

性初期の診断の助けとなることが報告されているが、より早い時期での診断のためのマーカーの検索や検出方法の開発が求められる。血液や尿中のPrP^{Sc}の高感度検出は感染初期あるいは発症初期の検出法となるかもしれない。従来、PrP^{Sc}が神経変性の原因と考えられていたが、いくつかの実験から、PrP^CあるいはPrP^CからPrP^{Sc}に変化する中間体が神経毒性の本体との仮説が浮上している。

この毒性本体の解析やメカニズムを明らかにすることで、新しい治療法へと結びつくかもしれない。

文献

- 1) Prusiner, S. B. : Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95** : 13363-13383, 1998.
- 2) Kitamoto, T. et al. : Follicular dendritic cell of the knock-in mouse provides a new bioassay for human prions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **294** : 280-286, 2002.
- 3) Bach, S. et al. : Isolation of drugs active against mammalian prions using yeast-based screening assay. *Nat. Biotech.*, **21** : 1075-1081, 2005.

- 4) Bertsch, U. et al. : Systematic identification of anti-prion drugs by high-throughput screening based on scanning for intensely fluorescent targets. *J. Virol.*, **79** : 7785-7791, 2005.
- 5) Bellon, A. : Improved conformation-dependent immunoassay : suitability for human prion detection with enhanced sensitivity. *J. General. Virol.*, **84** : 1921-1925, 2003.
- 6) Castilla, J. et al. : Detection of prions in blood. *Nat. Med.*, **11** : 982-985, 2005.
- 7) Rossi, G. et al. : Therapeutic approaches to prion diseases. *Clin. Lab. Med.*, **23** : 187-208, 2003.
- 8) 山田達夫・他 : クロイツフェルト・ヤコブ病患者に対するキナクリン治療-31症例における効果, 副作用の分析-厚生労働省科学研究費補助金難病性疾患克服研究事業プリオン病及び遅発性ウイルス感染に関する調査研究, 平成15年度分担研究報告書, pp.113-124.
- 9) Doh-ura, K. et al. : Treatment of transmissible spongiform encephalopathy by intraventricular drug infusion in animal models. *J. Virol.*, **78** : 4999-5006.
- 10) 山田達夫, 坪井義夫 : ペントサンポリサルフェート脳室内持続投与法の臨床試験に関する研究. 厚生労働省科学研究費補助金こころの健康科学研究事業, プリオン病の画期的治療法に関する臨床研究と基礎研究平成16年度分担研究報告書, pp.8-9.

* * *

特集) プリオン病 update

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—

● 坪井義夫** / 山田達夫** / 堂浦克美***

Key Words : prion disease, Creutzfeldt-Jakob disease, pentosanpolysulphate, cerebroventricular infusion

ペントサンポリサルフェート(PPS)
脳室内持続投与療法開始までの過程

1. ヒトプリオン病の歴史と現状

孤発性のCreutzfeldt-Jakob病(CJD)は1921年に初めて報告された疾患であるが、人類史上おそらくは古くから存在していた疾患であると考えられる。臨床症状は、まず発症年齢が40歳から80歳までで、年間発生率は100万人にひとりであるとされている。本邦では年間に100名前後の患者が発生する計算になるが、CJDサーベイランス委員会報告でもとくに矛盾しない報告がなされている。平均年齢は65.6歳である¹⁾。典型的な症状としては、進行性の痴呆とミオクローヌス、小脳性運動失調や視覚異常などの臨床症状のほか、脳波では周期性同期性放電が認められ、診断に有用とされている。また、脳脊髄液中の14-3-3蛋白、neuron-specific enolase(NSE)やタウ蛋白がCJDにおける神経細胞死の生物学的マーカーとして有用であることが報告されている²⁾⁻⁵⁾。また、プリオン蛋白遺伝子(PRNP)内コドン129のメチオニンとバリンの遺伝子多型は臨床表現型

に影響を与えることがわかっている⁶⁾。遺伝性プリオン病の発生は全体の約10%を占めている。遺伝性プリオン病は、いずれも常染色体優性遺伝でPRNP内に点変異あるいは挿入変異を有する。

ヒト硬膜の移植後に数年から十数年経った後に発症する医原性プリオン病も、発生は本邦で100例を超えた¹⁾。変異型CJDは1996年に報告され、ウシ海綿状脳症(BSE)との関連が確実視されている⁷⁾。孤発型CJDとの違いは、若年発症(平均29歳)で進行はやや遅い。脳病理も異なり海綿状病理の周囲にflorid plaquesが認められる。英国での発生がほとんどであるが、最近本邦でも1例目が報告された⁸⁾。このような新興のプリオン病は人類史上存在しなかった疾患である。この孤発性の疾患と人為的な感染性プリオン病を同一に語ることはできない可能性がある。しかし、これらプリオン病には共通性がみられる。

臨床的にどの型のCJDも発症年齢、初発症状の違いはあるものの進行性であり、ほぼ数カ月から長くても数年で無動無言となり死に至る。また、病的には異常型プリオン蛋白(PrP^{sc})の沈着がみられる。また、孤発性でも感染性プリオン病と同様に動物摂取において伝播、感染性を有する点にある。これが以前より伝播性海綿状脳症transmissible spongiform encephalopathies(TSE)といわれていた所以である。

* Treatment for prion disease. Cerebroventricular infusion of pentosanpolysulphate.

** Yoshio TSUBOI, M.D. & Tatsuo YAMADA, M.D.: 福岡大学医学部神経内科[〒814-0180 福岡県福岡市城南区七隈7-45-1]; Department of Neurology, Fukuoka University School of Medicine, Fukuoka 814-0180, Japan.

*** Katsumi DOH-URA, M.D., Ph.D.: 東北大学大学院医学系研究科プリオン蛋白研究部門; Division of Prion Protein Study, Tohoku University School of Medicine, Sendai, Miyagi, Japan.

2. PrP^{sc}とは

すべての動物において正常プリオン蛋白(PrP^c)は存在し、生理的作用は確定的ではないが、銅結合蛋白質としての機能や酸化ストレスに関与している可能性がある。PRNPがコードする蛋白質であり、転写後にゴルジ体で糖鎖修飾を受け、細胞膜に移動する。培養細胞では細胞膜上での半減期は3~6時間であり、その後分解されるとされている⁹⁾。PrP^cは253アミノ酸蛋白で、分子量は35-36kDaで、主に中枢神経系で、少量はリンパ球組織で発現する。

一方、PrP^{sc}はすべてのプリオン病の病理で認められ、人のみならず動物のプリオン病、たとえばスクレイピーにおいても脳にその蓄積が認められる。PrP^{sc}は感染性を有すると考えられている。事実、接種感染実験において、種を越えて伝播が可能であり、新たなプリオン病を生じる。PrP^{sc}による感染後に、PrP^cになんらかの構造変化が引き起こされ、 β シート構造に富むPrP^{sc}へと変化し、病的蓄積を生じる¹⁰⁾と考えられている。したがって、PrP^cが発現していない宿主にはプリオン病は感染しない。

脳におけるPrP^{sc}の病的蓄積が神経細胞死、反応性のグリオシス、マイクログリアの増加、そして、海綿状変化をひき起こす。これらの脳病理はプリオン病の診断に必須で、アミロイド斑が認められることもある。

3. PPSが治療薬として選ばれた理由

これまでに実験的に有効性の確立された薬剤が臨床的に応用された報告は数少ない(表1)。PPSは動物感染実験において、末梢から感染する前に投与すれば発症を遅らせる効果があること、また、神経芽腫細胞におけるPrP^{sc}の蓄積を阻害する¹²⁾¹³⁾ことなどがわかっていた。この効果はPPSがプリオン蛋白の線維形成を阻害するかあるいは細胞膜上のプリオン蛋白を減少させるためと推察されている¹⁴⁾¹⁵⁾。PPSは脳血液関門を通らないために脳室内に直接投与する必要があった。Doh-uraら¹⁶⁾は、脳内感染させたマウスに対して4週間の脳室内薬物投与を感染後10日目および35日目に開始した。使用薬物はPPSのほかキナクリン、アンホテリシンBなどであった。

