Shopp, N. Vasquez, C. Vandeventer, S. Walker, M. Wogulis, T. Yednock, D. Games, P. Seubert, Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse, *Nature* 400 (1999) 173–177.
- [3] C. Janus, J. Pearson, J. McLaurin, P.M. Mathews, Y. Jiang, S.D. Schmidt, M.A. Chishti, P. Horne, D. Heslin, J. French, H.T. Mount, R.A. Nixon, M. Mercken, C. Bergeron, P.E. Fraser, P. St George-Hyslop, D. Westaway, A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease, *Nature* 408 (2000) 979–982.
- [4] D. Morgan, D.M. Diamond, P.E. Gottschall, K.E. Ugen, C. Dickey, J. Hardy, K. Duff, P. Jantzen, G. DiCarlo, D. Wilcock, K. Connor, J. Hatcher, C. Hope, M. Gordon, G.W. Arendash, A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease, *Nature* 408 (2000) 982–985.
- [5] D.M. Skovronsky, V.M. Lee, Beta-secretase revealed: starting gate for race to novel therapies for Alzheimer's disease, *Trends Pharmacol. Sci.* 21 (2000) 161–163.
- [6] D. Pratico, N. Delanty, Oxidative injury in diseases of the central nervous system: focus on Alzheimer's disease, *Am. J. Med.* 109 (2000) 577–585.
- [7] R. Subramaniam, T. Koppal, M. Green, S. Yatin, B. Jordan, J. Drake, D.A. Butterfield, The free radical antioxidant vitamin E protects cortical synaptosomal membranes from amyloid beta-peptide (25–35) toxicity but not from hydroxynonenal toxicity: relevance to the free radical hypothesis of Alzheimer's disease, *Neurochem. Res.* 23 (1998) 1403–1410.
- [8] Y. Goodman, M.R. Steiner, S.M. Steiner, M.P. Mattson, Nordihydroguaiaretic acid protects hippocampal neurons against amyloid beta-peptide toxicity, and attenuates free radical and calcium accumulation, *Brain Res.* 654 (1994) 171–176.
- [9] T. Kihara, S. Shimohama, H. Sawada, J. Kimura, T. Kume, H. Kochiyama, T. Maeda, A. Akaike, Nicotinic receptor stimulation protects neurons against beta-amyloid toxicity, *Ann. Neurol.* 42 (1997) 159–163.
- [10] J.T. Jarrett, P.T. Lansbury Jr., Seeding “one-dimensional crystallization” of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* 73 (1993) 1055–1058.
- [11] H. Naiki, F. Gejyo, Kinetic analysis of amyloid fibril formation, *Methods Enzymol.* 309 (1999) 305–318.
- [12] H. Naiki, K. Hasegawa, I. Yamaguchi, H. Nakamura, F. Gejyo, K. Nakakuki, Apolipoprotein E and antioxidants have different mechanisms of inhibiting Alzheimer's beta-amyloid fibril formation in vitro, *Biochemistry* 37 (1998) 17882–17889.
- [13] K. Ono, K. Hasegawa, H. Naiki, M. Yamada, Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro, *J. Neurosci. Res.* 75 (2004) 742–750.

- [14] K. Ono, K. Hasegawa, Y. Yoshiike, A. Takashima, M. Yamada, H. Naiki, Nordihydroguaiaretic acid potently breaks down pre-formed Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro, *J. Neurochem.* 81 (2002) 434–440.
- [15] E. Graf, Antioxidant potential of ferulic acid, *Free Radic. Biol. Med.* 13 (1992) 435–448.
- [16] B.C. Scott, J. Butler, B. Halliwell, O.I. Aruoma, Evaluation of the antioxidant actions of ferulic acid and catechins, *Free Radic. Res. Commun.* 19 (1993) 241–253.
- [17] J.J. Yan, J.Y. Cho, H.S. Kim, K.L. Kim, J.S. Jung, S.O. Huh, H.W. Suh, Y.H. Kim, D.K. Song, Protection against beta-amyloid peptide toxicity in vivo with long-term administration of ferulic acid, *Br. J. Pharmacol.* 133 (2001) 89–96.
- [18] H.S. Kim, J.Y. Cho, D.H. Kim, J.J. Yan, H.K. Lee, H.W. Suh, D.K. Song, Inhibitory effects of long-term administration of ferulic acid on microglial activation induced by intracerebroventricular injection of beta-amyloid peptide (1–42) in mice, *Biol. Pharm. Bull.* 27 (2004) 120–121.
- [19] R. Sultana, A. Ravagna, H. Mohammad-Abdul, V. Calabrese, D.A. Butterfield, Ferulic acid ethyl ester protects neurons against amyloid beta-peptide (1–42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: relationship to antioxidant activity, *J. Neurochem.* 92 (2005) 749–758.
- [20] T. Tomiyama, A. Shoji, K. Kataoka, Y. Suwa, S. Asano, H. Kaneko, N. Endo, Inhibition of amyloid beta protein aggregation and neurotoxicity by rifampicin. Its possible function as a hydroxyl radical scavenger, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 6839–6844.
- [21] G. Forloni, L. Colombo, L. Girola, F. Tagliavini, M. Salmona, Anti-amyloidogenic activity of tetracyclines: studies in vitro, *FEBS Lett.* 487 (2001) 404–407.
- [22] K. Hasegawa, I. Yamaguchi, S. Omata, F. Gejyo, H. Naiki, Interaction between A beta(1–42) and A beta(1–40) in Alzheimer's beta-amyloid fibril formation in vitro, *Biochemistry* 38 (1999) 15514–15521.
- [23] K. Ono, K. Hasegawa, M. Yamada, H. Naiki, Nicotine breaks down preformed Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro, *Biol. Psychiatry* 52 (2002) 880–886.
- [24] H. Naiki, K. Nakakuki, First-order kinetic model of Alzheimer's beta-amyloid fibril extension in vitro, *Lab. Invest.* 74 (1996) 374–383.
- [25] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [26] Y.J. Wang, M.H. Pan, A.L. Cheng, L.I. Lin, Y.S. Ho, C.Y. Hsieh, J.K. Lin, Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15 (1997) 1867–1876.
- [27] R. Kisilevsky, L.J. Lemieux, P.E. Fraser, X. Kong, P.G. Hultin, W.A. Szarek, Arresting amyloidosis in vivo using small-molecule anionic sulphates or sulphates: implications for Alzheimer's disease, *Nat. Med.* 1 (1995) 143–148.
- [28] M. Pappolla, P. Bozner, C. Soto, H. Shao, N.K. Robakis, M. Zagorski, B. Frangione, J. Ghiso, Inhibition of Alzheimer beta-fibrillogenesis by melatonin, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 7185–7188.
- [29] C. Soto, M.S. Kindy, M. Baumann, B. Frangione, Inhibition of Alzheimer's amyloidosis by peptides that prevent beta-sheet conformation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 226 (1996) 672–680.
- [30] H. Zeng, Y. Zhang, L.-J. Peng, H. Shao, N.K. Menon, J. Yang, A.R. Salomon, R.P. Freidland, M.G. Zagorski, Nicotine and amyloid formation, *Biol. Psychiatry* 49 (2001) 248–257.
- [31] W. Linert, M.H. Bridge, M. Huber, K.B. Bjugstad, S. Grossman, G.W. Arendash, In vitro and in vivo studies investigating possible antioxidant actions of nicotine: relevance to Parkinson's and Alzheimer's diseases, *Biochim. Biophys. Acta* 1454 (1999) 143–152.
- [32] N. Sreejayan, M.N. Rao, Nitric oxide scavenging by curcuminoids, *J. Pharm. Pharmacol.* 49 (1997) 105–107.
- [33] M.J. Parnham, K. Kesselring, Rosmarinic acid, *Drug Future* 10 (1985) 756–757.
- [34] G.P. Lim, T. Chu, F. Yang, W. Beech, S.A. Frautschy, G.M. Cole, The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse, *J. Neurosci.* 21 (2001) 8370–8377.

