

pathological involvement of Lib. Based on the observation that Lib is expressed in plaque-associated activated astrocytes, the functional involvement of Lib in glial migration through extracellular matrix (ECM) was analyzed. Although interactions between ECM macromolecules and astrocytes are required in migrating towards and remaining around the AD lesions, molecular mechanisms involved with these events are not well understood. Our results suggest that Lib may participate in astroglial motility around senile plaques in AD brain.

Materials and methods

Brains. The brains were obtained from the brain bank of the Choju Medical Institute of Fukushima Hospital and protocols used were approved by the Ethics Committee of Fukushima Hospital. The scientific use of this human material was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and informed consents were obtained from the guardians of the patients. The brains from five neurologically normal control patients in which Alzheimer's disease (AD)-type changes were lacking, and those from five patients with AD were examined. The diagnosis of AD was established using the criteria recommended by the National Institute on Aging [11] and the Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD) [12]. The ages of the three male and two female neurologically normal controls ranged from 54 to 82 years, and those of the two male and three female patients with AD from 67 to 80 years. In all cases, brains were obtained within 2–13 h after death. Small blocks were dissected from the parietal lobes and stored at -80°C until used. The frozen samples were thawed and fixed for 2 days in phosphate-buffered 4% paraformaldehyde. They were then transferred to a maintenance solution of 15% sucrose in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, and kept in the cold until used. Sections were cut on a freezing microtome at 20- μm thickness.

In situ hybridization. Human Lib expression in AD brain tissue was evaluated by in situ hybridization histochemistry. Human Lib cDNA fragments, encompassing nucleotides 1444–1742 of hLib open-reading frame (ORF; Accession No. AB071037), were amplified by PCR and cloned into pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen). A cDNA probe for hLib was constructed by PCR using T7 and SP sequences in the vector as primers. Amplifications were done in 100 μl PCR buffer containing 10 pM primer, 2 nM dNTPs, 200 pM digoxigenin-11-dUTP (Roche), 10 ng template plasmid, and 5 U Ampli-Taq DNA polymerase using a thermal cycler (Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 9600). Samples were denatured at 94°C for 5 min, followed by 30 cycles of amplification for 30 s at 94°C , for 30 s at 50°C , and for 30 s at 72°C . The final extension was at 72°C for 5 min. Sections were hybridized at 37°C for 2 days in buffer containing 50% formamide, 4 \times SSC, 0.2 \times Denhardt's solution, 21 ng/ml salmon sperm DNA, and 250 ng/ml digoxigenin-11-dUTP labeled and non-labeled PCR DNA probes. After hybridization, sections were rinsed three times in 1 \times SSC. Hybridization was detected by an enzyme-catalyzed color reaction using the DIG Nucleic Acid Detection kit (Boehringer-Mannheim Biochemica) according to the supplier's instructions. Negative controls were pretreated with RNAase and processed with identical procedures. Other control experiments were done using mixtures of either 10:1 or 1:1 of the digoxigenin-11dUTP-labeled and non-labeled PCR DNA probes. After detection of the mRNA signal for hLib by in situ hybridization, immunohistochemistry [13] was used to characterize the labeled cells using antibody against anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) (1:10,000, rabbit polyclonal, Dako). The sections were

mounted on glass slides and the coverslips were sealed with liquid paraffin.

Cell culture and transfection. Human glioma cells were purchased from the American Type Culture Collection. U87MG cells were maintained in Eagle's minimum essential medium (EMEM; Gibco) supplemented with non-essential amino acids (Gibco), pyruvate, and 10% fetal calf serum (FCS; Gibco) at 37°C under 5% CO_2 . H4 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco) containing 10% FCS. The cells were transfected either with pHLib-FLAG plasmid harboring the open-reading frame (ORF) of hLib tagged with a FLAG epitope at the carboxyl terminus or with control empty vector (pCMV-Tag4; Stratagene) using FuGene 6 (Roche). Stably transfected cells expressing hLib and control mock cells were selected with G418 (400 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Gibco) for 6 weeks and then obtained as mixed cell lines to avoid clonal variability.

Western blot analysis. Cells were washed with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) and lysed by incubation in lysis buffer (1% NP-40, 150 mM NaCl, 20 mM Hepes, pH 7.5, and complete protease inhibitor cocktail (Roche)) on ice for 30 min. Clarified lysates were obtained by centrifugation (30 min, 15,000g, 4°C). Supernatants were boiled with SDS sample buffer (5 min), separated on a 4–12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (Novex), and transferred to a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (NEN). Membranes were immersed for 1 h in blocking solution (5% non-fat dried milk in PBS containing 0.1% Tween 20 (PBS-T)) and probed with a polyclonal antibody raised against hLib (1:2000) in blocking solution overnight at 4°C . The membranes were washed extensively in PBS-T and incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit IgG antibody (Amersham, 1:3000) in PBS-T at room temperature for 1 h. FLAG-tagged proteins were detected by M2 anti-FLAG antibody (1:2000, Sigma) in blocking solution overnight at 4°C . Blots were washed and visualized with enhanced chemiluminescence (ECL; Amersham). The actin antibody (Sigma; AC-40) was used as a loading control.