発症遅延効果はアンホテリシンBにおいて、

表1 抗プリオン病効果の認められる化合物

| | |
|----------------------|-----------------------|
| ・ 抗細菌剤 | ・ ポリアニオン |
| Dapsone | Carrageenan |
| ・ 抗真菌剤 | Dextran sulfate |
| Amphotericin B | HPA-23 |
| ・ 抗寄生虫剤 | Pentosan polysulfate* |
| Quinacrine* | ・ その他 |
| Chloroquin | Chlorpromazine* |
| ・ 免疫賦活剤 | LTB-R-Ig |
| CpG | Tetrapyrroles |
| oligodeoxynucleotide | |

*臨床的に使用されたことがあるもの。

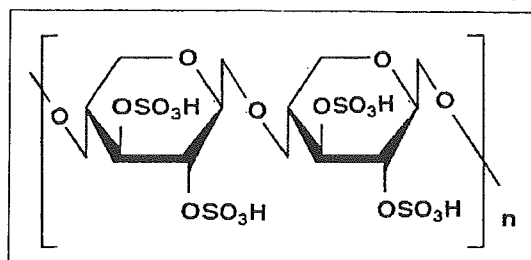


図1 Chemical structure of pentosan polysulfate (PPS)

感染後10日目の投与で30%、35日目の投与で12%であった。ところが、PPSはアンホテリシンBより際立った発症抑制効果を示した(10日目投与で173%、35日目投与で93%)。このときもっとも有効な投与量は230 μ g/kg/dayであった。投与開始が早いほど発症抑制効果は強力であった。脳の免疫組織学的検討やウエスタンブロットでも脳へのPrP^{sc}蓄積は著明に抑制されており、また、230 μ g/kg/dayの投与量では明らかな副作用は認めず、犬における実験でも230 μ g/kg/dayまでの投与量ではいかなる副作用も示さなかった。

PPSは硫酸化多糖(図1)で、これまでに海外で間質性膀胱炎や関節炎の治療に用いられてきた。静脈内に投与されたPPSの半減期は1mg、10mg、100mgでそれぞれ7分、21分、55分である。ヘパリンと同様に、投与後は網内系細胞に取り込まれ、飽和すると血中にとどまり、尿中に排泄される¹⁷⁾。細胞に取り込まれたPPSは脱硫酸化されて、されにゆっくりと数日かけて尿中に排泄される。経口で投与されても血中には低濃度しか検出されない(0.5~4%)¹⁸⁾。経口で投与され、しばらく後に膀胱における抗炎症作用が発現されるが、これは代謝物質が有する作用と考えら

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

PPS脳室内持続投与療法の実際

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

1. プロトコールの実際

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

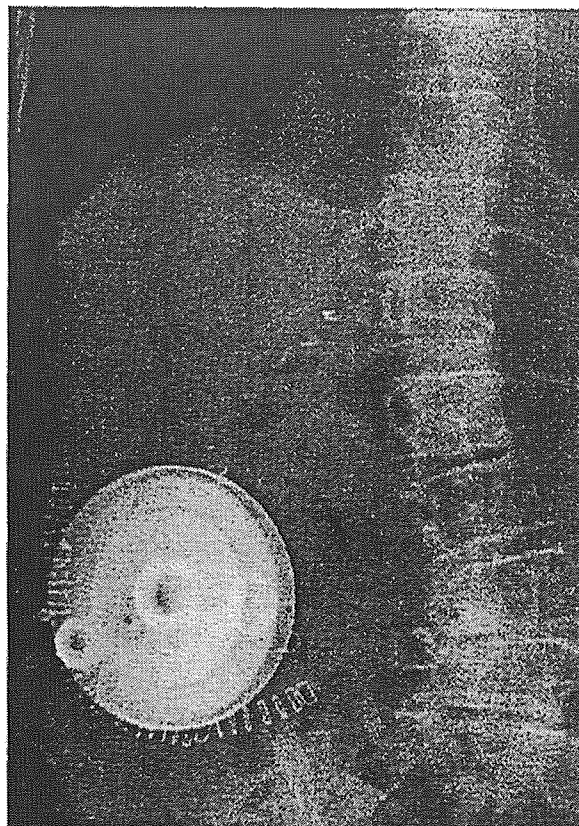


図2 Plain abdominal X-ray

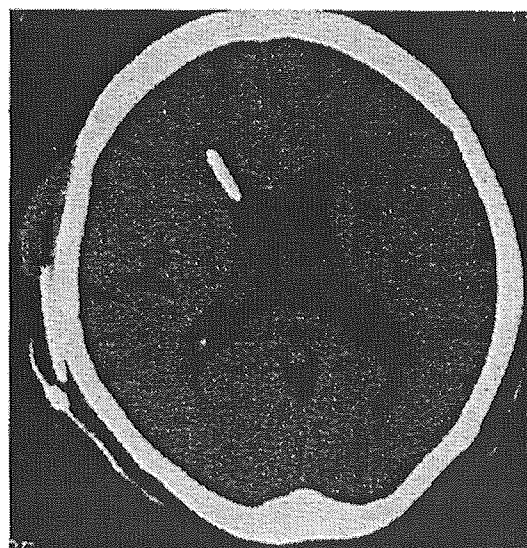


図3 Non-enhanced brain CT scan 7 days after intraventricular catheter placement

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

である110 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ となっている。これまでの経過からはPPS濃度をあげたことによる副作用の報告はない。おそらく脳内に拡散し、細胞内とり込みが飽和した状態で血中に移行することから、髄液中あるいは血中のPPS濃度を測定することはその判断に役立つはずである。現在、濃度測定系を検討している。現在、福岡大学では60 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ を維持量としている。その後、4週間ごとに腹部皮下の微量注入ポンプの薬液を新しい薬液に交換充填する。手術後の患者の状態は術前の状態への回復は速やかである。創部の安定とともに生活の制限は必要がない。本邦では1例目のPPSの脳室内持続投与は孤発性CJDの66歳女性例に行われた²¹⁾。2004年1月、歩行時のふらつきで発症。下旬には物忘れ、言葉の出にくさや問いかけへの反応が鈍くなった。3月には右上肢のミオクロームスが出現した。徐々にミオクロームスは全身に広がった。3月下旬には起立、歩行が不能となり、4月に近医へ入院し、孤発性CJDの診断を受けた。4月中旬、寝たきり、無動無言。8月25日に当院に転院した。入院時所見は無動無言で、四肢のミオクロームスを認めた。開眼はあるが、意味のある自発運動はなく、光、音、痛みに対して驚愕反応を認めた。11月16日、右の側脳室前角脳室カテーテル留置および右腹壁に微量持続注入ポンプを埋め込み、腹部カテーテルは皮下を通じて留置したポンプに接続した。1週間後のCTで出血などの合併症がないことを確認した後にPPSを低濃度(1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)よりはじめ、徐々に濃度を上げて60 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ とした。現在、同濃度で維持療法中である。治療開始11カ月が経過している。現在、明らかな臨床効果や脳波上の変化を示していない。一方で、血算、生化学、凝固検査、頭部CTで副作用は認められない。

2. 治療の適応症例について

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

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

おわりに

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

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

文 献

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

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

プリオン病の治療

—経口キナクリン療法とペントサン硫酸の脳室内持続投与法の現状—

坪井義夫 山田達夫

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

堂浦克美

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

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

はじめに

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

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

1 プリオン蛋白とは

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

Key words

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

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

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

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

2 プリオン病の現状

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

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

医原性プリオン病は、本邦で 100 例を超えて報告⁴⁾されており、ヒト硬膜の移植後に数年から数十年経った後に発症している。まれに角膜移植からの感染が疑われる報告もある。遺伝性プリオン病の発生は全体の約 10% を占めている。遺伝性プリオン病は、いずれも常染色体優性遺伝で PRNP 内に点変異あるいは挿入変異を有する。