アルツハイマー病の病因

山田正仁*

キーワード アルツハイマー病 老人斑 神経原線維変化 アミロイドβ蛋白 タウ蛋白

はじめに—アルツハイマー病とは何か？

アルツハイマー病 (AD) の確定診断は特徴的な脳病理所見による。すなわち、進行性の痴呆 (認知症) 症状を呈し、神経細胞やシナプスの脱落と共に老人斑や神経原線維変化が脳に蓄積する病態 (図 1A, B) が AD と定義されている。

少量の老人斑や神経原線維変化は健常高齢者においてもみられるが、AD では大量かつ広範に分布している。AD では、脳に老人斑そして神経原線維変化が出現し蓄積していく過程で神経細胞の機能障害や脱落が進行し、その結果、認知機能は低下し、軽度認知障害 (MCI) から痴呆の段階へと進行していく (図 2)。

この病変形成の病因、メカニズムを解明することは、AD の根本的治療法の開発に直結している。本稿では、AD の病因研究の流れを概説し、それらを統合することにより AD 発症メカニズムについて考察する。

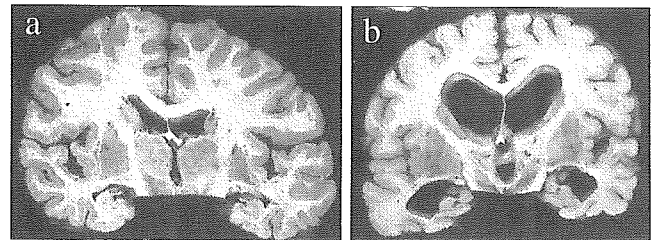


図 1A アルツハイマー病の脳病理 (肉眼所見)
肉眼的には、正常対照 (a) と比較し、アルツハイマー病 (b) は脳萎縮や脳室拡大を示すが、萎縮は側頭葉内側部の海馬領域に特に顕著である。

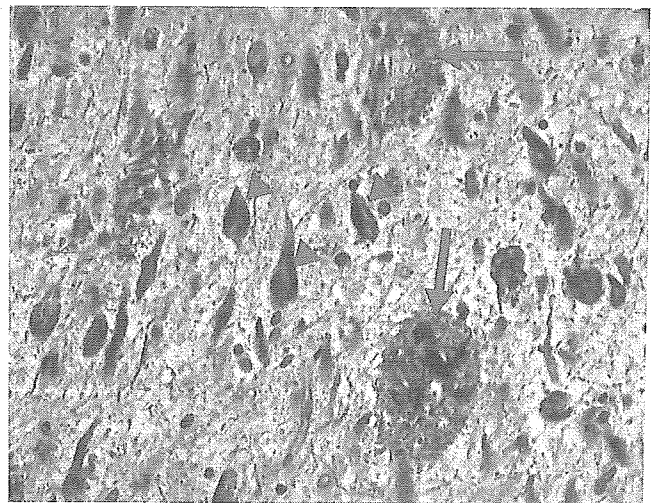


図 1B アルツハイマー病の脳病理 (組織所見)
組織学的には、多数の老人斑 (矢印) および神経原線維変化 (矢頭) が神経細胞やシナプスの脱落と共にみられる。老人斑の主成分はアミロイドβ蛋白 (Aβ) であり、Aβ は変性神経突起を伴う定型的な老人斑や非定型的なびまん性老人斑として脳実質に、さらには血管にも沈着する。一方、神経原線維変化の主成分は異常リン酸化タウ蛋白である。(メセナミン-Bodian 染色、原図×100)



*やまだ・まさひと：金沢大学大学院医学系研究科教授 (脳病態医学講座 脳老化・神経病態学 (神経内科学))。昭和 55 年東京医科歯科大学医学部卒業。主研究領域／脳老化・痴呆、アミロイド、神経感染・免疫 (プリオン病など)。

I. アルツハイマー病の病因研究

1. アルツハイマー病脳の異常沈着物の生化学的研究

AD 脳には老人斑と神経原線維変化という 2

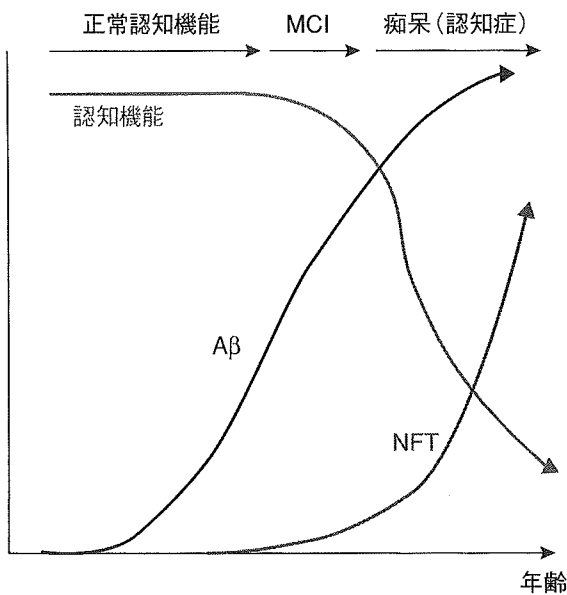


図2 アルツハイマー病脳におけるアミロイドβ蛋白(Aβ)(老人斑)沈着, 神経原線維変化(NFT)の出現と認知機能低下との時間的關係を示す図

Aβの沈着が先行し, その後NFTが蓄積してくる. その過程で認知機能は低下し, 軽度認知障害(MCI)のレベルから痴呆段階へと進行していく.

つの異常沈着物が存在する. それらを糸口に研究が始まった.

(1) 老人斑

老人斑の主成分は, 40個あるいは42個のアミノ酸からなるアミロイドβ蛋白(Aβ: Aβ40/Aβ42)であることが同定された. 細胞外のAβ沈着は, アミロイド線維を形成して老人斑のコアとして存在する場合と, 非線維性で不定型の沈着(びまん性老人斑)として存在する場合がある. AD脳ではアミロイドが変性神経突起によって囲まれている老人斑を多数認める. 一方, 健常高齢者脳でみられる老人斑の多くは, 変性神経突起を伴わないびまん性老人斑である. Aβは脳血管にも沈着し(脳アミロイドアンギオパチー), 脳出血などの血管障害を起こす.

