

2005, 00792 A

厚生労働科学研究研究費補助金

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17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 堂浦 克美

平成18年（2006年）4月

目 次

ページ

I. 総括研究報告書	
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 堂 浦 克 美 (東北大学大学院医学系研究科)	・ ・ ・ ・ 1
II. 分担研究報告書	
プリオン病の画期的治療法に関する研究 山 田 達 夫 (福岡大学医学部)	・ ・ ・ ・ 8
プリオン病の画期的治療に関する臨床研究 福 島 武 雄 (福岡大学医学部)	・ ・ ・ ・ 11
細胞培養液中および生体試料中ペントサン硫酸濃度の測定法に関する研究 片 岡 泰 文 (福岡大学薬学部)	・ ・ ・ ・ 15
経口投与型治療予防薬の開発研究 堂 浦 克 美 (東北大学大学院医学系研究科)	・ ・ ・ ・ 18
新たな治療薬開発の標的となる宿主因子の探索 堂 浦 克 美 (東北大学大学院医学系研究科)	・ ・ ・ ・ 22
プリオン構造緩解作用を持つ治療薬の探索 堂 浦 克 美 (東北大学大学院医学系研究科)	・ ・ ・ ・ 26
末梢投与可能な次世代型プリオン病治療薬開発に関する研究 堂 浦 克 美 (東北大学大学院医学系研究科)	・ ・ ・ ・ 30
プリオン病の画期的治療法の開発のための基礎的研究 西 田 教 行 (岐阜大学人獣感染防御研究センター)	・ ・ ・ ・ 34
Fyn欠損マウスにおけるプリオン病に関する研究 村 本 環 (東北大学大学院医学系研究科)	・ ・ ・ ・ 38
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	・ ・ ・ ・ 40
IV. 研究成果の刊行物・印刷	



総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
平成17年度 総括研究報告書

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

主任研究者：堂浦克美 東北大学大学院医学系研究科・教授

研究要旨

ペントサンポリサルフェート脳室内持続投与療法をプリオン病患者で実施して、その効果と安全性について検討を行い、治療プロトコルを完成させることが本研究の目的の一つである。平成17年度は、新たに4例のプリオン病患者において同治療法を実施し、合計6例の患者において効果と安全性の検討を行った。また、ペントサンポリサルフェートの最適濃度設定のために必要な髄液中のペントサンポリサルフェート濃度測定法を確立した。

一方、本研究のもう一つの目的である次世代型治療薬開発においては、経口投与で治療予防効果のある化合物を開発した。また、皮下単回投与で著明な治療予防効果のある化合物について、作用機序解明の手掛りを得た。さらに、新たな治療薬の標的として、複数の宿主因子を候補として同定することが出来た。画期的治療法開発に関する基盤研究では、ワクチン療法へ発展する可能性があるプリオン感染干渉現象について、その存在を細胞レベルで証明した。また、神経再生療法開発に関する研究で、神経分化能を持つ骨髄間質細胞がプリオンに持続感染すること、感染個体から得た骨髄間質細胞にプリオンが感染していることを発見した。さらに、治療薬開発の迅速化に欠かせない疾患早発動物の候補として、プリオン蛋白とインフルエンザウイルスHA蛋白との融合蛋白を発現する遺伝子改変マウスの作出に成功した。

分担研究者

山田達夫	福岡大学医学部・教授
福島武雄	福岡大学医学部・教授
片岡泰文	福岡大学薬学部・教授
村本 環	東北大学大学院医学系研究科・助教授
西田教行	岐阜大学人獣感染防御研究センター・助教授

A. 研究目的

英国をはじめ本邦では、多数の後天性プリオン病 (man-made disease) が若年層でも発生しており、実効性のある予防治療法が至急に求められている。本研究は二つの目標を持っている。主任研究者が開発したペントサンポリサルフェート脳室内持続投与療法を日本のプリオン病患者に実施して、その効果と安全性について検討を行い、同治療法を普及させ治療プロトコルを完成させることが目標の一つである。また、

ペントサンポリサルフェート脳室内持続投与療法に取って代わる末梢投与可能な治療薬の開発と次世代型の画期的治療法となる方策の糸口を見つけることがもう一つの目標である。

B. 研究方法

(1) 画期的治療法の臨床研究

山田、福島はペントサンポリサルフェート脳室内持続投与療法 of 臨床研究のための環境整備の改善を行い、プリオン病患者

に同治療法を実施して、その経過を観察して効果と安全性を調べた。片岡はペントサンポリサルフェートの脳室内投与における薬物動態を解析するための髄液中薬物濃度測定法を開発した。

(2)次世代型治療法開発の基礎研究

堂浦は疾患モデル動物において経口投与で治療予防効果のある化合物を新たに開発した。昨年度報告した皮下への投与で治療効果を示した成分に関して体内動態研究を行った。また、新たにプリオン高次構造緩解薬物の探索を行った。さらに、新たな治療開発のターゲットとなる宿主因子を探索した。西田は、昨年度報告したプリオン感染干渉現象を培養細胞系で証明した。また、骨髄間質細胞を用いた神経再生治療のための基礎的研究を継続し、プリオン感染について検討した。村本は、プリオンの神経変性における fyn の関与をノックアウトマウスを用いて検討した。また、昨年度の各種膜貫通型プリオン蛋白の異常化能の検討結果を踏まえて、神経変性機序解明と治療薬開発の迅速化に欠かせない疾患早発動物の候補として、プリオン蛋白とインフルエンザウイルス HA 蛋白との融合蛋白を発現する遺伝子改変マウスを作出した。