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

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

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

治療法の探求 —キナクリンの報告とペントサン硫酸 脳室内投与の取り組み—

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

抗マラリア薬であるキナクリン、キニーネや抗精神病薬であるクロルプロ

表1 プリオン病治療研究に使われた化合物

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

*：実験的に何らかの有効性を報告されているもの。

(文献12より引用)

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

本邦でもプリオン病に対して、抗マ

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

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

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

表2 孤発性CJDにおけるキナクリン治療効果

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

ns：有意差なし。

表3 キナクリン治療の効果とその内容

| 性/年齢 | 診断 | 投与後の認知機能その他の変化 | 効果の持続 期間(週) |
|------|-----------------------|--|----------------|
| F/67 | 医原性CJD | 閉眼時間の延長、発語の増加。 | 4 |
| M/76 | 孤発性CJD | 自発閉眼時間の延長、Eye to Eye コンタクトが可能。 | 1 |
| M/63 | 孤発性CJD | 投与2週後に痛み刺激に検査への視覚注視が出現。 | 1 |
| F/37 | 医原性CJD | 感情失禁、外部からの刺激に笑ったり泣いたり表情の表出、 光・音・呼びかけに追視あり、自発運動の出現、 PSDの消失、背景脳波の出現。 | 4 |
| F/72 | 孤発性CJD | 痛覚刺激にて上肢の動きが出現。 | 4 |
| F/64 | 孤発性CJD | 投与1週後で覚醒状態の改善がみられた。 | 1 |
| F/62 | 孤発性CJD | 投与1～2週後で発語が少しみられ、意志疎通性が上昇した。 自動運動の増加。 | 1 |
| F/59 | 遺伝性GSS ¹⁰² | 投与10日～3週後に意味のある発語が増加した。 投与10日後で坐位保持可となったがすぐに不可となった。 | 2 |
| M/46 | 孤発性CJD | 投与4～5日後には反射性ミオクローヌス減少 「うー」と唸り声が聞かれるようになり以後持続。 投与2～5週後に音の方向を注視する反応あり。 | 3 |
| F/68 | 孤発性CJD | 指示動作や挨拶が可能。 | 12 |
| F/59 | 孤発性CJD | 追視、笑顔がみられた。四肢の自発運動は増加した。 不随意運動も粗大な運動に変わったが、その後、もとのミオ クローヌスに戻った。 | 4 |
| F/59 | 孤発性CJD | 投与1週後に呼びかけに反応、ミオクローヌスの減弱。 家族の話しかけに笑顔。このような変化は2週間後にはもと に戻る。 | 2 |

12例では、1例(8%)にしか確かな変化は認められなかった。一方、医原性CJD症例では5例中2例(40%)に覚醒度の改善を認めた。遺伝性プリオン病症例では4例のうち長期経過の1例(GSS¹⁰²)において効果を認めたが、他の3例(いずれもCJD²⁰⁰)では無効であった。

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

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

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

テリシンBなどであった。

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

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

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

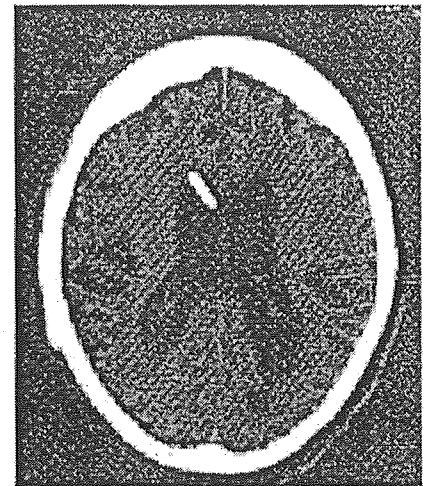


図1 脳室内カテーテルの留置後のCT

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

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

おわりに

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

●文献

- 1) Prusiner SB: Annu Rev Microbiol 48: 655-686, 1994
- 2) Harris DA: Adv Protein Chem 57: 203-228, 2001
- 3) Brandner S, Isenmann S, Raeber A et al: Nature 379: 339-343, 1996
- 4) 中村好一, 渡邊 至, 佐藤 猛ほか: クロイツフェルトヤコブ病サーベイランス結果. 厚生労働科学研究費補助金 難病性疾患克服研究事業 プリオン病及び遅発性ウイルス感染に関する調査研究 平成15年度分担保報告書 pp 33-39
- 5) Hsich G, Kenney K, Gibbs CJ et al: N Engl J Med 335: 924-930, 1996
- 6) Beaudry P, Cohen P, Brandel JP et al: Dement Geriatr Cogn Disord 10: 40-46, 1999
- 7) Kropp S, Zerr I, Schulz-Schaeffer WJ et al: Neurosci Lett 261: 124-126, 1999
- 8) Brandel JP, Beaudry P, Delasnerie-Laupretre N, Laplanche JL: Rev Neurol 155: 148-151, 1999
- 9) Tranchant C, Geranton L, Guiraud-Chaumeil C et al: Neurology 52: 1244-1249, 1999
- 10) Will RG, Ironside JW, Zeidler M et al: Lancet 347: 921-925, 1996
- 11) 山田正仁ほか: CJD サーベイランスにおける問題例: わが国における変異型CJD疑い例および孤発性CJD診断困難例の検討. 厚生労働科学研究費補助金 難病性疾患克服研究事業 プリオン病及び遅発性ウイルス感染に関する調査研究 平成15年度班会議抄録集 pp 10
- 12) Brown P: Neurology 58: 1720-1725, 2002
- 13) Love R: Lancet 358: 563, 2001
- 14) Doh-Ura K, Iwaki T, Caughey B: J Virol 74: 4894-4897, 2000
- 15) Korth C, May BC, Cohen FE, Prusiner SB: Proc Natl Acad Sci USA 98: 9836-9841, 2001
- 16) 山田達夫, 坪井義夫, 中島雅士ほか: クロイツフェルトヤコブ病患者における抗マラリア薬、キナクリン、キニーネ治療の効果と副作用に関する研究. 厚生科学研究費補助金 ころの健康科学研究事業 即戦力的クロイツフェルト・ヤコブ病治療の確立に関する研究. 平成15年度分担保報告書 pp 11-22
- 17) 山田達夫, 坪井義夫, 中島雅士ほか: クロイツフェルトヤコブ病患者に対するキナクリン治療-31症例における効果、副作用の分析-厚生労働科学研究費補助金 難病性疾患克服研究事業 プリオン病及び遅発性ウイルス感染に関する調査研究 平成15年度分担保報告書 pp 113-124
- 18) Caughey B: Biochem Neurodegen Disord 22: 163-167, 1994
- 19) Caughey B, Raymond G: J Virol 67: 643-650, 1993
- 20) Perez M, Wandosell F, Colaco C, Avila J: Biochem J 335: 369-374, 1998
- 21) Shyng SL, Lehmann S, Moulder K, Harris D: J Biol Chem 270: 30221-30229, 1995
- 22) Doh-ura K, Ishikawa K, Murakami-Kubo I et al: J Virol 78: 4999-5006, 2004
- 23) Todd NV, Morrow J, Doh-ura K et al: J Infec Dis 50: 394-396, 2005
- 24) 山田達夫, 坪井義夫: ペントサンポリサルフェート脳室内持続投与法の臨床試験に関する研究. 厚生科学研究費補助金 ころの健康科学研究事業 プリオン病の画期的治療法に関する臨床研究と基礎研究 平成16年度分担保報告書 pp 8-9

Relationship between Delusions and Regional Cerebral Blood Flow in Alzheimer's Disease

Seigo Nakano^{a,b} Fumio Yamashita^b Hiroshi Matsuda^{b,c} Chiine Kodama^b
Tatsuo Yamada^a