Aβをコードする遺伝子がクローニングされ, Aβは第21染色体上に存在する遺伝子によってコードされているAβ前駆体蛋白(APP)に由来

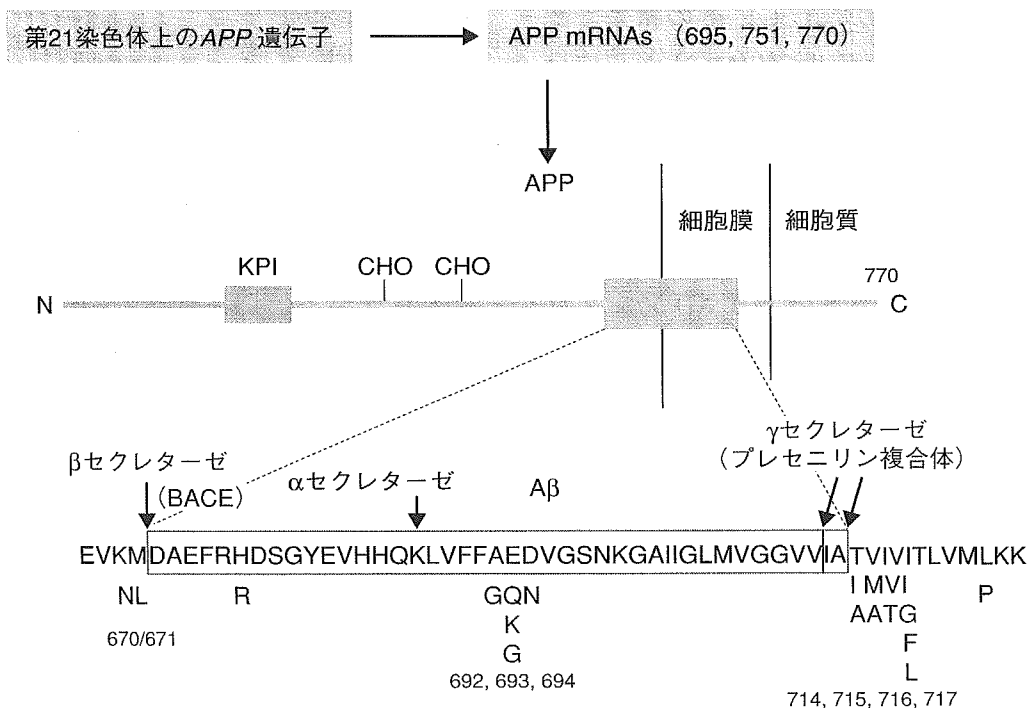


図3 βアミロイド前駆体蛋白(APP)からアミロイドβ蛋白(Aβ)へのプロセッシング下段に家族性アルツハイマー病(主にβおよびγ切断部位周辺)および遺伝性脳アミロイドアンギオパチー(主にAβの中央部)でみられる変異を示す. 家族性アルツハイマー病で, APPのβ切断部位の変異ではAβ40およびAβ42の産生増加, APPのγ切断部位直後の変異およびγセクレターゼの活性部位を構成するプレセニリンの変異ではAβ42の産生増加がみられる. KPI; Kunitz-type protease inhibitor domain, BACE; β-site APP cleaving enzyme.

することが明らかとなった(図3)。APPは広範に発現している膜貫通性蛋白で、APP遺伝子の選択的スプライシングによって生じるアミノ酸695, 751, 770個の3つのアイソフォームが存在する。APPの大部分はA β 構成部分の中央で α セクレターゼによって切断されてA β 産生に至らないが、 α 切断を受けずに、 β セクレターゼおよび γ セクレターゼによって次々と切断された場合にはA β が産生される(図3)。A β は細胞外で重合しアミロイド線維を形成する。A β はモノマーからオリゴマーへの重合の過程で強い神経毒性を発揮するようになる。一方、脳内にはネプリライシンなどのA β 分解酵素を含むA β の分解・除去機構も存在する。

(2) 神経原線維変化

神経原線維変化は、電顕的にはペアになったらせん状フィラメント (paired helical filament; PHF) 構造を示す。PHFの主成分は微小管関連蛋白タウである。成人脳にはタウ遺伝子の選択的スプライシングによって生じる6つのタウのアイソフォームがあり、それらは3ないし4つの微小管結合領域を有する(3または4リピートタウ)。ADでは3および4リピートタウの両者が蓄積し、神経細胞体および突起にPHF構造が出現する。PHFのタウ蛋白は過剰にリン酸化され不溶化しており、ユビキチンが結合している。A β 沈着はAD以外では高齢者脳にみられるのみである。しかし、神経原線維変化や異常タウ蓄積はADや高齢者脳以外のさまざまな神経変性疾患にみられ、そのなかには神経原線維変化型老年痴呆のように、神経原線維変化がAD同様に出現するがA β 沈着を欠く老年期痴呆性疾患も含まれる。

2. アルツハイマー病の分子遺伝学的研究

ADに関連する4つの遺伝子、すなわちAPP、プレセニリン1(PS1)、プレセニリン2(PS2)、およびアポリポ蛋白E(ApoE)遺伝子が同定された。

(1) 家族性アルツハイマー病

常染色体優性遺伝を示す家族性ADが時にみられ、その原因として、APP、PS1、PS2遺伝子変異が報告されている。APP遺伝子の変異(図3)によりAPPのプロセッシングが変化し、A β の過剰産生ないし重合促進を介してA β が異常蓄積することによってADが発症することは、APPからA β 蓄積に至る経路がAD発症機構において中心的な役割を果たしていることを示している[アミロイド(A β)カスケード仮説]。また、家族性ADで数多くの変異が報告されているプレセニリンは多種の細胞に発現する膜貫通型の蛋白で、細胞内シグナル伝達に重要な役割を果たす細胞表面受容体Notchの細胞膜内における切断にかかわっている。APPのプロセッシングにおいては、プレセニリンは γ セクレターゼの活性部位であり、Notchと同様にAPPを細胞膜内で γ 切断する(図3)。プレセニリンの変異は γ セクレターゼ活性を変化させA β 産生を増加させることが知られており、このこともアミロイドカスケード仮説を支持している。

(2) 孤発性アルツハイマー病

通常みられる孤発性ADについては、ApoE遺伝子が疾患感受性遺伝子として確立している。ApoEには、主にE2、E3、E4の3つのアイソフォームと、それぞれに対応する ϵ 2、 ϵ 3、 ϵ 4の3つのアリルがある。そのうち、E4(ϵ 4)は孤発性ADの危険因子であり、E4の数に比例してADのリスクは高まり、発症年齢も低くなる。E4がAD発症を促進する機序は不明であるが、E4がA β の重合を促進したり、A β のクリアランスを減少させる効果を有する可能性などが考えられている。

3. アルツハイマー病のリスクに関する疫学的研究

臨床的観察や疫学的な研究により、さまざまな因子がAD発症に影響することが報告されてきた。そのなかには、頭部外傷(リスクとして

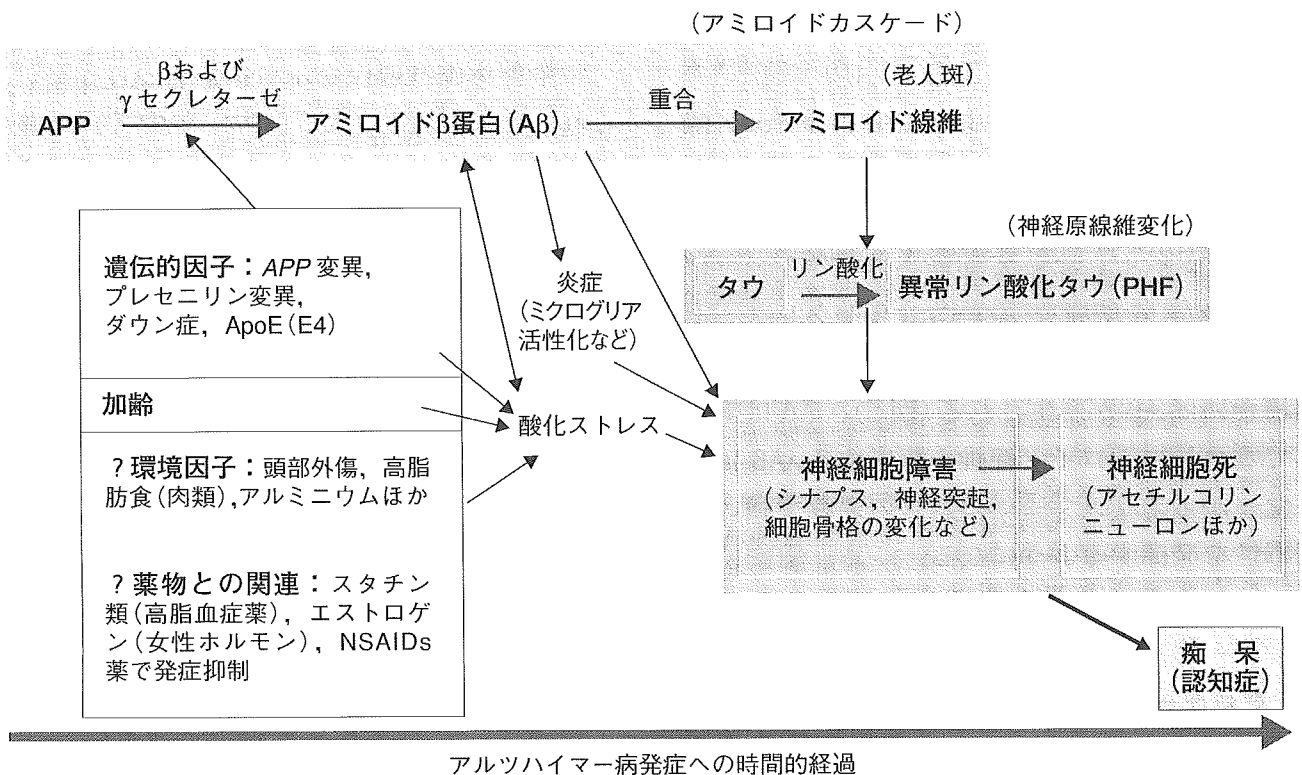


図4 アルツハイマー病の発症メカニズム (仮説)