(倫理面への配慮)

患者に対する臨床試験は、患者が入院中の各施設における倫理審査委員会の承認を得て行われ、患者・家族にインフォームドコンセントを行い、同意を得た場合にのみ治療研究が開始された。動物実験は、研究者所属施設の動物実験委員会の指針の範囲内で行われた。

C. 研究結果

(1)画期的治療法の臨床研究

今年度新たに4例のヤコブ病患者でペントサンポリサルフェート脳室内投与を開始し、合計6例の患者でその効果と安全性を検討し、次のことを発見した。①明らかな臨床症状の改善はなく、孤発性ヤコブ病のMM1型と考えられる進行の早い3症例では症状の進行が続いている。②MM2型が疑われる症例と家族性ヤコブ病症例では治療開始後に症状が安定化している。③合併症の可能性として、1例に部分てんかんを、4例に硬膜下水腫を認めた。英国の治療研究者(Nikolai Rainov博士)と情報交換を行い、同様なことが海外の患者でも起こったことを確認した。

一方、脳室内に投与したペントサンポリサルフェートの動態を解析するための定量法として、除蛋白質操作を加えた sGAG Alcian Blue Binding Assay Kit が有用であることを発見した。また、治療に関する普及活動では、「プリオン病および遅発性ウイルス感染に関する調査研究」班との連携により、プリオン病治療に関する啓発が着実に進展した。

(2)次世代型治療法開発の基礎研究

ペントサンポリサルフェート脳室内投与療法に取って代わる末梢投与可能な治療薬の開発では、複数のプリオン株において脳内感染させた疾患モデル動物において経口投与で治療予防効果のある化合物を発見した。これは、これまでに報告している抗プリオン作用を持つアミロイド親和性化合物に関する研究を発展させたもので、脳移行性に優れている化合物の中から見つかった成果である。また、昨年度報

告した皮下への投与で治療効果を示した成分に関して体内動態研究を行い、長時間かけて徐々に血管内に吸収され、血管内で長時間にわたり安定に存在し、脳内に移行し直接プリオンに作用することを示唆するデータが得られ、実用化に一步近づいた。さらに、今年度は新たにプリオン高次構造緩解薬物の探索を行い、検討した限り全てのプリオン株感染細胞で有効であり、生体にすぐにでも応用できるものを発見した。また、今年度は新たな治療開発のターゲットとなる宿主因子の同定を目指して、プリオン持続感染細胞においてRNA干渉による遺伝子スクリーニングでプリオン産生に関する宿主因子を探索し、12個の候補因子を発見した。

一方、次世代型の画期的治療法の糸口を見つけようとする基盤的研究では、昨年度報告したプリオン感染干渉現象を培養細胞系で証明し、免疫系を介さないワクチン療法の可能性を示した。また、骨髄間質細胞を用いた神経再生治療のための基礎的研究を継続し、神経分化能を持つ骨髄間質細胞がプリオンに持続感染すること、疾患動物から得た骨髄間質細胞にプリオンが感染していることを発見した。

さらに、GPIアンカーを欠いたプリオン蛋白を発現するマウスの実験より、プリオン蛋白からGPIアンカーを介した何らかのシグナル伝達が神経変性に必要であることが判明しており、そのシグナル伝達系としてfynの関与をノックアウトマウスを用いて検討した。その結果、fynはプリオンの病原性発現に影響を与えないことが明らかとなった。また、昨年度の各種膜貫通型プリオン蛋白の異常化能の検討

結果を踏まえて、神経変性機序解明と治療薬開発の迅速化に欠かせない疾患早発動物の候補として、プリオン蛋白とインフルエンザウイルスHA蛋白との融合蛋白を発現する遺伝子改変マウスを作出に成功した。

D. 考察

ペントサンポリサルフェート脳室内持続投与療法に関しては、投与量の上限をどうするのか、片側脳室への注入で十分なのかなど、解決すべき課題がある。症例を蓄積して、効果の程度や合併症の頻度・予後等を十分に検討する必要がある。英国の治療研究者との情報交換も、安全で最大効果を生む同治療法の確立のためには極めて有用であり、引き続き彼らとの議論を重ねる。また、本年度は脳室内に投与したペントサンポリサルフェートの動態を解析するための定量法が開発できたので、今後は各症例のデータを蓄積し合併症や効果と髄液濃度の関係を明らかにする必要がある。ペントサンポリサルフェート脳室内投与療法に関する啓発は着実に進展しているものの、この臨床試験を実施できるのはまだ九州の1施設のみである。治療ネットワークを整備する上で、特に地理的バランスから言っても東日本に臨床試験を実施できる拠点施設が必要である。また、適応症例を増やすためにもこれまで以上に早期診断の推進や啓発に努める必要がある。

ペントサンポリサルフェート脳室内持続投与療法にとって代わるべき次世代の治療薬としては、治療効果だけでなく予防的効果を発揮する末梢投与薬剤が望まれる。今年度新たに発見した経口投与剤は、