^aDepartment of Internal Medicine, Fukuoka University, Fukuoka, ^bNational Center of Neurology and Psychiatry (NCNP), Musashi Hospital, Tokyo, and ^cDepartment of Nuclear Medicine, Saitama Medical School Hospital, Saitama, Japan

Key Words

Alzheimer's disease · Delusions ·
Regional cerebral blood flow · SPECT · PET

Abstract

To investigate the association between delusions and cerebral functional deficits in Alzheimer's disease (AD), we evaluated probable AD patients with and without delusions. **Methods:** Functional brain imaging was performed by single photon emission computed tomography with technetium-99m-labeled ethyl cysteinate dimer (^{99m}Tc-ECD) in 64 AD patients and 76 age-matched normal healthy volunteers. SPECT data were analyzed by statistical parametric mapping. **Results:** In AD patients, no differences were found in age and cognitive activities between those with (n = 25) and without (n = 39) delusions. Compared with normal healthy volunteers, AD patients had significantly decreased perfusion in the posterior cingulate gyri, precuneus, and parietal association cortex. Moreover, in the patients with delusions, perfusion was significantly decreased in the frontal lobe with right side dominance. In the comparison between the patients with and without delusions, the patients with delusions had significantly decreased perfusion in the prefrontal cortex, anterior cingulate gyri, inferior to middle temporal cortices, and parietal cortex of the right

hemisphere (p < 0.01). **Conclusion:** The functional deficits in the right hemisphere may be the cause of delusions in AD.

Copyright © 2006 S. Karger AG, Basel

Introduction

Neuropsychiatric symptoms such as delusional thoughts are commonly observed in patients with Alzheimer's disease (AD), and caring for such patients is often difficult [1–3]. Moreover, such symptoms often necessitate institutionalization [4, 5]. Appropriate management of behavioral symptoms lessens the burden on caregivers and may help to postpone institutionalization [6]. Therefore, evaluation of psychosis and behavioral symptoms in AD is of considerable importance in practice. Recently, functional neuroimaging techniques such as positron emission tomography (PET) and single photon emission computed tomography (SPECT) have been used to explore regional abnormalities of brain function associated with delusions in AD. Several studies have revealed associations between delusional thoughts in AD and brain function of various regions [7–12]. The variability may be due to a relatively small number of subjects and/or use of a conventional region-of-interest (ROI) approach. Differences in populations and severity of disorder

der among the studies may also have accounted for the variable findings.

In this study, we applied a statistical parametric mapping technique to SPECT in order to investigate more closely the association between delusions and cerebral deficits in patients with probable AD in a relatively large number of subjects.

Materials and Methods

Subjects

Sixty-four probable AD patients who had been attending the outpatient memory disorder clinic at the National Center Hospital for Mental, Nervous and Muscular Disorders, National Center of Neurology and Psychiatry (NCNP), Tokyo, Japan, were recruited in this study. The diagnosis of probable AD was based on the clinical criteria of the National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA) [13] after detailed examinations, including magnetic resonance imaging (MRI), computed tomography, and ^{99m}Tc -labeled ethyl cysteinate dimer (^{99m}Tc -ECD) SPECT. All patients underwent Mini Mental State Examination (MMSE) [14] to assess the severity of dementia.

The presence of delusions was assessed by means of a structured caregiver interview using the delusion subscale of the Neuropsychiatric Inventory (NPI) [15]. A patient was considered to have delusions if he or she had had delusions at least once within the previous 4 weeks. Patients with prominent visual hallucinations, prominent parkinsonism, or a fluctuating level of consciousness in addition to a history of falls were excluded. Patients with transient delusions due to delirium, drug toxicity, or other acute factors were also excluded. Patients had never been treated with cholinesterase inhibitors or neuroleptic drugs prior to SPECT examination.

Seventy-six normal healthy volunteers (37 men, 39 women; age range, 67–87 years; mean age \pm SD, 71.0 ± 7.1) had no neurologic or psychiatric disorders, including alcoholism, substance abuse, atypical headache, head trauma with loss of consciousness, and asymptomatic cerebral infarction detected by T₂-weighted MRI. They did not significantly differ in age, sex and education from the AD patients.

This study was approved by the Ethics Committee of the National Center of Neurology and Psychiatry, and informed consent was obtained from all subjects prior to participation.

SPECT image data of normal healthy volunteers in the present study have been reported previously [16].

SPECT Imaging

Each subject received an intravenous injection of 600 MBq of ^{99m}Tc -ECD while lying supine with eyes closed in a dimly lit, quiet room. Ten minutes after injection, a brain SPECT was performed using a triple-headed gamma camera (MULTISPECT3; Siemens, Hoffman Estates, Ill., USA) equipped with high-resolution fan-beam collimators. For each scan, projection data were obtained in 128×128 matrix, and the camera was rotated through 120° with 24 steps of 50 s per step. SPECT images were reconstructed using a Shepp and Logan Hanning filter at 0.7 cycles per centimeter. Attenuation correction was performed using Chang's method.

Image Analysis

Voxel-based analysis of SPECT data was performed using Statistical Parametric Mapping 99 (SPM99) (Wellcome Department of Cognitive Neurology, London, UK) run on MATLAB (The MathWorks, Inc., Sherborn, Mass., USA). The images were spatially normalized to an original template for ^{99m}Tc -ECD using SPM99 [17]. Images were then smoothed with a Gaussian kernel of 12 mm in full width half maximum (FWHM).

Statistical Analysis

The processed images were analyzed using SPM99. The effect of global differences in cerebral blood flow among scans was removed by proportional scaling. The subject and covariate effects were estimated with a general linear model for each voxel. To test hypotheses about regional population effects, the estimates were compared using linear compounds or contrasts. The resulting sets of t values constituted statistical parametric maps (SPM $\{t\}$). SPM $\{t\}$ were transformed to unit normal distribution (SPM $\{Z\}$) and thresholded at $p < 0.01$ without multiple comparisons. Extent threshold was set to 0 voxel. Moreover, gender, age at onset, disease duration, and MMSE score were treated as nuisance variables in the comparison of AD patients with and without delusions.

Results

Age, Sex, Severity, and Subtypes of Delusion

Of 64 patients with AD who underwent neuropsychological testing and brain perfusion SPECT, 25 patients were classified as having delusions and 39 patients as having no delusions. The two groups did not significantly differ in age, with the patients with delusions ranging from 55 to 92 years (mean, 74.7 years) and the patients without delusions from 48 to 86 years (mean, 71.1 years). MMSE scores did not significantly differ either between the two groups, ranging from 5 to 26 (mean \pm SD, 16.8 ± 5.9) for the patients with delusions and from 9 to 26 (mean \pm SD, 19.5 ± 4.7) for the patients without delusions.

The types of delusions are summarized in table 1. Some patients had more than one type of delusion. Of the 25 patients with delusions, delusion of theft was observed in 16 (64%), delusion of 'the house is not patient's own house', a type of misidentification delusions, was observed in 10 (40%), and delusional jealousy was observed in 2 (8%).