作用), 食事・栄養性の因子(脂肪やカロリーの過剰摂取はリスクとして作用, 一方, 抗酸化作用を有する栄養因子は防御的に作用など)などが含まれる。また, 非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs), エストロゲン, スタチン類を長期間投与されていた者ではADのリスクが低下することが報告されている。NSAIDsに関しては脳内の炎症が, エストロゲンに関しては閉経期以降のエストロゲンレベルの低下が, スタチン類に関してはコレステロール代謝の異常がADのリスクになっている可能性が考えられる。炎症や酸化ストレスがADの病変形成に関与していることは, AD脳に炎症や酸化ストレスの所見がみられることによって示唆される。

II. アルツハイマー病の発症メカニズムと治療法開発

上記の知見などを総合して組み立てたADの発症メカニズム(仮説)を図4に示す。AD発症

までの時間的経過を下段に示しているが, 重要なポイントは, 痴呆症状発症のはるか以前, おそらく20年ほど前から脳内ではAD病変の形成が始まっている点である。したがって, たとえば70歳前後でのAD発症を予防するためには, 痴呆の前段階であるMCIはもちろん, 認知機能が全く正常である50歳ぐらいの時期から予防的介入を行う必要がある。そのためには, 無症候期のAD脳病変の検出などを含め, 将来的にADを発症する高リスク者を的確に診断する方法を確立することが重要である。

AD病変の形成機序では, APPからAβが産生され, それが重合して老人斑アミロイド沈着に至るアミロイドカスケードが最上流部に位置し, その下流にタウの異常リン酸化とその蓄積(神経原線維変化の形成過程)が, さらにその下流に神経細胞障害・神経細胞死が位置付けられている。上述したようなさまざまな遺伝的因子・環境因子が, 酸化ストレスや炎症などを交えながらAD病変の形成に関与している。

したがって、ADの根本的な予防・治療法開発という観点から考えると、AD発症機序の最上流部に位置するアミロイドカスケードを修飾し阻止することが最も合理的な戦略となる。そのため、 β あるいは γ セクレターゼ阻害による $A\beta$ 産生抑制、 $A\beta$ 重合阻害あるいは重合した $A\beta$ の脱重合、ネプリライシンなどの $A\beta$ 分解酵素の活性増強、 $A\beta$ に対する免疫療法による $A\beta$ 沈着予防・除去などの抗 $A\beta$ 療法の開発が活発に行われている。その他の治療薬候補には抗炎症薬（NSAIDs）や抗酸化薬などが含まれる。

おわりに

ADの病因研究の流れを概説し、それらに基づきAD発症のメカニズムについて考察した。アミロイドカスケードがADの病変形成上、中心的な役割を果たしていると考えられ、それを標的に予防・治療薬開発が行われている。研究は日夜進展しつつあり¹⁾、それに基づき、近い将来、有効かつ安全な根本的治療法が実用化されることを期待したい。

..... 文 献

- 1) Alzheimer Research Forum (<http://www.alzforum.org/home.asp>)

神経原線維変化型老年痴呆

(辺縁系神経原線維変化型痴呆)

山田 正仁

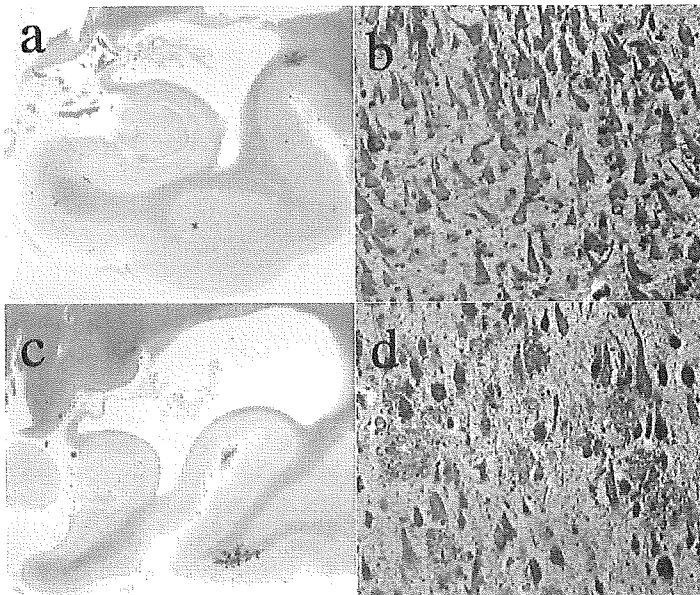


図1 神経原線維変化型老年痴呆 (SD-NFT) (a, b) とアルツハイマー型痴呆 (DAT) (c, d) の海馬領域の比較

SD-NFT は DAT に較べて、海馬領域の萎縮は軽く (a, c)、前シナプス終末の密度も比較的保たれ、アストログリアやミクログリアの増生も軽度である。一方、SD-NFT における神経原線維変化 (NFT) の密度は DAT よりも高い (b, d)。DAT では NFT に加え老人斑がみられる (d)。詳細は文献 5 参照。a, c) HE 染色, 原倍率×1.8, b, d) メセナミン-ボディアン染色, 原倍率×175。

表1 神経原線維変化型老年痴呆 (SD-NFT) の神経病理学的診断基準 (Yamada¹⁾)

- A. 下記の神経病理学的特徴を有する老年期発症の痴呆である
1. 海馬領域に多数の神経原線維変化 (NFT) がある*
 2. 脳全体にわたり老人斑 (A β 沈着) をほとんど欠く
- B. NFT が出現する他の痴呆性疾患を除外できる**

* 多数の NFT が海馬および海馬傍回 (特に, CA 1, 海馬支脚, 嗅内皮質, transentorhinal cortex) にみられ, neuropil threads と神経細胞脱落を伴う。NFT は扁桃核, 島, Meynert 核などにもみられるが, 大脳皮質には稀である。NFT の分布は Braak & Braak 分類の III-IV (limbic stage) に該当するが, 海馬領域における NFT の量ははるかにそれを凌駕している。

** アルツハイマー型痴呆, 進行性核上性麻痺, 石灰化を伴うびまん性神経原線維変化病 (diffuse NFTs with calcification), 第 17 染色体に連鎖する前頭側頭型痴呆およびパーキンソニズム (FTDP-17), 筋萎縮性側索硬化症/パーキンソニズム/痴呆複合病。

神経原線維変化型老年痴呆 (SD-NFT) : 老年期痴呆の一疾患単位

アルツハイマー型痴呆 (DAT) と同様に海馬領域を中心に多数の神経原線維変化 (NFT) を有するが, 老人斑をほとんど欠く痴呆の一群が存在することが従来から知られており¹⁾, しばしば DAT の非典型例あるいは亜型と考えられてきた。筆者らは, こうした病理学的特徴を有する老年期痴呆例を同年代の DAT と多角的に比較し, それが DAT とは異なる新しい疾患単位であることを示し, NFT 型老年痴呆 senile dementia of the NFT type (SD-NFT) という名称を提唱した²⁾。その後, この疾患は辺縁系神経原線維変化型痴呆 limbic NFT dementia, NFT-predominant form of senile dementia, senile dementia with tangles, tangle only dementia などとも呼ばれている³⁾。