治療予防薬としてヒトに応用するまでにはまだまだ長い道のりであるものの、経口投与で明らかな生命予後改善効果を示す世界で唯一のものであり、化合物の安定性や安全性に関わる物性を改良する必要があるものの、今後の発展が期待できる。また、昨年度報告した末梢投与で有効な薬効成分は、今年度の体内動態研究からこの成分の複数回投与に加重投与効果がないことや発症前投与に予防効果があることを説明できた。この成分に関しては治療予防薬としての最適化と安全性確認が今後の課題である。さらに、今年度発見したプリオン高次構造緩解効果を持つ化合物は、持続感染細胞を用いた研究では、検討したいずれのプリオン株に対しても有効であったことより、疾患動物での有効性が期待される。さらに、その有効成分の同定と分子レベルでの作用機構が判明すれば、懸案となっているプリオンの複製メカニズム（正常型プリオン蛋白から異常型プリオン蛋白への変換機構）解明にも直結する可能性がある。また、新たな治療薬開発の標的候補として同定した宿主因子は、プリオンの産生や病原性の発現に関与している可能性があるが、プリオン株の種類によってその関与が異なることも経験しており、各因子をさらに詳細に検討していく必要がある。

一方、画期的治療に関する基盤的研究では、プリオン感染干渉現象が免疫系を介さないことが明らかとなり、さらにその詳細な分子メカニズムがわかれば新規な治療法開発に結びつく可能性がある。また、神経再生治療として骨髄間質細胞を用いた研究では、この細胞には容易にプリオンが

感染することが判明し、そのままでは実用には応用できないことが判明した。しかし、診断への応用や骨髄の安全性を考える上ではきわめて重要な発見である。

さらに、膜遊離型プリオン蛋白は異常化しても神経変成作用（病原性）に乏しいことより、膜貫通型プリオン蛋白が異常化した際には神経変性が增強され、感染の早期より発症する可能性がある。今年度プリオン蛋白とインフルエンザウイルス HA 蛋白との融合蛋白を発現する遺伝子改変マウスの作出に成功したが、このマウスは治療薬開発の迅速化に欠かせない疾患早発動物である可能性があり、今後の感染実験の結果が期待される。

E. 結論

プリオン病治療法としてペントサンポリサルフェート脳室内投与療法の臨床研究を継続して実施し、その効果と安全性について検討した。また、ペントサンポリサルフェートの最適濃度を求めるのに必要な髄液中の濃度測定法を開発した。一方、次世代型治療薬開発においては、末梢からの投与で治療予防効果を発揮するものの開発では、経口投与化合物を新たに発見するとともに、皮下投与化合物については作用機序解明の手掛りを得た。また、新たな治療薬の標的候補である複数の宿主因子を同定した。画期的治療法開発に関する基盤研究では、免疫系が関与しないプリオン感染干渉現象の存在を細胞レベルで証明した。また、神経再生療法の候補細胞と考えた骨髄間質細胞はプリオンに易感染することを発見した。さらに、治療薬開発の迅速化に欠かせない疾患早発動物の候補

として、プリオン蛋白とインフルエンザウイルス HA 蛋白との融合蛋白を発現する遺伝子改変マウスの作出に成功した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Kawatake S, Nishimura Y, Sakaguchi S, Iwaki T, Doh-ura K: Surface plasmon resonance analysis for the screening of anti-prion compounds. *Biol Pharm Bull.* (in press), 2006
- 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: *Prions—Food and Drug Safety.* (ed. Kitamoto T) Springer pp.41-66, 2005
- Todd NV, Morrow J, Doh-ura K, Dealler S, O’ Hare S, Farling P, Duddy M, Rainov NG: Cerebroventricular infusion of pentosan polysulphate in human variant Creutzfeldt-Jakob disease. *J Infect Dis.* 50(5):394-396, 2005
- Tsuboi Y, Baba Y, Doh-ura K, Imamura A, Fujioka S, Yamada T: Diffusion-weighted MRI in familial Creutzfeldt-Jacob disease with the codon 200 mutation in the prion protein gene. *J Neurol Sci.* 232:45-49, 2005
- Sasaki K, Doh-Ura K, Wakisaka Y, Tomoda H, Iwaki T: Fatal familial insomnia with an unusual prion protein deposition pattern: an autopsy report with an experimental transmission study. *Neuropathol Appl Neurobiol.* Feb;31(1):80-87, 2005
- 石川謙介、堂浦克美: プリオンイメージングの試み。 *臨床神経科学* 24(3):313-316, 2006
- 逆瀬川裕二、堂浦克美: プリオン病の治療法の現状。 *医学のあゆみ* 215(11):901-905, 2005
- 坪井義夫、山田達夫、堂浦克美: プリオン病の治療—ペントサンポリサルフェート脳室内持続投与—。 *神経内科* 63(5):441-445, 2005
- 坪井義夫、山田達夫、堂浦克美: 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。 *Brain Medical.* 17(3):259-264, 2005
- Nakano S, Yamashita F, Matsuda H, Kodama C, Yamada T: Relationship between Delusions and Regional Cerebral Blood Flow in Alzheimer’s Disease. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 21:16-21, 2006
- Hasegawa T, Ukai W, Jo DG, Xu X, Mattson MP, Nakagawa M, Araki W, Saito T, Yamada T: Homocysteic acid induces intraneuronal accumulation of neurotoxic Abeta42: implications for the pathogenesis of Alzheimer’s disease. *J Neurosci Res.* 80:869-876, 2005
- Hirata K, Yamaguchi H, Takamura Y, Takagi A, Fukushima T, Iwakami N, Saitoh A, Nakagawa M, Yamada T: A novel neurotrophic agent, T-817MA [1-{3-[2-(1-benzothiophen-5-yl)]