Statistical Parametric Mapping

In the comparison between normal healthy volunteers and all AD patients, regional cerebral blood flow (rCBF) of the posterior precuneus, cingulate gyri, and parietal association cortex was significantly decreased in the AD patients (maximum at x, y, z in Talairach's space at 6,

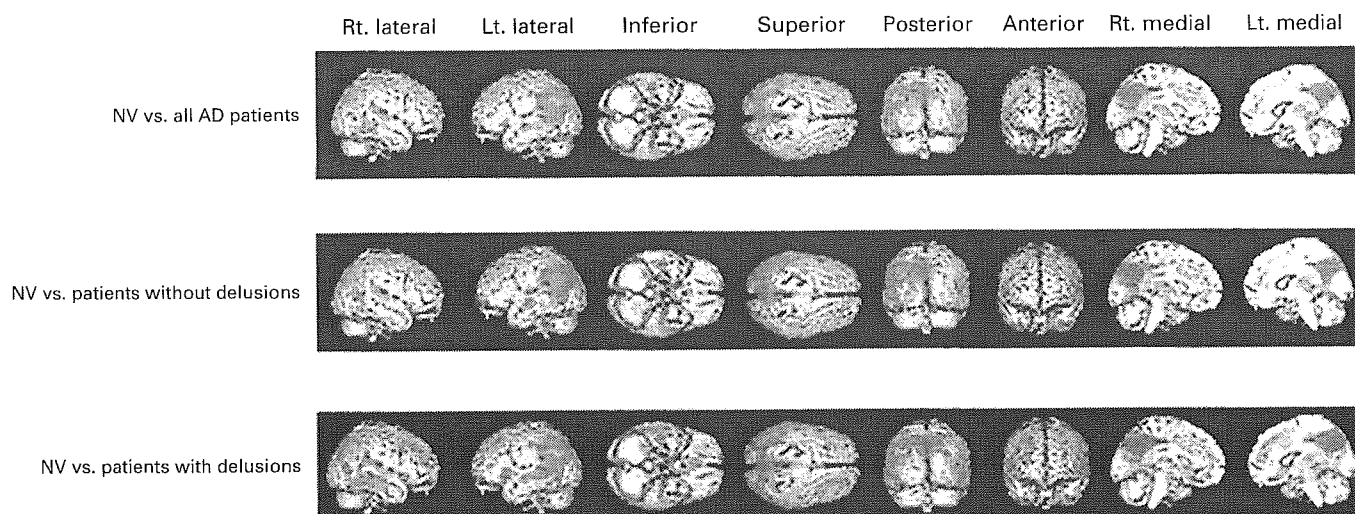


Fig. 1. Result of SPM analysis (normal healthy volunteers vs. AD patients). The colored areas show the regions with lower perfusion in all AD patients (upper row), AD patients without delusions (middle row), and AD patients with delusions (lower row) compared with the normal healthy volunteers, respectively (voxel height = 0.05, uncorrected). NV = Normal healthy volunteers; Rt. = right; Lt. = left.

Table 1. Types of delusions in 25 patients with delusions

| Type | Pa-tients | Age years | Gender M:F | Education years | MMSE |
|---|-----------|-------------|------------|-----------------|------------|
| Persecutory delusions | | | | | |
| People are stealing things from patient | 16 | 76.9 ± 8.6 | 4:12 | 10.2 ± 2.5 | 16.2 ± 6.4 |
| Patient is being conspired against or harassed | 3 | 73.3 ± 10.0 | 0:3 | 8.3 ± 2.1 | 6.5 ± 2.1 |
| Patient has been abandoned | 2 | 60 ± 2.8 | 0:2 | 9 ± 0 | 8.5 ± 0.7 |
| Misidentification delusions | | | | | |
| Someone is in the house | 8 | 74.5 ± 10.8 | 1:7 | 10.8 ± 2.7 | 14.5 ± 5.6 |
| Spouse and others are not who they claim to be | 2 | 78.5 ± 9.2 | 0:2 | 11 ± 0 | 14.5 ± 9.2 |
| The house is not the patient's own house | 10 | 70.7 ± 9.5 | 3:7 | 10.5 ± 2.3 | 16.9 ± 4.8 |
| Television figures are actually present in the home | 1 | 78 | 0:1 | 10 | 17 |
| Delusional jealousy | 2 | 74 ± 4.2 | 0:2 | 11 ± 1.4 | 18 ± 9.9 |
| Others | 2 | 70 ± 11.3 | 0:2 | 9.5 ± 0.7 | 12.5 ± 6.4 |

Values are mean ± SD unless otherwise indicated. A number of patients had more than one type of delusion.

-53, 32, Z-score = 6.12, right precuneus; submaxima at -8, -54, 17, Z-score = 5.35, left posterior cingulated gyrus, and -53, -45, 41, Z-score = 4.91, left inferior parietal lobule; cluster size = 7,455 voxels) (voxel height = 0.05, uncorrected). Moreover, left-hemisphere dominant hypoperfusion was found in the patients without delusions (maximum at -48, -18, -6, Z-score = 3.16, left superior temporal gyrus; submaximum at -57, -6, -11, Z-score =

2.48, left middle temporal gyrus; cluster size = 261 voxels), and bilateral frontal lobe hypoperfusion, especially dominant in the right, was found in the patients with delusions (maximum at 44, 15, 36, Z-score = 3.40, middle frontal gyrus; cluster size = 846; submaximum at 8, 28, -18, Z-score = 3.35, right medial frontal gyrus; cluster size = 374) (voxel height = 0.05, uncorrected) (fig. 1).

Fig. 2. Result of SPM analysis (AD patients with delusions vs. AD patients without delusions). The colored areas show the regions with lower perfusion in the patients with delusions compared with the patients without delusions (voxel height = 0.01, uncorrected). Left: result superimposed on standard 3D anatomical template. Right: 3-way-glass brain view.

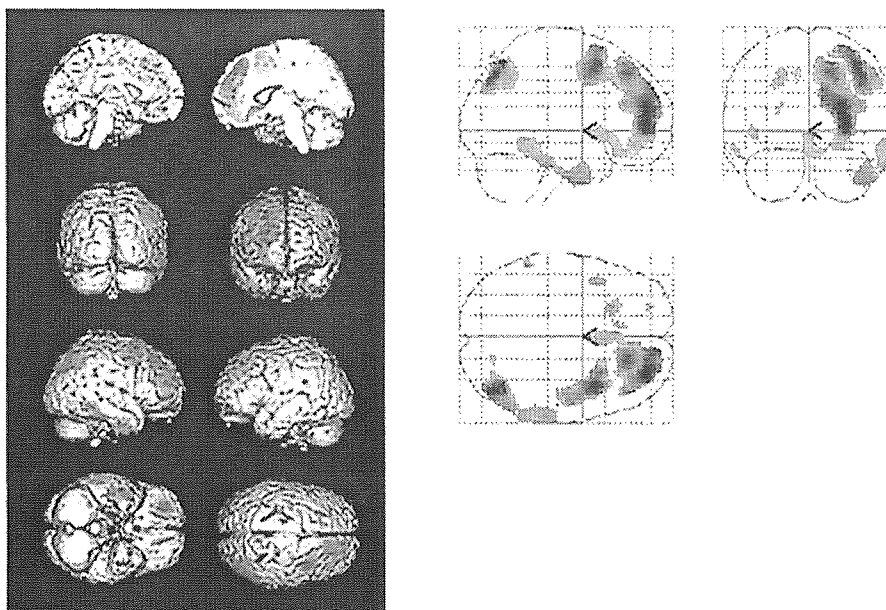
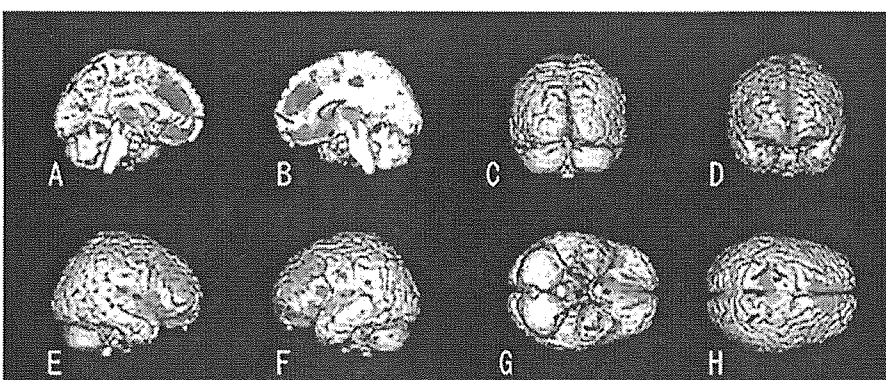


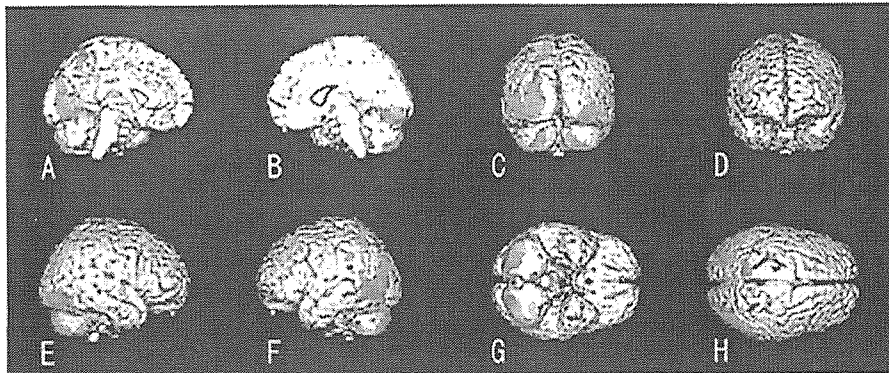
Fig. 3. Regions with lower perfusion in the patients with persecutory delusions compared with the patients with misidentification delusions (voxel height = 0.05, uncorrected). View from medial right (A), medial left (B), posterior (C), anterior (D), right lateral (E), left lateral (F), inferior (G), and superior (H).