Transmigration analysis. The role of Lib in cellular motility migration through reconstituted extracellular matrix (ECM) was investigated using BioCoat Matrigel 24-well invasion chambers (Becton-Dickinson) according to the supplier's instructions. Cell suspensions (0.5 ml of 5×10^4 cells/ml in 10% FCS-containing medium) were plated onto Matrigel-coated filters in triplicate wells of an invasion chamber. After the 22 h incubation, non-transmigration cells remaining on the upper surface of the filter were removed with a cotton swab and the invasive cells on the under surface were fixed and stained with Diff-Quick staining kit (Kokusai Shiyaku). The cells were photographed at 100 \times magnification in five predetermined fields and counted.

Blot overlay binding analysis. For production of recombinant hLib protein from sf9 cells (Invitrogen), the extracellular region of hLib (aa 1–529) tagged with His6 at C-terminal was cloned into the pFastBac1 vector (Gibco). The recombinant baculovirus was obtained according to manufacturer's guidelines. Recombinant hLib protein was affinity purified from cultured supernatants of infected sf9 cells using HiTrap Chelating HP (Amersham). Ability of hLib to bind to Matrigel (Becton-Dickinson, 356237), collagen type IV (Becton-Dickinson, 354245), laminin (Becton-Dickinson, 354232), fibronectin (Becton-Dickinson, 354008), aggrecan (Sigma, A1960), and bovine serum albumin (Sigma, A2153) was determined as previously described [14] with slight modifications. Briefly, each macromolecule was spotted onto a PVDF membrane at 5 μg and 0.5 $\mu\text{g}/\text{spot}$. The membrane was incubated with blocking solution at room temperature for 2 h and then incubated with recombinant hLib protein (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in blocking solution for 16 h at 4°C . The membrane was incubated with anti-hLib polyclonal antibody (1:1000) for 16 h at 4°C , followed by extensive washing, incubation with HRP-conjugated anti-rabbit IgG antibody (1:2000; Amersham), and detection with ECL (Amersham).

Results

Lib expression in activated astrocytes adjacent to senile plaques of Alzheimer's disease brain

To evaluate pathological involvement of Lib in AD, localization of hLib gene transcripts was evaluated in cerebral cortex sections from the patients by in situ hybridization analysis. As shown in Fig. 1A, mRNA for hLib was expressed in only neurons, but not in astrocytes in age-matched non-AD cortex sections. In AD brain sections, there appeared areas where hLib mRNA expression was not observed in neurons (Fig. 1B, lower central part) and these areas are thought to be damaged. In these 'neuron-negative' areas, hLib mRNA was detected in some cells surrounding the non-specifically stained senile plaques (Fig. 1C). Immunohistochemistry using an anti-GFAP antibody revealed that these hLib mRNA-positive cells were reactive astrocytes. As shown in Fig. 1D, GFAP-positive astrocytes directly surrounding and extending their processes toward non-specifically faintly stained senile plaques expressed hLib mRNA. Review of five AD brain sections indicated that approximately half of the reactive astrocytes around senile plaques were positive for hLib mRNA expression. Control hybridization sections which were incubated without the DNA probe or with a 1:1 mixture of the digoxigenin-11dUTP-labeled and non-labeled PCR DNA probe were negative. When a 10:1 mixture of the digoxigenin-11dUTP-labeled and non-labeled PCR DNA probe was used, only a weak signal could be detected (data not shown).

Lib promotes glial migration ability through ECM

Cell surface LRR proteins appear to have abilities to interact with extracellular proteins and/or matrixes [7–9]. The observation that Lib is expressed in reactive astrocytes around AD senile plaques (Fig. 1) prompted us to evaluate a role of Lib in cellular migration through ECM. The hLib expression plasmid, harboring hLib ORF with FLAG epitope tag at the C-terminus, was introduced into U87MG and H4 human glial cell lines. Human Lib expression from transfected cells was verified by Western blot analyses using an antibody raised against hLib and M2 anti-FLAG antibody. As shown in Fig. 2A, hLib protein was expressed in established cell lines, while hLib expression was undetectable in both parental wild type and empty vector control lines. The bands observed near 64 kDa are thought to correspond to immature molecules before complete glycosylation [10]. These cells were examined by migration analysis using Matrigel invasion chambers. Human Lib expression promoted migration through Matrigel in both transfected