SD-NFT の神経病理学的特徴と神経病理学的診断

海馬傍回 (entorhinal/transentorhinal 領域), 海馬 (CA 1 > CA 2) を含む海馬領域に大量の NFT (細胞外 NFT が多い) が neuropil threads と共に分布し, 神経細胞脱落, グリオーシスを伴う (図 1 a, b)¹⁻⁴⁾。Meynert 核, 扁桃核, 中脳水道周囲灰白質, 青斑核, 上中心核等にも NFT は散在するが, 新皮質には NFT は稀にしか認められない。新皮質における NFT 密度は DAT より有意に少ない²⁾。

一方, 老人斑 [アミロイド β 蛋白 (A β) 沈着] はほとんどみられない²⁾。脳血管への A β 沈着 (脳アミロイドアンギオパチー) も, SD-NFT では DAT より有意に軽度である²⁾。嗜銀性顆粒, グリアのタウ陽性封入体 (coiled bodies) が併存する例もある。

海馬領域の病変を DAT と比較すると, SD-NFT の海馬領域の NFT は DAT よりも有意に高密度であるにもかかわらず

やまだ まさひと 金沢大学教授/大学院医学系研究科脳老化・神経病態学 (神経内科学)

0289-0585/05/¥500/論文/JCLS

わらず、海馬領域の萎縮、シナプス密度の減少、グリアの反応は DAT と比較すると有意に軽度である(図 1)⁹⁾。SD-NFT における NFT 形成を伴う海馬領域の神経変性過程は DAT とは異なる⁹⁾。

神経病理学的診断基準を表 1 に示す⁹⁾。SD-NFT は海馬領域の大量の NFT にも関わらず老人斑がほとんどない状態であるが、少数の老人斑(Aβ沈着)がみられる場合、DAT との鑑別が問題になる。海馬領域は加齢と共に NFT が出現する領域である。明らかな痴呆のない百寿者脳にみられる NFT の分布^{7,8)}は、SD-NFT のそれに類似しており、筆者らは、DAT ではなく、SD-NFT が脳の老化過程が加速された病態を表現していると考えている⁵⁻⁸⁾。また、軽度認知障害(MCI)レベルの患者の中に SD-NFT と同様の病理を示す例があり、これは SD-NFT の病変形成過程をみているものと思われる。

SD-NFT の臨床的特徴と臨床診断

SD-NFT は高齢発症のタウオパチーであり、発症は 80 歳以上が多く^{1,2,9)}、90 歳以上の痴呆発症例の 20% を占める²⁾。初老期発症として報告された 1 例があるが、この例は非常に広範囲に NFT が分布し、SD-NFT とは異なった病態を示している¹⁰⁾。家族性発症例の報告はない。

緩徐進行性の痴呆を主徴とするが、高度の記憶障害を有するものの、痴呆の程度としては比較的軽い例がかなりある^{2,9,12)}。初発症状は通常記憶障害である。初期には、記憶障害が主体であり、他の認知機能や人格は比較的保たれ、これは MCI レベルに相当する(前痴呆段階)。記憶障害が緩徐に進行した後、失見当識や他の認知機能障害があらわれる(痴呆段階)。失語、失行、失認などは報告されていない。せん妄などの精神症状もみられる。稀に、筋固縮や歩行障害などの軽度の錐体外路症候の記載がある¹⁾。また、高齢者にしばしばみられる虚血性脳病変の合併が病像を修飾している場合もある。

頭部 CT, MRI では、海馬領域の萎縮と側脳室下角の拡大がみられるが、大脳皮質のびまん性の萎縮は比較的軽度である(図 2)。

アポリポ蛋白 E(ApoE)遺伝子型の検索では、ApoE ε 4 のアリル頻度は DAT と比べて有意に低く^{2,9,11)}、ApoE ε 2 が高頻度であるという報告もある⁹⁾。タウ遺伝子には変異を認めない⁹⁾。

SD-NFT の臨床診断の手引きを表 2 に示す⁹⁾。剖検で

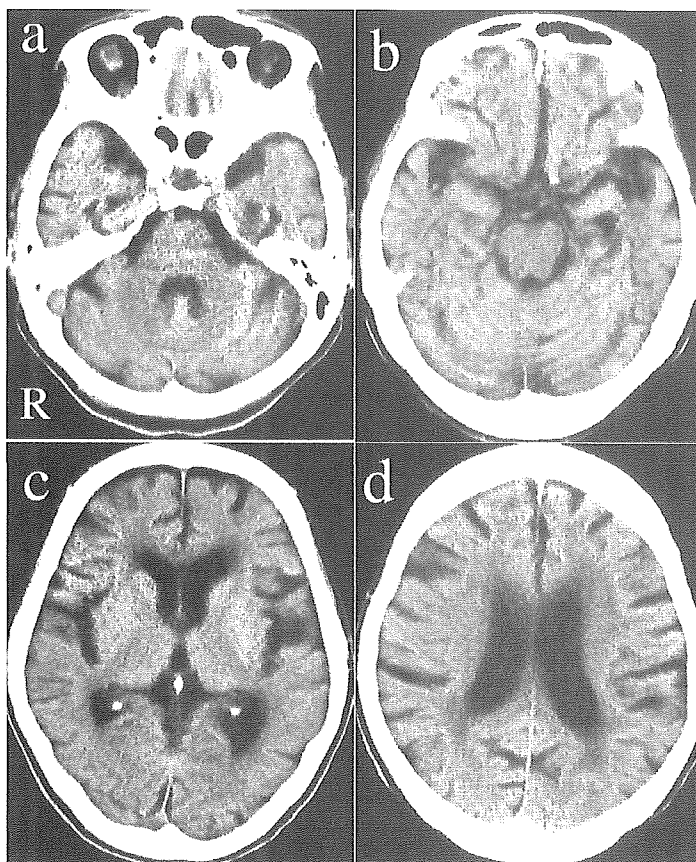


図 2 神経原線維変化型老年痴呆(SD-NFT)の頭部 CT

死亡時 92 歳の女性。記憶障害で発症し、88 歳時には遅延再生の顕著な障害を示す記憶障害と、時間に関する見当識障害がみられ、アルツハイマー型痴呆(軽症)と診断された。CT は 91 歳時に撮られたもので、海馬領域の萎縮に加えてびまん性脳萎縮がみられるが程度は軽い。剖検にて SD-NFT と診断された。

表 2 神経原線維変化型老年痴呆(SD-NFT)の臨床診断の手引き(Yamada⁹⁾)

- 1) 発症： 老年期(特に後期老年期)に記憶障害で発症。
- 2) 臨床症状と経過： 初期は記憶障害を主体とし他の認知機能や人格は比較的保たれる(前痴呆段階)。その後緩徐に進行し、見当識や認知機能も障害されてくる(痴呆段階)。
- 3) 頭部画像(CT/MRI)： 海馬領域の萎縮と側脳室下角の拡大(大脳皮質のびまん性萎縮は軽度)。
- 4) 鑑別診断： アルツハイマー型痴呆および他の非アルツハイマー型変性痴呆を鑑別。

SD-NFT と確定診断された多くの例が DAT と臨床診断されており、DAT や他の非アルツハイマー型変性痴呆との鑑別診断が問題となる⁹⁾。高齢で発症する DAT は、症候的にも記憶障害を主体として進行して明瞭な皮質巣症状を欠き、病変も側頭葉内側部に限局性に神経変性が強調されるタイプが多く²⁾、SD-NFT と共通点が多い。今後、鑑別診断のための補助診断法の確立が必要である。

画像診断に関しては、SD-NFT ばかりでなく DAT においても海馬領域の萎縮がみられるため、鑑別診断におい

て、CTあるいはMRIなどの形態画像の有用性には限界がある。SD-NFTをDATや他の痴呆から鑑別する上で、SPECTやPETなどの機能画像の役割が期待されるが、未だ十分なデータが蓄積されていない。[^{99m}Tc]-HMPAO SPECTによる検討で、局所的な側頭葉機能障害を示すDATの一群が、側頭葉内側領域に局限した血流低下を示すことが報告されているが¹³⁾、こうした一群の中には、海馬領域に比較的局限した神経変性を示すDATのサブグループ²⁾ばかりではなく、SD-NFTが含まれている可能性がある。神経病理学的な検索によって診断が裏づけられた症例群における検討が必要である。さらに将来的には、NFTタウをA β 沈着とは区別して検出できるPETトレーサーが開発され、本疾患の病理学的特徴をそのままPETで描出することができるようになることが期待される。