Compared with the patients without delusions, the patients with delusions showed significantly decreased perfusion in the right prefrontal cortex (maxima at 30, 51, 3, Z-score = 3.71, right middle frontal gyrus, and 28, 51, 10, Z-score = 3.63, right superior frontal gyrus; cluster size = 2,723 voxels; submaximum at 40, 12, 44, Z-score = 3.41, right middle frontal gyrus; cluster size = 747 voxels), right inferior to middle temporal cortices (maximum at 40, 0, -32, Z-score = 2.94, right middle temporal gyrus; cluster size = 407 voxels), and right parietal cortex (maximum at 42, -66, 46, Z-score = 3.55, right inferior parietal lobule; cluster size = 538 voxels) (voxel height = 0.01, uncorrected) (fig. 2). There was no region with increased rCBF in the patients with delusions compared with the patients without delusions.

In the comparison within the patients with delusions, rCBF in patients with a delusion of 'people are stealing things from patient' (n = 16), a type of persecutory delusions, was more decreased in the bilateral anterior cingulate gyrus compared with the patients with a delusion of 'the house is not patient's own house' (n = 10), a type of misidentification delusions (maximum at 6, 38, 22, Z-score = 3.42; cluster size = 5,736) (voxel height = 0.05, uncorrected) (fig. 3). Moreover, rCBFs of the patients with misidentification delusions were more decreased in the left lingual gyrus (maximum at -26, -76, 2, Z-score = 3.32; cluster size = 1,925 voxels) and right middle occipital gyrus (maximum at 34, -80, -9, Z-score = 2.86; cluster size = 636 voxels) (voxel height = 0.05, uncorrected) (fig. 4).

Fig. 4. Regions with lower perfusion in the patients with misidentification delusions compared with the patients with persecutory delusions (voxel height = 0.05, uncorrected). View from medial right (A), medial left (B), posterior (C), anterior (D), right lateral (E), left lateral (F), inferior (G), and superior (H).



Discussion

In AD, delusions constitute one of the most prominent psychiatric manifestations [18] and were reported in the initial case description by Alzheimer [19]. The prevalence of delusions was reported as 22% by Mega et al. [20], 46.7% by Ozawa [21], 38.6% by Hirono et al. [22], 55% by Wilson et al. [23], and 47.3% by Ikeda et al. [6]. In this study, 39.1% of the AD patients exhibited delusions, with this figure well within the range reported in the previous studies. Gender difference has not been found in studies performed in Western countries on a large number of subjects [24]. However, in Japan, several studies have reported that psychotic symptoms were more common in females than in males. Female predominance in delusion was also evident in this study. The discrepancy between Western countries and Japan may be attributed to methodological and sociocultural differences, as suggested by Ikeda et al. [6].

Recent PET and SPECT studies with AD patients have revealed selective rCBF reductions in the posterior cingulate gyrus, precuneus, and parietal association cortex using a stereotactic anatomic standardization technique such as SPM and 3D-SSP [16, 25–28]. The same finding was made in the present study that compared normal healthy volunteers and AD patients. In addition, frontal lobe hypoperfusion with right-side dominance was found in the patients with delusions, although rCBF of the patients without delusions was not significantly decreased in the frontal lobe. To our knowledge, this is the first report to show a right-side dominant decrease of rCBF in the frontal lobe in patients with delusions as compared with normal healthy volunteers using an SPM technique.

Moreover, to clarify the relationship between characteristics of delusions and regional perfusions, we attempt-

ed to compare cortical perfusions of AD patients with different types of delusions although the sample size was limited. Lower perfusion in the anterior cingulate gyrus was observed in the patients with persecutory delusions, and lower perfusions in the lingual gyrus and middle occipital gyrus were observed in the patients with misidentification delusions. Further studies with a larger number of patients are needed to elucidate the association between regional deficits and each delusion.

An association between cerebral deficits and delusions has been previously noted, and findings from stroke and brain trauma research have suggested that delusions may be caused by deficits in the right hemisphere [29]. Several researchers have also demonstrated relationships between delusions and cerebral regions in AD. For example, Fukuhara et al. [30] found an association between delusions and right medial posterior parietal hypoperfusion. Staff et al. [9] noted a relation between delusions and right frontal cortex. Sultzer et al. [11] found that delusions are associated with hypometabolism in the right superior dorsolateral frontal cortex, right inferior frontal pole, and right lateral orbitofrontal region by using a conventional ROI approach. Similar findings, such as involvement of the right frontal region, were examined in the present study, but the specific regions varied.

Variable findings may be due to differences in sample size and analytical methods as well as populations and severity of disorder. Since the past studies were performed in a rather small number of subjects, we included a larger number to demonstrate the relationship between delusions and functional deficits. Furthermore, we used SPM analysis instead of ROI analysis. Image analysis using ROI is often criticized for not providing information outside the ROI; alteration of cerebral blood flow outside the ROI may be overlooked. The use of SPM to analyze reconstructed SPECT data has an advantage over the con-

ventional ROI approach because it makes no a priori assumptions of location and size. However, we must keep in mind that SPM analysis also has limitations: it cannot test a specific neuroanatomic hypothesis and is susceptible to type I error.

In the present study, we found a close relationship between delusions and right hemispheric deficits. This finding supports the hypothesis of Malloy and Richardson [29], according to which a functional deficit in the right hemisphere causes a sense of unfamiliarity concerning places and persons, and leads to recognition disorders and self-corrective dysfunction. Thus, right posterior temporo-parietal lesions may produce a sense of unfamiliarity concerning place, right inferior temporal lesions may produce recognition disorders or a sense of unfamiliarity

with persons, and anterior parietal lesions may produce dysmorphic distortions. Delusions may result from elaboration of these misperceptions.

Conclusion

Our results showed a characteristic pattern of rCBF reduction in AD patients with delusions compared with normal healthy volunteers and AD patients without delusions. Deficits in the right hemisphere in AD patients appear to play the major role in the emergence of delusions. Detection of right hemispheric deficits using a statistical parametric mapping approach may become useful in the future for making therapeutic choices.