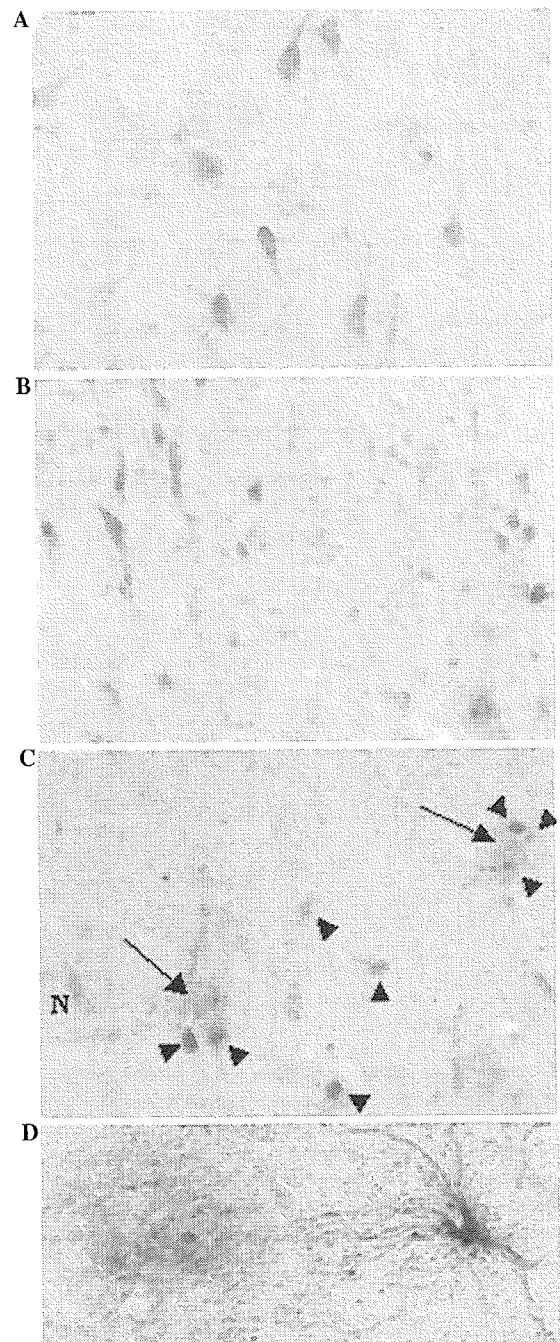


Fig. 1. In situ localization of hLib mRNA in non-AD (A) and AD brain sections (B–D). (A) Positive signals for hLib mRNA were seen in neurons in non-AD cerebral cortex. (B) In AD brain, neurons positive for hLib mRNA expression were observed, similar to non-AD brain. However, unlike non-AD brain, areas devoid of hLib mRNA expression in neurons were observed (lower central part). (C) In an area where hLib mRNA-positive neurons were not seen, signals for hLib mRNA were seen in several other non-neuronal cells (arrowheads). Some positive cells surrounding non-specifically stained senile plaques (arrows) were observed. A neuron with damaged morphology was faintly stained (N). Non-specific staining was seen in some vessels. (D) In situ hybridization histochemistry for hLib mRNA (blue-black) followed by immunohistochemistry with anti-GFAP antibody (brown) in AD brain. Human Lib mRNA-positive cell, that directly surrounded and extended processes toward the non-specifically faintly stained senile plaque, also expressed GFAP. (A–C) 185 \times ; (D) 256 \times .