そのメカニズムは明らかではないものの、DATでは脳

脊髄液中のタウ(リン酸化タウ)上昇、A β 1-42の低下がみられることが報告され、DATの臨床診断に利用されている。A β 沈着のないSD-NFTでは髄液中のタウの異常はみられるがA β の異常がみられないものと仮定すれば、こうした髄液マーカーの検索がSD-NFTとDATの鑑別診断に有用である可能性がある。しかし、A β の沈着がみられない神経疾患においても髄液A β 1-42の低下がみられることも報告されており、SD-NFTの鑑別診断における髄液マーカー検索の臨床的有用性を明らかにするためには、やはり病理学的に確定診断された例でのデータの蓄積が必要である。

謝辞：本研究は浴風会病院の伊藤嘉憲先生ほかの先生方との共同研究によるものであり、深謝いたします。

文 献

- 1) Ulrich J, Spillantini MG, Goedert M, et al. Abundant neurofibrillary tangles without senile plaques in a subset of patients with senile dementia. *Neurodegeneration*. 1992 ; 1 : 257-64.
- 2) Yamada M, Itoh Y, Otomo E, et al. Dementia of the Alzheimer type and related dementias in the aged : DAT subgroups and senile dementia of the neurofibrillary tangle type. *Neuropathology*. 1996 ; 16 : 89-98.
- 3) Jellinger KA, Bancher C. Senile dementia with tangles (tangle predominant form of senile dementia). *Brain Pathol*. 1998 ; 8 : 367-76.
- 4) Itoh Y, Yamada M, Yoshida R, et al. Dementia characterized by abundant neurofibrillary tangles and scarce senile plaques : a quantitative pathological study. *Eur Neurol*. 1996 ; 36 : 94-7.
- 5) Yamada M, Itoh Y, Sodeyama N, et al. Senile dementia of the neurofibrillary tangle type : a comparison with Alzheimer's disease. *Dement Geriat Cogn Disord*. 2001 ; 12 : 117-25.
- 6) Yamada M. Senile dementia of the neurofibrillary tangle type (tangle only dementia) : the neuropathological criteria and clinical guidelines for the diagnosis. *Neuropathology*. 2003 ; 23 : 311-7.
- 7) Itoh Y, Yamada M, Suematsu N, et al. An immunohistochemical study of centenarian brains : a comparison. *J Neurol Sci*. 1998 ; 157 : 73-81.
- 8) Yamada M, Itoh Y, Sodeyama N, et al. Aging of the human limbic system : observations of the centenarian brains and analyses of genetic risk factors for the senile changes. *Neuropathology*. 1998 ; 18 : 228-34.
- 9) Ikeda K, Akiyama H, Arai T, et al. A subset of senile dementia with high incidence of the apolipoprotein E ϵ 2 allele. *Ann Neurol*. 1997 ; 41 : 693-5.
- 10) Niizato K, Tsuchiya K, Nakamura R, et al. An autopsied case of presenile dementia with tangles. *No To Shinkei*. 2001 ; 53 : 659-64.
- 11) Bancher C, Egnesperger R, Kosel S, et al. Low prevalence of apolipoprotein E ϵ 4 allele in the neurofibrillary tangle predominant form of senile dementia. *Acta Neuropathol*. 1997 ; 94 : 403-9.
- 12) Ikeda K, Akiyama H, Arai T, et al. Clinical aspects of "senile dementia of the tangle type"—a subset of dementia in the senium separable from late-onset Alzheimer's disease. *Dement Geriat Cogn Disord*. 1999 ; 10 : 6-11.
- 13) Cappa A, Calcagni ML, Villa G, et al. Brain perfusion abnormalities in Alzheimer's disease : comparison between patients with focal temporal lobe dysfunction and patients with diffuse cognitive impairment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2001 ; 70 : 22-7.

トピックス

痴呆患者のコミュニケーション指標

武田 章 敬^{*1}鷺見 幸彦^{*1}川合 圭成^{*2}祖父江 元^{**2}

はじめに

コミュニケーションには、「情報の伝達」と「人と人の共同世界の構築」という2つの機能があると言われて¹⁾いる。情報の伝達は我々が環境や社会により良く適応して生きていくうえで必要不可欠であり、良好なコミュニケーションを通して共同世界を構築することで、人は不安や孤独を癒し、意欲を向上させ、生活を充実させることができる。痴呆患者は脳の障害により記憶や見当識、判断力の障害を来し、それに伴い、不快感や不安、緊張、混乱などを感じている。さらにコミュニケーション能力も多かれ少なかれ障害されていることが多く、また、介護者の痴呆に関する知識の不足や痴呆患者との関係性の悪化などもあり、コミュニケーションが適切に機能していないことが多い。その結果、痴呆患者の不安感や不満、緊張は解消されず、むしろ増大し、行動障害を引き起こす一因となっていると考えられる。また、痴呆患者のQOLを考えたとき、周囲の人との良好な人間関係があることが痴呆患者のQOLの高さと大いに関係していることは疑う余地もなく、コミュニケーションを良好に保つことが痴呆ケアの目的の1つになると思われる。以上の点から、痴呆患者のコミュニケーション能力を評価することは、環境や社会でより良く生きていく能力を測定すると同時にQOLを保つ能力を評価することとも関連しており、意味のあることと考

える。

コミュニケーションは、その構造面からさまざまなとらえ方をすることができる。言葉を用いた言語的コミュニケーションや、身振り手振りやジェスチャーなどといった非言語的コミュニケーションに分類されたり、意味と感情のやりとり²⁾としてとらえられたり、その対象から他者・自己・環境とのコミュニケーションに分類される場合などがある。このように多面的な構造を持つコミュニケーションの性格から、コミュニケーション指標を作成し使用する場合において、その指標が「コミュニケーション」や「コミュニケーション能力」をどのように定義しているかを明らかにしておくことが重要であると考えられる。

これまでに作成された
コミュニケーション指標

町田らは、「話し言葉による意思の伝達」というコミュニケーションの定義のもと、ミニコミュニケーションテストを開発した^{3,4)}。この指標は、見当識、発声能力、数唱、復唱、呼称、口頭命令、語列挙、情景画の説明、短文の音読から成り立っている。また、坊岡らの開発した高齢者用コミュニケーション機能スクリーニング検査は、あいさつ、名前、書字、呼称、記憶、聴覚理解、反復嚥下、発声持続、diadochokinesis、復唱、漢字理解、会話から成り、報告書も備えている点が特徴的である⁵⁾。綿森らが開発した実用コミュニケーション能力検査は、実際の生活場面のシミュレーションを用いることにより日常コミュニケーション能力を評価す

*1 国立長寿医療センター

*2 名古屋大学大学院医学系研究科 神経内科学

**2 同 教授

ることができ、その下位項目は型にはまった表現、Yes-No 反応、(命令・情報に応じて) 行動を起こす、情報検索、情報提供、依頼・要求、書く、数量の操作、時間、ラジオ・テレビの視聴、新聞・雑誌を読むといったカテゴリーに含まれる項目で形成されている⁶⁾。

また、回想法の効果測定に用いられている東大式観察評価スケール⁷⁾は、セッション中の言語的コミュニケーション、非言語的コミュニケーション、注意・関心、感情の各領域に含まれるそれぞれ5項目について観察により評価するものであり、本多らが作成した「痴呆患者の表情による心理評価スケール (Psychological Assessment Scale by Facial Expression for Demented People : PAFED)⁸⁾」は、痴呆患者のデイケアの個別プログラムに対する他者への関心・意欲など心理的側面を表情から評価する方法であり、いずれもコミュニケーションと深く関連しており興味深い。