References

- 1 Psychotic symptoms in Alzheimer's disease (editorial). *Lancet* 1989;iii:1193-1194.
- 2 Rabins PV, Mace NL, Lucas MJ: The impact of dementia on the family. *JAMA* 1982; 248: 333-335.
- 3 Haupt M, Romero B, Kurz A: Delusions and hallucinations in Alzheimer's disease: results from two-year longitudinal study. *Int J Geriatr Psychiatry* 1996; 11: 965-972.
- 4 Steele C, Rovner B, Chase GA, Folstein M: Psychiatric symptoms and nursing home placement of patients with Alzheimer's disease. *Am J Psychiatry* 1990; 147: 1049-1051.
- 5 Haupt M, Kurz A: Predictors of nursing home placement in patients with Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* 1993; 8: 741-746.
- 6 Ikeda M, Shigenobu K, Fukuhara R, Hokoishi K, Nebu A, Maki N, Nomura M, Komori K, Tanabe H: Delusions of Japanese patients with Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* 2003; 18: 527-532.
- 7 Hirono N, Mori E, Ishii K, Kitagaki H, Sasaki M, Ikejiri Y, Imamura T, Shimomura T, Ikeda M, Yamashita H: Alteration of regional cerebral glucose utilization with delusions in Alzheimer's disease. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 1998; 10: 433-439.
- 8 Starkstein SE, Vazquez S, Petracca G, Sabe L, Migliorelli R, Teson A, Leiguarda R: A SPECT study of delusions in Alzheimer's disease. *Neurology* 1994; 44: 2055-2059.
- 9 Staff RT, Shanks MF, Macintosh L, Pestell SJ, Gemmell HG, Venneri A: Delusions in Alzheimer's disease: spet evidence of right hemispheric dysfunction. *Cortex* 1999; 35: 549-560.
- 10 Mega MS, Lee L, Dinov ID, Mishkin F, Toga AW, Cummings JL: Cerebral correlates of psychotic symptoms in Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000; 69: 167-171.
- 11 Sultzer DL, Brown CV, Mandelkern MA, Mahler ME, Mendez MF, Chen ST, Cummings JL: Delusional thoughts and regional frontal/temporal cortex metabolism in Alzheimer's disease. *Am J Psychiatry* 2003; 160: 341-349.
- 12 Mentis MJ, Weinstein EA, Horwitz B, McIntosh AR, Pietrini P, Alexander GE, Furey M, Murphy DG: Abnormal brain glucose metabolism in the delusional misidentification syndromes: a positron emission tomography study in Alzheimer disease. *Biol Psychiatry* 1995; 38: 438-449.
- 13 McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM: Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA working group under the auspices of the Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 1984; 34: 939-944.
- 14 Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR: 'Mimic mental state'. A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 1975; 12: 189-198.
- 15 Cummings JL, Mega M, Gray K, Rosenberg-Thompson S, Carusi DA, Gornbein J: The Neuropsychiatric Inventory: comprehensive assessment of psychopathology in dementia. *Neurology* 1994; 44: 2308-2314.
- 16 Imabayashi E, Matsuda H, Asada T, Ohnishi T, Sakamoto S, Nakano S, Inoue T: Superiority of 3-dimensional stereotactic surface projection analysis over visual inspection in discrimination of patients with very early Alzheimer's disease from controls using brain perfusion SPECT. *J Nucl Med* 2004; 45: 1450-1457.
- 17 Ohnishi T, Matsuda H, Hashimoto T, Kunihiro T, Nishikawa M, Uema T, Sasaki M: Abnormal regional cerebral blood flow in childhood autism. *Brain* 2000; 123: 1838-1844.
- 18 Migliorelli R, Petracca G, Teson A, Sabe L, Leiguarda R, Starkstein SE: Neuropsychiatric and neuropsychological correlates of delusions in Alzheimer's disease. *Psychol Med* 1995; 25: 505-513.
- 19 Alzheimer A: Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg Z Psychiatr Psych Gerichtl Med* 1907; 64: 146-148.
- 20 Mega MS, Cummings JL, Fiorello T, Gornbein J: The spectrum of behavioral changes in Alzheimer's disease. *Neurology* 1996; 46: 130-135.
- 21 Ozawa I: The delusion of theft in elderly with dementia. I. Statistical data and psychopathology of the delusion (in Japanese). *Seishin Shinkeigaku Zasshi* 1997; 99: 370-388.
- 22 Hirono N, Mori E, Yasuda M, Ikejiri Y, Imamura T, Shimomura T, Ikeda M, Hashimoto M, Yamashita H: Factors associated with psychotic symptoms in Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998; 64: 648-652.
- 23 Wilson RS, Gilley DW, Bennett DA, Beckett LA, Evans DA: Hallucinations, delusions, and cognitive decline in Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000; 69: 172-177.
- 24 Bassiony MM, Steinberg MS, Warren A, Rosenblatt A, Baker AS, Lyketsos CG: Delusions and hallucinations in Alzheimer's disease: prevalence and clinical correlates. *Int J Geriatr Psychiatry* 2000; 15: 99-107.
- 25 Minoshima S, Foster NL, Kuhl DE: Posterior cingulate cortex in Alzheimer's disease. *Lancet* 1994; 344: 895.
- 26 Minoshima S, Giordani B, Berent S, Frey KA, Foster NL, Kuhl DE: Metabolic reduction in the posterior cingulate cortex in very early Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1997; 42: 85-94.
- 27 Ishii K, Sasaki M, Yamaji S, Sakamoto S, Kitagaki H, Mori E: Demonstration of decreased posterior cingulate perfusion in mild Alzheimer's disease by means of H2150 positron emission tomography. *Eur J Nucl Med* 1997; 24: 670-673.
- 28 Kogure D, Matsuda H, Ohnishi T, Asada T, Uno M, Kunihiro T, Nakano S, Takasaki M: Longitudinal evaluation of early Alzheimer's disease using brain perfusion SPECT. *J Nucl Med* 2000; 41: 1155-1162.
- 29 Malloy PF, Richardson ED: The frontal lobes and content-specific delusions. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 1994; 6: 455-466.
- 30 Fukuhara R, Ikeda M, Nebu A, Kikuchi T, Maki N, Hokoishi K, Shigenobu K, Komori K, Tanabe H: Alteration of rCBF in Alzheimer's disease patients with delusions of theft. *Neuroreport* 2001; 12: 2473-2476.

Homocysteic Acid Induces Intraneuronal Accumulation of Neurotoxic A β 42: Implications for the Pathogenesis of Alzheimer's Disease

Tohru Hasegawa,^{1*} Wataru Ukai,² Dong-Gyu Jo,³ Xiangru Xu,³ Mark P. Mattson,³ Masaya Nakagawa,² Wataru Araki,⁴ Toshikazu Saito,^{1,2} and Tatsuo Yamada⁵

¹Saga Women's Junior College, Honjyou Town, Saga, Japan

²Toyama Chemical Co., Shimookui, Toyama, Japan

³Laboratory of Neurosciences, National Institute on Aging Intramural Research Program, Baltimore, Maryland

⁴National Institute of Neuroscience, NCNP, Tokyo, Japan

⁵Fukuoka University Hospital, Neurological Intermedicine, Nanakuma, Fukuoka, Japan

The causes of neuronal dysfunction and degeneration in Alzheimer's disease (AD) are not fully understood, but increased production of neurotoxic forms of amyloid β -peptide-42 (A β 42) seems of major importance. Large extracellular deposits of aggregated A β 42 (plaques) is a diagnostic feature of AD, but A β 42 may be particularly cytotoxic when it accumulates inside neurons. The factors that may promote the intracellular accumulation of A β 42 in AD are unknown, but recent findings suggest that individuals with elevated homocysteine levels are at increased risk for AD. We show that homocysteic acid (HA), an oxidized metabolite of homocysteine, induces intraneuronal accumulation of a A β 42 that is associated with cytotoxicity. The neurotoxicity of HA can be attenuated by an inhibitor of γ -secretase, the enzyme activity that generates A β 42, suggesting a key role for intracellular A β 42 accumulation in the neurotoxic action of HA. Concentrations of HA in cerebrospinal fluid (CSF) were similar in AD and control subjects. CSF homocysteine levels were elevated significantly in AD patients, however, and homocysteine exacerbated HA-induced neurotoxicity, suggesting a role for HA in the pathogenic action of elevated homocysteine levels in AD. These findings suggest that the intracellular accumulation of A β 42 plays a role in the neurotoxic action of HA, and suggest a potential therapeutic benefit of agents that modify the production and neurotoxic actions of HA and homocysteine. © 2005 Wiley-Liss, Inc.