- ethoxy] propyl}-3-azetidino] maleate], attenuates amyloid-beta-induced neurotoxicity and promotes neurite outgrowth in rat cultured central nervous system neurons. *J Pharmacol Exp Ther.* 314:252-259, 2005
- Matsunaga Y, Yamada T: Hydrolytic Activity of Amyloid-beta and its Inhibition with Short Peptides. *Curr Med Chem.* 5:165-170, 2005
- Sato K, Hata M, Shimizu T, Yokota H, Akatsu H, Yamamoto T, Kosaka K, Yamada T: Lib, transcriptionally induced in senile plaque-associated astrocytes, promotes glial transmigration through extracellular matrix. *B.B.R.C.* 335: 631-636, 2005
- 坪井義夫、山田達夫: CJD 治療の試み - Pentosan Polysulphate (PPS)-。 *Clinical Neuroscience* 24:336-339, 2006
- 坪井義夫、田中美紀、山田達夫: CJD 治療の試み - Quinacrine-。 *Clinical Neuroscience* 24:333-335, 2006
- 吉田香織、中荘ひとみ、遠嶋由紀、小林誠子、糸永嘉子、吉田ユリ子、杉村美佳、中野正剛、山田達夫: 安心院地区の独居老人における認知障害調査結果 (第一報)。 *地域保健* 36:80-85, 2005
- 田中美紀、坪井義夫、山田達夫: プリオン病の治療 - キナクリン・キニーネ治療 -。 *神経内科* 63:446-451, 2005
- Yamauchi A, Shuto H, Dohgu S, Nakano Y, Egawa T, Kataoka Y: Cyclosporin A aggravates electroshock-induced convulsions in mice with a transient middle cerebral artery occlusion. *Cell Mol Neurobiol.* 25:923-928, 2005
- Nishida N, Katamine S, Manuelidis L: Reciprocal Interference Between Specific CJD and Scrapie Agents in Neural Cell Cultures. *Science* 310:493-496, 2005
- Arima K, Nishida N, Sakaguchi S, Shigematsu K, Atarashi R, Yamaguchi N, Yoshikawa D, Yoon J, Watanabe K, Kobayashi N, Mouillet-Richard S, Lehmann S, Katamine S: Biological and biochemical characteristics of prion strains conserved in persistently infected cell cultures. *J Virol.* 79:7104-7112, 2005
- Miyamoto K, Nakamura N, Aosasa M, Nishida N, Yokoyama T, Horiuchi H, Furusawa S, Matsuda H: Inhibition of prion propagation in scrapie-infected mouse neuroblastoma cell lines using mouse monoclonal antibodies against prion protein. *Biochem Biophys Res Commun.* Sep 16;335(1):197-204, 2005
- 西田教行: プリオン株をめぐる謎。 *Antibiotics & Chemotherapy* 22(1):71-78, 2006

2. 学会発表

- 堂浦克美: プリオン病治療法の開発。第7回生命化学研究会シンポジウム、仙台、2005年1月21日
- 逆瀬川裕二、渡辺光太、八谷如美、堂浦克美、金子清俊: リコンビナントプリオン蛋白質を用いた蛋白質 unfolding 因子の探索。2005年プリオン研究会、天童、2005

年 8 月 26、27 日
坪井義夫、堂浦克美、山田達夫：CJD の新しい治療法の試み - ペントサンポリサルフェート脳室内持続投与。2005 年プリオン研究会、天童、2005 年 8 月 26、27 日
照屋健太、堂浦克美：GPI アンカー型プリオン蛋白質アナログの調製。2005 年プリオン研究会、天童、2005 年 8 月 26、27 日
Ishikawa K, Kudo Y, Nishida N, Suemoto T, Sawada T, Iwaki T, Doh-ura K: Amyloid imaging probes for detection of prion plaques and treatment of prion diseases. 2005 Japan-America Frontiers of Engineering Symposium, Hitachi Global Storage Technologies, San Jose, CA, November 3-5, 2005
逆瀬川裕二、渡邊光太、八谷如美、堂浦克美、金子清俊：The ATP-bound form of Hsp90 can unfold recombinant prion protein. 日本分子生物学会第 28 回年会、大阪、2005 年 12 月 7 日-10 日
坪井義夫、堂浦克美、藤木富士夫、山内淳史、片岡泰文、山田達夫：Creutzfeldt-Jakob 病(CJD)に対する治療プロトコールの再考。プリオン病及び遅発性ウイルス感染に関する調査研究班 平成 16 年度班会議、全共連ビル、東京、2005 年 1 月 24 日
坪井義夫：プリオン病治療の現状と展望。プリオン病及び遅発性ウイルス感染に関する調査研究班 サーベイランス委員会・Creutzfeldt-Jakob 病(CJD)サーベイランスに関する全国担当者会議、国際会議場、東京、2005 年 2 月 10 日
坪井義夫、堂浦克美、山田達夫：プリオン病

の新しい治療法 ペントサンポリサルフェート脳室内持続投与。第 10 回日本神経感染症学会、東京、2005 年 10 月
Hagihara M, Shuto H, Takata F, Shirabe S, Nakagawa S, Deli MA, Niwa M, Kataoka Y: Evaluation of pentosan polysulfate for the permeability of blood-brain barrier. The 79th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society, Yokohama, Japan, March 8-10, 2006
Hirakawa C, Takata F, Shuto H, Nakagawa S, Deli MA, Niwa M, Kataoka Y: Regulation of blood brain barrier function with 17 β -estradiol. The 79th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society, Yokohama, Japan, March 8-10, 2006