簡易コミュニケーションスケールの開発と標準化

我々はコミュニケーションに必要な能力を幅広く評価し、重度の痴呆患者にも短時間で負担をかけずに施行できるコミュニケーション指標の作成を目的として以下の試行を行った⁹⁾。

まず、コミュニケーション能力の操作的な定義を明確にするために、痴呆性高齢者の臨床に携わる臨床心理士と言語聴覚士、医師を対象として、「良好なコミュニケーションをとるために必要な能力」に関して半構造化面接を行った。その結果抽出された項目は、「言語理解力」、「言語表現力」、「語彙」、「文法」、「相手の非言語的な意思の表出を理解すること」、「非言語的な表現力」、「感情理解能力」、「感情表現力」、「情報処理能力」、「判断力」、「見当識」、「記憶」、「行為」、「視線を合わせる」、「伝統的・文化的・社会的ルールを守る」、「同じ体験・気持ちを共有していること」、「状況の理解」、「注意力」、「集中力」、「意欲」、「あいさつ」、「抑揚」、

「リズム」、「ユーモア」、「視力」、「聴力」であった。このようにして得られた項目を可能な限り含むようにしつつ、既存のさまざまな指標も参考にして9の検査項目を選択し試案とした。予備的調査の結果を検討し、9の検査項目のうち1つを削除し8項目として「簡易コミュニケーションスケール」とした(図1)。妥当性の検討は、ケアスタッフへの質問紙による痴呆性高齢者のコミュニケーション能力の評価との相関、GBS、HDS-R、MMS との相関、内的一貫性の検討で行った。また信頼性の検討は、検者間信頼性、検査-再検査信頼性、Cronbachの α 係数を用いて検討した。その結果、本尺度が痴呆性高齢者のコミュニケーション能力を評価するという目的での臨床的使用に耐えうる妥当性・信頼性を持つことが明らかになった。

三重県の介護老人保健施設、特別養護老人ホームに入所中の痴呆性高齢者70名を対象に、簡易コミュニケーションスケール、改訂長谷川式簡易知能評価スケール(HDS-R)、Mini-Mental State (MMS)、GBS スケールを施行し、6ヵ月後にも同様の検査を施行した。対象となった痴呆性高齢者の平均年齢は 81.6 ± 8.0 歳で、性別は男性12例、女性58例である。原因疾患はアルツハイマー型痴呆41例、脳血管性痴呆28例、前頭側頭型痴呆1例である。

表1に示すように、70例の施設入所中の痴呆性高齢者の簡易コミュニケーションスケールの得点は6ヵ月間で平均2点低下した。原因疾患別ではアルツハイマー型痴呆で2.6点、脳血管性痴呆で1.3点の低下を認めた。

また、表2、図2に示すように簡易コミュニケーションスケールの6ヵ月間の変化はGBSスケールの特に知的機能、感情機能の変化と相関を示していた。

以上の結果は、簡易コミュニケーションスケールが痴呆性高齢者のコミュニケーション能力を縦断的・経時的に測定する尺度として使用できる可能性を示唆するものと考えられた。

図1 簡易コミュニケーションスケール (文献⁹⁾より引用)

1. おじぎをして『こんにちは』などのあいさつに対して
 - 0: 無反応
 - 1: 視線を向けるのみ, あるいはあいさつとは無関係な反応
 - 2: うなずき, おじぎ, 微笑の反応はある
 - 3: 言葉によるあいさつをする
2. 『お名前をおっしゃって下さい』に対して
(姓あるいは名みの場合, 『苗字あるいは名前もお願いします』と言う)
 - 0: 無反応
 - 1: 反応はあるが発語はない
 - 2: 発語はあるが正確に自分の氏名を言えない (旧姓や配偶者の名前, 姓あるいは名の一方のみ)
 - 3: 正しく自分の氏名を言える
3. 『手を挙げて下さい』に対して (無反応あるいは正しくできない場合は検者がやってみせる)
 - 0: 無反応
 - 1: 反応はあるが手を挙げる動作はみられない
 - 2: 言葉の指示だけでは正しくできないが, 検者がやってみせれば正しくできる
 - 3: 言葉の指示だけで正しくできる
4. 『桜の花は秋に咲きますか?』に対して
 - 0: 無反応
 - 1: 何らかの反応はあるが, 質問に対する答えになっていない
 - 2: 正しくない答え, 『わからない』『知らない』などの答え
 - 3: 正しい答え
5. 『好きな食べ物をひとつ教えて下さい』と言う。
(『何でも好き』などの答えの場合『ひとつだけ教えて下さい』と答えを促す. 好きな食べ物を言えない場合, さらに『おまんじゅうは好きですか?』ときく.)
 - 0: 無反応
 - 1: 反応はあるが, 好きな食べ物は言えず, おまんじゅうの好き嫌いも伝えられない
 - 2: 好きな食べ物は言えないが, おまんじゅうが好きかどうかは伝えられる
 - 3: 好きな食べ物を言える
6. 『私とじゃんけんをして下さい』と言って手を出しながらじゃんけんをする (じゃんけんが正しくできた場合, さらに『どちらの勝ちですか?』ときく.)
 - 0: 無反応
 - 1: 何らかの反応はあるが正しくじゃんけんができない
 - 2: じゃんけんは正しくできるが, どちらが勝ったかが判断できない
 - 3: どちらが勝ったか判断できる
7. 『握手をして下さい』と言って握手をするように片方の手を差し出した時
 - 0: 無反応
 - 1: 何らかの反応はあるが握手の動作はみられない
 - 2: 握手の動作はみられるが正しくできない (反対の手を出すなど)
 - 3: 正しく握手ができる
8. 感情表現 (検査中の状態や検査後お礼を言った時の反応)
 - 0: 無反応
 - 1: 反応はあるが感情表現は全くない
 - 2: 感情表現は乏しい, または状況にはあっていない (抑うつ, 感情失禁など)
 - 3: 状況にふさわしい感情表現 (微笑や謙遜など)

表1 簡易コミュニケーションスケールの初回および6ヵ月後の平均値（標準偏差）と6ヵ月間での低下

対象	初回	6ヵ月後	6ヵ月間での低下
全症例 (n=70)	19.8 (5.3)	17.8 (6.8)	2.0 (3.4)
アルツハイマー型痴呆 (n=41)	19.1 (5.5)	16.5 (7.2)	2.6 (3.8)
脳血管性痴呆 (n=28)	21.0 (3.4)	19.7 (4.5)	1.3 (3.0)

表2 簡易コミュニケーションスケール、MMS、HDS-RとGBSスケールの6ヵ月間の変化の相関

尺度	GBS			
	運動	知的	感情	その他
簡易コミュニケーションスケール	0.236	0.591****	0.448***	0.239*
MMS	0.073	0.348**	0.216	0.038
HDS-R	0.096	0.287*	0.283*	0.199

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.0005, **** p<0.0001

略語：巻末の「今月の略語」参照

これまでのコミュニケーション指標の問題点

我々が作成した簡易コミュニケーションスケールを含め、これまでのコミュニケーション指標に関して以下のような問題点があると考えられる。

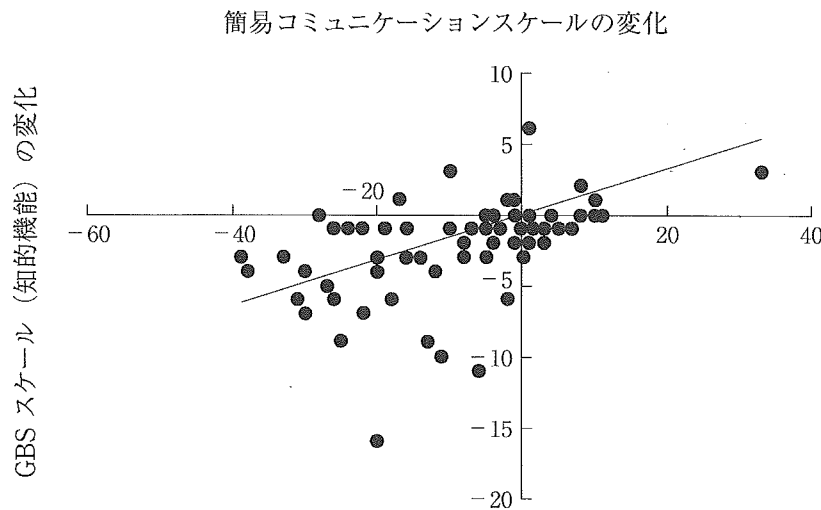
① 発症早期の痴呆患者のコミュニケーション障害のスクリーニングから重度の患者の追跡調査、介入の効果判定まで、一貫して使用できる指標がない。