Key words: amyloid plaques; apoptosis; cerebrospinal fluid; γ secretase; hippocampus; homocysteine

Increased production of neurotoxic forms of amyloid β -peptide (A β), particularly the 42 amino acid form (A β 42) is thought to play a central role in the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD; Hardy and Selkoe, 2002; Mattson, 2004b). Extracellular deposits of aggregated A β have received considerable attention for their potential neurotoxic role in AD. Degenerated neurites are often

associated with plaques and exposure of cultured neurons to aggregating forms of A β can induce cell death and can increase the vulnerability of neurons to excitotoxic and metabolic insults (Su et al., 1998; Mattson, 2004a). A β is believed to be generated in an intracellular compartment and is present in higher than normal amounts within degenerating neurons in AD patients (Hyman et al., 1989; LaFerla et al., 1997). Recent findings suggest that intracellular A β 42 may be particularly toxic to neurons. Microinjection of A β 42 into cultured human neurons induced apoptosis at concentrations as low as 1 pM (Zhang et al., 2002). Overexpression of human amyloid precursor protein (APP) induced apoptosis in cultured rat cortical neurons, which was prevented by a γ -secretase inhibitor (Kienlen-Campard et al., 2002). An increase in cytosolic calcium levels increased the intracellular accumulation of A β 42 and neuronal death, which was prevented by a γ -secretase inhibitor (Pierrot et al., 2004). In addition, accumulation of intracellular A β in hippocampal neurons has been associated with synaptic dysfunction and tau pathology (Oddo et al., 2003) and cell death (Casas et al., 2004) in mouse models of AD. In light of these kinds of data, it is important to understand the mechanisms that result in intracellular accumulation of A β 42.

Although mutations in APP and presenilins are responsible for increased A β 42 production in rare inherited forms of AD, the mechanisms that result in increased A β 42 production in the most common sporadic form of

Wataru Ukai is currently at the Department of Psychological Medicine, Sapporo Medical School, Sapporo, Japan.

*Correspondence to: Dr. Tohru Hasegawa, Saga Women's Junior College, 1313 Honjyou Honjyou Town, Saga 840-8550, Japan.
E-mail: hasegawa@saga-wjc.ac.jp

Received 14 December 2004; Revised 1 February 2005; Accepted 2 March 2005

Published online 16 May 2005 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jnr.20514

AD are unknown. Epidemiologic and clinical studies have revealed an association between elevated plasma homocysteine levels and increased risk of AD (Clarke et al., 1998; Miller, 1999; Seshadri et al., 2002). Homocysteine can be toxic to neurons and can increase their vulnerability to being damaged and killed by A β (Ho et al., 2001; Kruman et al., 2002), suggesting a mechanism whereby homocysteine might promote neuronal degeneration in AD. Homocysteine may not increase A β 42 production; instead it seems to impair DNA repair and reduce the threshold level of DNA damage required to trigger apoptosis (Kruman et al., 2000). Homocysteine is an intermediate in one-carbon metabolism and is produced from the amino acid methionine and homocysteine levels are normally kept low by the activities of methionine synthase, which regenerates methionine, and cystathionine β -synthase, which converts homocysteine to cysteine (Scott and Weir, 1998). Homocysteic acid (HA) is an oxidation product of homocysteine produced by brain cells and released in response to excitatory stimulation (Klanchnik et al., 1992). HA is a glutamate analogue that can activate the *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) subtype of glutamate receptor and may therefore function as an excitatory neurotransmitter in the brain (Cuenod et al., 1990). Excessive activation of NMDA receptors by HA has been implicated in the pathogenesis of epilepsy (Folbergrova et al., 2000).

HA has been shown to induce oxidative stress in neurons, which plays an important role in its neurotoxic actions (Sagara et al., 1999; Lockhart et al., 2000; Li et al., 2003). Because oxidative stress can induce the production of HA, and may also promote increased production and intracellular accumulation of A β (Gasparini et al., 1997; Paola et al., 2000), we carried out experiments aimed at determining whether intracellular A β 42 accumulation is involved in the neurotoxic actions of HA.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Neurobasal medium, 2.5% trypsin, and B27 were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA) and the trypsin was diluted 10 times in phosphate-buffered saline (PBS). Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Nissui Pharmaceutical, Tokyo, Japan) was supplemented with 20 mM glucose, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium bicarbonate, and 100 U/ml gentamycin (Invitrogen). DL-Homocysteine was obtained from Wako (Tokyo, Japan), and polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane was obtained from Millipore (Bedford, MA). Horseradish peroxidase (HRP)-linked F(ab')₂ fragment and enhanced chemiluminescence (ECL) system were obtained from Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, UK). Fetal bovine serum (FBS), L-homocysteic acid, and all other chemicals were obtained from Sigma (St. Louis, MO).

Cell Cultures

Primary cultures of cortical neurons were prepared from embryonic Day 18–19 (E18–19) fetal Wistar or Sprague-Dawley rats. Cortical tissue fragments were incubated for 20 min in a

solution of 0.2% trypsin in calcium- and magnesium-free Hanks' balanced saline solution (HBSS), followed by incubation for 5 min in the presence of trypsin inhibitor. Cells were dissociated by trituration through the narrowed bore of a fire-polished pipette and were plated into culture dishes coated with either poly-L-lysine or polyethylenimine in DMEM medium containing 10% FBS. After cells had attached (3–6 hr post-plating) the culture medium was changed to Neurobasal medium with B27 supplements. Cultures were maintained in a humidified incubator with an atmosphere of 5% CO₂/95% air at 37°C. Experiments were carried out on cells that had been in culture for 8–12 days. Under these conditions, greater than 90% of the cells were neurons based upon immunoreactivity for microtubule-associated protein 2 (MAP2) and glial fibrillary acidic protein (GFAP). Chinese hamster ovary (CHO) cell expressing human amyloid precursor protein (APP751) carrying the K670N,M671L Swedish mutation (CHO-APP_{swe}) were a generous gift from J. Shioi (Mount Sinai School of Medicine, New York).

Quantitation of Neuronal Viability

Two methods were used to quantify neuronal survival. In the first method, the mitochondrial dehydrogenase activity that cleaves 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) was used to determine cell survival. The cortical neurons were incubated with MTT (0.5 mg/ml) for 2 hr at 37°C, and blue-colored formazan cleaved by dehydrogenase enzymes in active mitochondria was dissolved in 20% SDS/50% *N,N*-dimethylformamide (DMF) and quantified spectrophotometrically at 570 nm. The results are expressed as a percentage of the value for control cultures. Effective dose 50% (ED50) values and 95% confidence limits were determined by the method of Fieller with linear regression analysis of log-logit plot (logit conversion: $\log [p/(1-p)]$; $p = \% \text{ neuronal viability reduction}$) using Yukms Statistical Library II v5 (Yukms Corp., Tokyo, Japan). For the second method, neuronal survival was quantified by counting viable neurons in premarked microscope fields (10 \times objective) before experimental treatment and at different time points after treatment. Viability of neurons was established by morphologic criteria. Neurons with intact neurites of uniform diameter and a soma with a smooth appearance were considered viable, whereas neurons with fragmented neurites and a vacuolated or swollen soma were considered nonviable. Post-treatment survival values for each culture were calculated as a percentage of the number of viable neurons present before treatment.

Quantification of A β 40 and A β 42 Levels

Concentrations of A β 40 and A β 42 in culture medium were carried out by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using methods similar to those described previously (Fukamoto et al., 1999; Gasparini et al., 2004). Culture medium was collected and cleared by centrifugation (16,000 \times g for 5 min at 4°C), and a 100- μ l sample of the medium was used for A β measurement. For measurement of intracellular, A β , cells were solubilized in a buffer consisting of 20 mM Tris-HCl (pH 7.0), 2 mM EDTA, 0.2% SDS, 1% Triton X-100, 1% Nonidet (N)P-40, and protease inhibitors cocktail (Calbiochem). Sandwich ELISA assays were carried out to measure