H. 知的財産権の出願・登録状況

堂浦克美：プリオン病発症予防剤とそれを含む食品添加剤及び飼料添加剤。特願 2005-51999、2005 年 2 月 25 日
堂浦克美、岡周作、弘田量二、角田正也：哺乳動物組織材料の前処理方法。特願 2005-293011、2005 年 10 月 5 日
工藤幸司、荒井啓行、岡村信行、古本祥三、丸山将浩、堂浦克美：コンフォメーション病診断および治療用の長波長蛍光物質を含む組成物。特願 2005-347818、2005 年 12 月 1 日
工藤幸司、荒井啓行、岡村信行、古本祥三、丸山将浩、堂浦克美：コンフォメーション病の診断用プローブ。特願 2005-371821、2005 年 12 月 26 日

分 担 研 究 報 告

プリオン病の画期的治療法に関する研究

分担研究者：山田達夫 福岡大学医学部内科学第五教室・教授

研究協力者：坪井義夫 福岡大学医学部内科学第五教室・助教授

研究要旨

クロイツフェルト・ヤコブ病（CJD）に代表されるプリオン病は治療法が確立されていない致死性の神経難病である。最近本邦ではプリオン病病原体で汚染されたヒト死体由来の乾燥硬膜の移植による威原性プリオン病が重大な社会問題になっている。また、欧州で若年者に流行しているウシ海綿状脳症（BSE）に関連した変異型 CJD（vCJD）の発生が本邦でも危惧されている。このような状況下で、プリオン病の治療法の確立が緊急に求められている。ペントサンポリサルフェート（PPS）はマウスを用いた感染実験において、脳室内投与による著明な発症遅延効果が確認されている。また、英国の vCJD 患者 1 名において PPS 脳室内投与療法が実施され、重篤な副作用は観察されず、症状改善が観察されている。プリオン病の標的臓器は中枢神経系であり薬剤の脳内移行性が重要な問題になるが、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。本研究では、体内埋め込み型微量注入器具を用いた PPS 脳室内投与療法を本邦のプリオン病患者に応用して患者の生命予後改善への効果を明らかにすることを目的とする。

A. 研究目的

プリオン病は致死性の海綿状脳症であり、異常型プリオン蛋白（PrPsc）の脳内蓄積が共通の病理学的特長である。基礎研究において、PrPsc 形成を抑制する作用を有する薬物が知られており、治療への応用が期待される。ヘパリン類似の活性を持つ PPS は動物感染実験において、発症遅延効果が認められている。PPS は血液脳関門を通過しないために直接脳室内に投与する必要がある。新しい治療戦略として、腹部皮下体内埋め込み型微量注入器具の留置及び脳室内カテーテルの留置手術による PPS 脳室内持続投与が注目されている。英国で 2003 年に変異型 CJD の患者に行われた。本邦でのプリオン病に対する PPS 脳室内持続投与法の効果と安全性の検討を行うことを本研究の目的とする。

B. 研究方法

2004 年 11 月より現在まで福岡大学病院で PPS 脳室内持続投与法を行った 6 例を検討した（孤発性 CJD 5 例、家族性 CJD 1 例、平均年齢 68 歳、すべて女性）。方法は原則として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 例は右乳癌の手術後瘢痕があり左側にて行った。術後 1 週間の CT にて出血等の合併症がないことを確認後、低濃度から投与を開始し、漸増、維持量は 120 μ g/kg/day とした。

（倫理面への配慮）

患者に対する臨床研究は、福岡大学医学部倫理審査委員会の承認を得て行われ、患者・家族にインフォームドコンセントを行い同意を得

た。

C. 研究結果

現在までに臨床症状の明らかな改善は認めておらず、孤発性CJDのうちMM1型と思われる進行の早い3症例は悪化が続いている。臨床、画像よりMM2型の疑われる症例と、家族性CJD (V180I) は治療後症状の安定化が認められている。1例に部分てんかん認め、4例に硬膜下水腫を認めた。血算、凝固、生化学などの全身性の副作用は認めていない。

D. 考察

我々の作成したPPS脳室内持続投与法のプロトコールはこれまでのところ患者への負担、副作用などの点では、今後も継続が可能と考えられた。しかし硬膜下水腫の発生やPPS至適濃度の検討はいまだ今後の検討課題である。治療効果の評価は現時点では困難で、今後の症例の蓄積および臨床経過の長期観察において、対象となる自然経過症例との比較において評価すべきと思われた。欧州における同治療の報告は当院で行われているプロトコールと原則的には共通しており、今後の経験交流を含めてこれらの問題に対処する。

E. 結論

PPS脳室内持続投与法は血小板減少や凝固系の異常などがみられず全身への影響はきわめて少ない。慢性硬膜下水腫の問題は今度もその予防、治療の検討を行う必要がある。現在PPSの濃度は120 μ g/kg/dayで設定しているが至適濃度は今後の課題である。

G. 研究発表

1. 論文発表

Nakano S, Yamashita F, Matsuda H, Kodama C, Yamada T: Relationship between Delusions and Regional Cerebral Blood Flow in Alzheimer's Disease. *Dement Geriatr Cogn*

Disord. 21:16-21, 2006

Hasegawa T, Ukai W, Jo DG, Xu X, Mattson MP, Nakagawa M, Araki W, Saito T, Yamada T: Homocysteic acid induces intraneuronal accumulation of neurotoxic A β 42: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Neurosci Res.* 80: 869-876, 2005

Hirata K, Yamaguchi H, Takamura Y, Takagi A, Fukushima T, Iwakami N, Saitoh A, Nakagawa M, Yamada T: A novel neurotrophic agent, T-817MA [1-{3-[2-(1-benzothiophen-5-yl)ethoxy] propyl}-3-azetidino] maleate], attenuates amyloid-beta-induced neurotoxicity and promotes neurite outgrowth in rat cultured central nervous system neurons. *J Pharmacol Exp Ther.* 314:252-259, 2005