② これまでのコミュニケーション指標は失語症患者を対象に開発された指標が多く、言語面の評価に重点が置かれる傾向にあった。痴呆患者では失語症患者と異なり、言語機能以外の認知機能の障害があり、それが痴呆患者のコミュニケーション障害に大きく影響している。このため言語的コミュニケーションに局限した指標では、痴呆患者のコミュニケーション障害の限られた部分しか評価できない可能性がある。また、多くの痴呆患者では感情機能や手続

き記憶は発症早期には比較的保たれており、病状の進行とともに徐々に障害されていくという特徴があるが、これらの機能はコミュニケーションに不可欠であり、しかも長期間にわたり測定可能な評価項目として重要と考える。さらに、アクティビティ・ケアなどの介入によってアルツハイマー型痴呆患者の情緒の安定など感情機能が改善することがしばしば報告されており、この改善によりコミュニケーションも改善することが考えられるが、感情機能などを含めない指標ではこの改善を評価できない可能性がある。以上から継続評価や介入効果の評価など、使用目的によってはコミュニケーション能力の評価に感情表現や非言語的コミュニケーションなどを含める必要があると思われる。

③ HDS-R や MMS といった簡易知能検査であっても、施行する人や状況によって得点に変化することは日常的に経験されることであるが、コミュニケーション能力、特に感情表現などを評価する場合、検査する人や場、状況によって得点に変化する可能性がある。また、健常

図2 簡易コミュニケーションスケールと GBS スケール (知的機能) の変化の相関関係



人であっても個人差の大きい部分でもあり、いかにしてその尺度の信頼性を保つかが重要な問題となってくる。

以上の点を踏まえて、現在、より良いコミュニケーション指標の開発を試みている。

文 献

- 1) 野村豊子: コミュニケーションスキル. 痴呆ケア標準テキスト; 痴呆ケアの実際 I: 総論 (日本痴呆ケア学会 編), p39-61. ワールドプランニング, 東京, 2004.
- 2) 齋藤 孝: コミュニケーション力, p2-8. 岩波書店, 東京, 2004.
- 3) 町田綾子: コミュニケーションの評価. 高齢者総合的機能評価ガイドライン (鳥羽研二 監修), p115-122. 厚生科学研究所, 東京, 2003.
- 4) 町田綾子, 他: 痴呆性高齢者の認知・言語コミュニケーション能力を短時間で測定する「ミニコミュニケーションテスト-MCT」の開発と信頼性・妥当性の検討. 日老医誌 40: 274-281, 2003.
- 5) 坊岡峰子, 他: 高齢者用コミュニケーション機能スクリーニング検査 (CFSE) の開発. 広島県立保健福祉大学誌 人間と科学 4 (1): 61-74, 2004.
- 6) 綿森 淑, 他: 実用コミュニケーション能力検査の開発と標準化. リハ医学 24: 103-112, 1987.
- 7) 黒川由紀子, 他: 東大式観察評価スケール. 回想法グループマニュアル, p75-78. ワールドプランニング, 東京, 1999.
- 8) 本多雅亮, 他: デイケアプログラムにおける痴呆患者の表情による心理評価スケールの作成. 老年精医誌 12: 787-793, 2001.
- 9) 武田章敬, 他: 痴呆性高齢者に対する簡易コミュニケーションスケール作成の試み. 日老医誌 41: 402-407, 2004.

Communication Ability Scale for Demented Elderly

Akinori Takeda¹, Yukihiko Washimi¹,
Yoshinari Kawai², Gen Sobue²

¹ National Center for Geriatrics and Gerontology

² Department of Neurology, Nagoya University Graduate School of Medicine

痴呆疾患に関する医療経済的検討

鷲見 幸彦 太田 壽城

〈要 約〉 加速する高齢社会は痴呆患者の増加とその治療、診断、ケアに対するコストの増大をきたすと予想され、痴呆疾患に対するなんらかの介入による経済効果を検討することは極めて重要である。

本総説では痴呆疾患の有病率、新規発症率、患者数、経過・予後、費用などの疫学、基礎データについて検討し、次に主としてアセチルコリンエステラーゼ阻害薬市販後の痴呆の治療、診断、ケアに対する医療経済的検討に関する論文を review した。

わが国の 65 歳以上の高齢者の痴呆有病率は約 5% と考えられ、発症率は年間約 1,000 人に 10 人程度 (1%) と考えられる。現在のアルツハイマー病患者数は日本で約 160 万人と考えられる。米国における患者数は約 300 万人、直接、間接費用の総和は 10 兆円以上と推計されている。

痴呆疾患における薬物療法の経済効果に関しては薬剤の長期的な有効性を示すデータに乏しいことから短期データを元に予測したデータになるが、部分的には費用削減効果があるという結論である。長期的に服薬できればさらに費用削減効果は高くなると考えられる。

介護保険の要介護認定者における痴呆性高齢者データでは、痴呆性老人自立度 2 以上の患者数は 2015 年には 250 万人、2030 年には 353 万人、2045 年には 378 万人になると推定している。米国での試算では発症を 1 年遅らせることができると 10 年後には 21 万人 AD に苦しむ人が減少し、約 100 億ドルの費用削減になるとの推計がある。

本邦と欧米諸国では医療体制、保険制度の相違はあるが、このような費用対効果研究では痴呆患者がどのようなケアや治療をうけているのか全国的な実態把握が必要である。

Key words : 痴呆, 医療経済, 費用経済効果

(日老医誌 2004; 41: 451—459)

はじめに

高齢社会の急激な進行に伴って老人医療費は急増し、1999 年には 11 兆 8,000 億円となった¹⁾。加速する高齢社会は痴呆患者の増加とその治療、診断、ケアに対するコストの増大をきたすと予想され、痴呆疾患に対するなんらかの介入による経済効果を検討することは極めて重要である。

1997 年 Ernst らはアルツハイマー病 (AD) に関する経済効果の論文をレビューしており、具体的な治療を行ったときにどのような経済効果が得られるかという論文の必要性和、アメリカ合衆国においても AD のケアの需要がどのくらいあるのか明確でなく早急に全国の患者及び介護者のサンプリングをおこない、ケアの状況とコストを正確に評価する必要があることを強調した²⁾。

本総説ではまず痴呆疾患の有病率、新規発症率、患者数、経過・予後、費用などの疫学、基礎データについて検討し、次に主としてアセチルコリンエステラーゼ阻害薬市販後の痴呆の治療、診断、ケアに対する経済効果について検討した論文についてまとめた。文献は PubMed で dementia, Alzheimer disease, cost-effectiveness, cost-benefit analysis, incidence, prevalence 等のキーワードで検索を行った。医療経済に関する文献については NHS-EED (National Health Service-economic evaluation database) も利用した。また国内の原著、総説については共同研究者の文献ファイルから目的に合致した文献を採用した。

痴呆疾患の疫学・基礎データ

1) 痴呆疾患の有病率 (表 1)

本邦の痴呆の有病率 (prevalence rate) に関する調査研究は 1970 年代から 20 カ所以上の地域で検討されてきている。1990 年代以降のものとしては、東京都³⁾、群馬

The economic and social costs of dementia
Yukihiko Washimi, Toshiki Ohta : 国立長寿医療センター