Tsuboi Y, Baba Y, Doh-ura K, Imamura A, Fujioka S, Yamada T: Diffusion-weighted MRI in familial Creutzfeldt-Jakob disease with the codon 200 mutation in the prion protein gene. *J Neurol Sci.* 232:45-49, 2005

Matsunaga Y, Yamada T. Hydrolytic Activity of Amyloid-beta and its Inhibition with Short Peptides. *Curr. Med. Chem* 5: 165-170, 2005

Satoh K, Hata M, Shimizu T, Yokota H, Akatsu H, Yamamoto T, Kosaka K, Yamada T: Lib, transcriptionally induced in senile plaque-associated astrocytes, promotes glial transmigration through extracellular matrix. *B.B.R.C.* 335: 631-636, 2005

坪井義夫, 山田達夫: CJD治療の試み - Pentosan Polysulphate (PPS)-。 *Clinical Neuroscience* 24:336-339, 2006

坪井義夫, 田中美紀, 山田達夫: CJD治療の試み - Quinacrine-。 *Clinical Neuroscience*

24:333-335, 2006

吉田香織、中荘ひとみ、遠嶋由紀、小林誠子、糸永嘉子、吉田ユリ子、杉村美佳、中野正剛、山田達夫:安心院地区の独居老人における認知障害調査結果(第一報)。地域保健 36:80-85, 2005

坪井義夫、堂浦克美、山田達夫:プリオン病の治療ー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方法の現状ー。特集:治療の最前線:神経疾患の先端的治療。Brain Medical 17:59-64, 2005

坪井義夫、堂浦克美、山田達夫:プリオン病の治療ーペントサンポリサルフェート脳室内持続投与ー。神経内科 63:441-445, 2005

田中美紀、坪井義夫、山田達夫:プリオン病の治療ーキナクリン・キニーネ治療ー。神経内科 63:446-451, 2005

2. 学会発表

坪井義夫、堂浦克美、藤木富士夫、山内淳史、片岡泰文、山田達夫:Creutzfeldt-Jakob病(CJD)に対する治療プロトコールの再考。プ

リオン病及び遅発性ウイルス感染に関する調査研究班。平成16年度班会議、全共連ビル、東京、2005年1月24日

坪井義夫:プリオン病治療の現状と展望。プリオン病及び遅発性ウイルス感染に関する調査研究班サーベイランス委員会・Creutzfeldt-Jakob病(CJD)サーベイランスに関する全国担当者会議、国際会議場、東京、2005年2月10日

坪井義夫、堂浦克美、山田達夫:CJDの新しい治療法の試みーペントサンポリサルフェート脳室内持続投与。2005年プリオン研究会、天童、2005年8月26-27日

坪井義夫、堂浦克美、山田達夫:プリオン病の新しい治療法ーペントサンポリサルフェート脳室内持続投与。第10回日本神経感染症学会、東京、2005年10月

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

プリオン病の画期的治療に関する臨床研究

分担研究者：福島武雄 福岡大学医学部脳神経外科・教授

研究協力者：大城真也 福岡大学医学部脳神経外科・講師

研究協力者：野中将，小松文成 同上 ・助手

研究要旨

プリオン病が疑われる患者、5症例に対して、全身麻酔下に脳室カテーテルと腹部埋め込み型持続注入ポンプの留置術を行った。周術期においては外科処置に関わる全てのスタッフに対して適切な教育を行い、十分な手術シュミレーションを施行した。その結果、周術期において問題となる事象は出現せず、周術期合併症も認めなかった。

A. 研究目的

臨床的にプリオン病が強く疑われた症例において、ペントサンポリサルフェート(PPS)の脳室内投与に必要な脳室カテーテルと腹部埋め込み型持続注入ポンプ(Archimedes infusion pump)の留置術を施行し、外科的処置に伴う周術期の問題点について検討した。

B. 研究方法

【対象・方法】

クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)診療マニュアル[改訂版]をもとに、プリオン病が強く疑われた症例の中で、治療研究への参加の同意が得られた5症例を今回の外科的処置の対象とした。

【WHO伝達性海綿状脳症感染予防ガイドライン(1999年)】

手術行為

CJD患者の手術予定は、各施設の感染対策委員会に報告され、手術行為だけではなく、器具の取り扱い、保管、洗浄、および消毒または廃棄の計画が立てられねばならない。そのための書式化されたプロトコールは必須であり、手術

行為とその後の処理または廃棄に関わる全ての従事者は必要な規定事項を知り、適切な訓練を受ける必要がある。

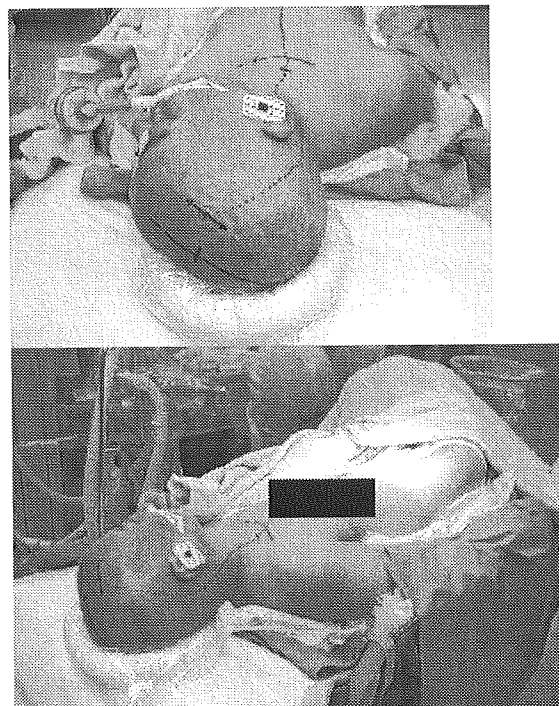
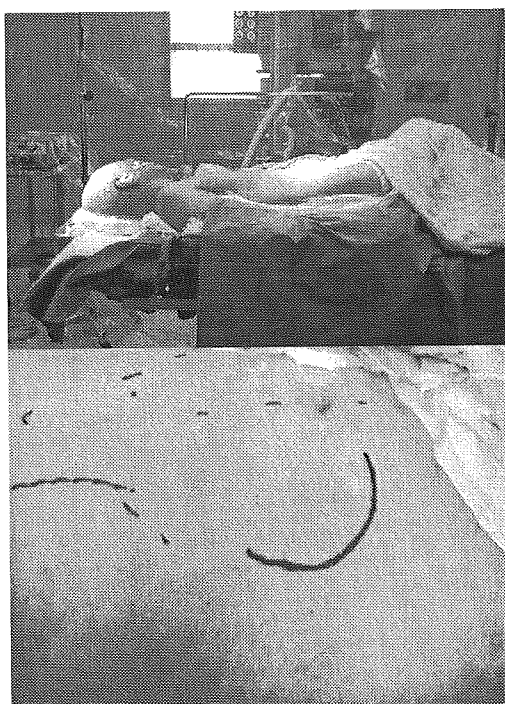
【手術時の要点・手順】

- 1) 手術に先立って実際の実務に直接携わるスタッフ全てに適切な教育を行い、手術器具の取り扱い／保管／洗浄／消毒または廃棄の具体的な計画を立てて、手術シュミレーションを十分に行った。
- 2) 具体的には側脳室前角穿刺によるV-Pシャント術に準じた方法で、脳室カテーテルと腹部埋め込み型持続注入ポンプの留置術を施行した。
- 3) 術野はイソジンで消毒した後に、ドレープを使用し術野全体を覆った。次にディスポの敷布で術野を覆い、さらにイソジンドレープでカバーして手術を開始した。
- 4) 脳室穿刺の際には脳生検も合わせて行い、髄液の排出は極力さけた。
- 5) 術衣／手袋／マスク／ゴーグル／リネンとカバーなどは使い捨て製品を用いた。器具の受け渡しは一方向性の流れを厳守し、非使い捨て器具はすべて被覆した。

【Infusion Pump埋込み術の手順】

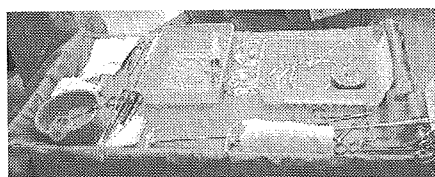
1. 体位と消毒、ドレーピング
2. 皮膚切開
3. Burr holeの設置
4. 皮下トンネルの作成：パッサーを使用し頭部から前胸部まで腹側カテーテルを通す
5. 硬膜切開、脳室穿刺
6. 脳室チューブの固定、チューブのたるみをとる
7. Infusion pump(Archimedes)の準備、生食を満たす
8. 腹部の皮膚切開、皮下組織の剥離、ポンプ固定のため、3カ所筋膜に絹糸をおく
9. Infusion pumpを埋め込む
11. ポンプ付属のカテーテルを前胸部まで通す
12. 閉創

手術体位と皮膚切開

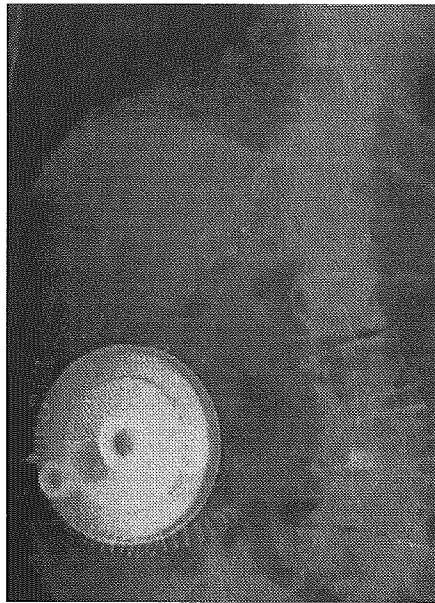


Archimedes infusion pump set

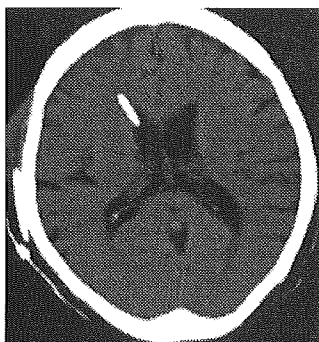
Archimedes infusion pump



代表例のCTスキャンおよび腹部レントゲン撮影を示す。



脳室カテーテル



CTスキャン



【汚染除去の手順・方法】

概論：異常プリオンは他の感染因子除去に用いられる物理学および化学的消毒方法に対して抵抗性である。その感染性は感染した組織の状態によって変化し、例えば乾燥やアルコール、ホルマリン、グルタルアルデヒド固定によっ

て、その感染性は強力に維持される。したがって汚染物は汚染除去処理がなされるまで乾燥させてはならず、固定液にさらしてもならない。

推奨される方法

- 1) 焼却：すべての使い捨て器具、用具および廃棄物に用いられる。高感受性の組織に暴露された器具に対しても焼却が望ましい。
- 2) 耐熱性の器具に対する高圧蒸気滅菌化学法：1 規定NaOHに浸し、121℃ 30分の高圧蒸気滅菌を行い、汚染除去して水ですすぎ、通常の消毒をする。
- 3) 床および非耐熱性器具に対する化学的方法：2 規定 NaOH または非希釈次亜塩素酸に一時間浸透させ拭き取り、水ですすぎ。

(倫理面への配慮)

患者に対する臨床研究は、福岡大学医学部倫理審査委員会の承認を得て行われ、患者・家族にインフォームドコンセントを行い同意を得た。

C. 研究結果

上記方法により5例に脳室カテーテルを挿入し、持続型 Archimedes infusion pump を右上腹部に埋め込んだ。全例女性で、手術操作に特に問題は生じなかった。現時点で合併症はなかった。

症例	年齢	性別	初発症状	手術日	合併症
1	66	女性	意識障害／痙縮／ミオクローヌス	2004.11.16	なし
2	72	女性	歩行困難／痴呆／振戦	2005.3.1	なし
3	69	女性	見当識障害	2005.6.2	なし
4	64	女性	見当識障害／失行／尿失禁	2005.6.21	なし
5	72	女性	呂律困難／協調運動障害	2005.11.14	なし

D. 考察

周術期においては外科処置に関わる全てのスタッフに対して適切な教育を行い、十分な手術シュミレーションを施行した後、プリオン病が疑われる患者に対して、全身麻酔下に脳室カテーテルと腹部埋め込み型持続注入ポンプの

留置術を行い、PPSの持続注入を施行した。その結果、周術期において問題となる事象は出現せず、周術期合併症も認めなかった。今後更に症例を増やし検討していく必要がある。

E. 結論

PPS 脳室内投与を行うための、脳室カテーテル挿入および持続型 infusion pump の植え込み

術を施行した。PPS の臨床的有用性については、今後の経過を見守る必要がある。

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

細胞培養液中及び生体試料中ペントサン硫酸濃度の測定法に関する研究

分担研究者：片岡泰文 福岡大学薬学部・教授

研究要旨

細胞培養液中及び生体試料中ペントサン硫酸（PPS）濃度の測定法に関する基礎的検討を行った。細胞培養液中 PPS 濃度に関しては、Blyscan Glycosaminoglycan Assay Kit (Biocolor, Ltd) を用いて検討した結果、検量線は 2.5~40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲で良好な直線性が認められ、同時再現性及び日差再現性の変動係数はともに 10% 未満であった。また、*in vitro* BBB モデルを作製し、PPS 原末及び低分子 PPS の BBB 透過性について本測定法を利用して評価した結果、低分子化によって PPS の BBB 透過性が向上することがわかった。本測定法は *in vitro* における PPS の動態評価に有用と考えられた。生体試料中（髄液中及び血漿中）PPS 濃度に関しては、前処理として除蛋白操作を加えた sGAG Alcian Blue Binding Assay Kit (Wieslab AB) を用いて検討した結果、検量線は 2.5~40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲で良好な直線性が認められ、同時再現性及び日差再現性の変動係数はともに 10% 未満であった。また、プリオン病を含む各種神経疾患を有する患者髄液中に既知濃度の PPS を添加した試料を作製し、添加濃度と本測定法での実測濃度の比較を行った結果、両者はほぼ同値を示した。本測定法はヒトでの髄液中 PPS の動態評価に応用可能であると考えられた。

A. 研究目的

ペントサン硫酸 (PPS) はグリコサミノグリカン (GAG) 類似の構造を有する硫酸化多糖で有力なプリオン病治療薬の一つである。PPS は分子量が大きく水溶性が高いことから、経口投与や静脈内投与では血液脳関門 (BBB) を通過しないため、十分な効果を発揮させるためには脳内に直接投与する必要がある。現在、福岡大病院でプリオン病患者に対する脳室内投与の臨床試験が実施されているが PPS 濃度の測定法が確立されていないため、科学的根拠に基づいた至適投与量の設定が困難である。また、脳移行性向上を目指した製剤設計に関する検討も同時に進行中である。PPS 濃度を正確に測定することは PPS の製剤評価や体内動態評価を行う上で必須であり、簡便かつ迅速で精度の高い測定法の開発が望まれる。

本研究では PPS と類似の構造を有する GAG の測定法として利用されている市販の Assay Kit

を、細胞培養液中及び生体試料中 PPS 濃度の測定法として適用できないかどうか、本測定法の測定感度、精度及び応用可能性に関する基礎的検討を行った。

B. 研究方法

1) 細胞培養液中 PPS 濃度の測定法

①測定感度・精度に関する検討：

細胞培養液中に既知濃度の PPS を添加した試料を作製し、Blyscan Sulfated Glycosaminoglycan Assay Kit を用いて PPS 濃度の測定を行い、検量線の直線性、同時再現性及び日差再現性について検討した。

②本測定法の有用性の確認：

マウス脳血管内皮細胞株 (MBEC4) を培養し、*in vitro* BBB モデルを作製した。インサートの上部に PPS 原末または低分子 PPS (LMW-PPS: ゲル濾過クロマトグラフィーを用いて分取した PPS フラクシオン A~E) を 1mg/mL 添加し、