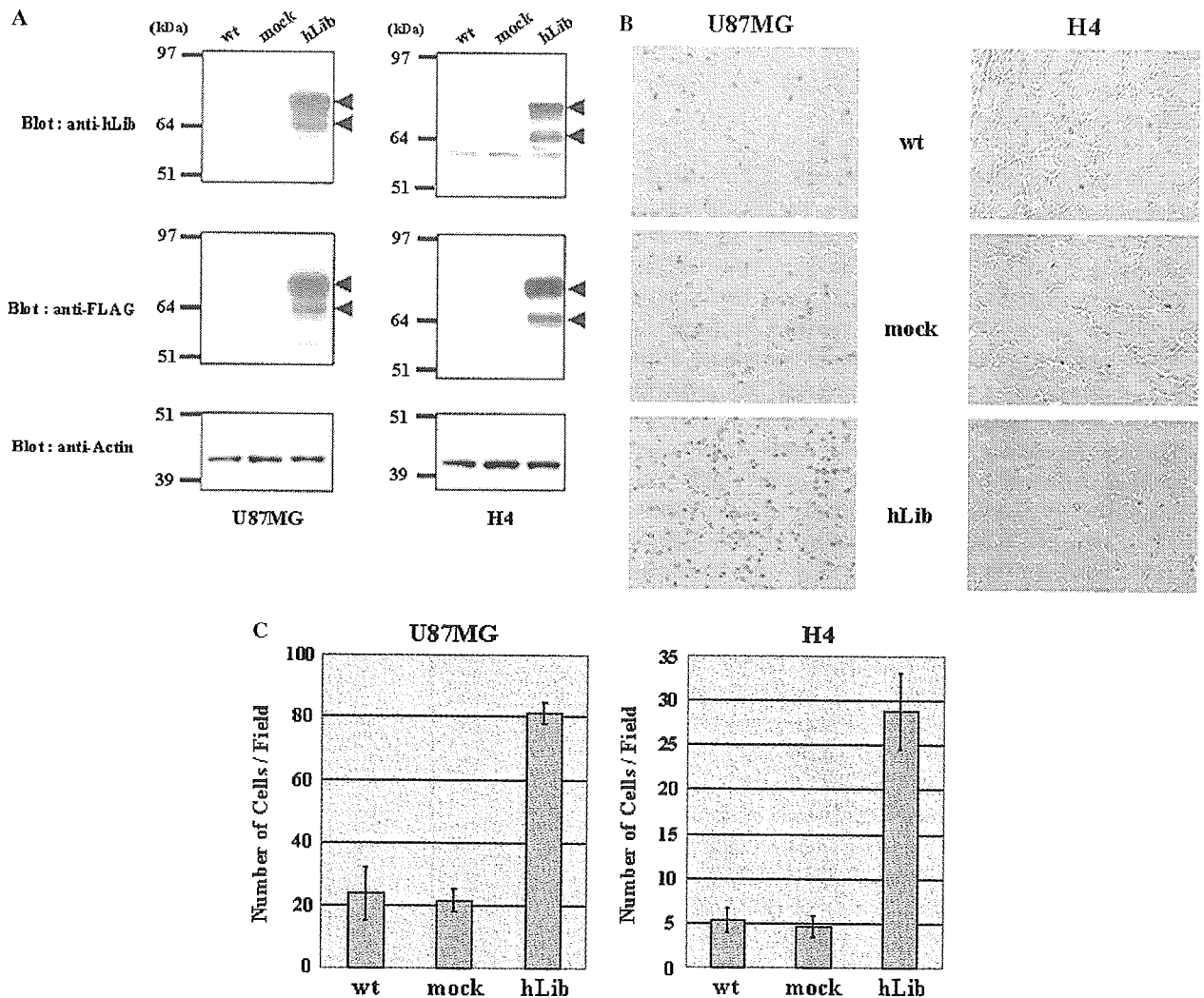


Fig. 2. Acceleration of cell migration by hLib expression. (A) Expression of hLib in transfected U87MG (left panels) or H4 (right panels) cells were detected by Western blot analysis using polyclonal antibody raised against hLib (top panels) or M2 anti-FLAG antibody (middle panels). Anti-hLib antibody reacted with hLib gene products (arrowheads) only in hLib-transfected cells (hLib) and not in parental wild type (wt) or empty vector control (mock) cells. Specific bands were detected similarly with M2 anti-FLAG antibody. Blotting with actin antibody was used as a loading control (bottom panels). (B) Migration analyses using Matrigel chambers. Parental wild type (wt), empty vector control (mock), and hLib-expressing cells (hLib) were plated on top of Matrigel-coated 8- μ m filters. After 22 h, cells migrating through the filter were stained, visualized, and counted. (C) Graphical representation of average number of migration through Matrigel at 22 h. Results are means \pm SEM from three independent experiments.

U87MG and H4 cells (Figs. 2B and C). These results demonstrate that Lib appears to be a LRR membrane protein that is involved in cell–ECM interactions important for glial migration.

Lib binds to extracellular matrix

Blot overlay assays were used to assess Lib binding to Matrigel and ECM macromolecules using affinity-purified extracellular region (aa 1–529) of hLib protein (Fig. 3A). Lib bound to fibronectin preferentially relative to Matrigel, collagen type IV or laminin, with minimal to no binding to aggrecan and BSA (Fig. 3B). Decreased dose of blotted macromolecules resulted in reduction of signal intensities.

Discussion

In the present study, we evaluated hLib mRNA expression in AD brains in comparison with age-matched non-AD brains. Human Lib mRNA was detected in activated astrocytes around senile plaques in AD and in these areas the signals for hLib mRNA in neurons were not observed. Similar to results from in vitro studies on rLib in rat astrocytes [6], hLib is also a distinctly inducible gene in human astrocytes in vivo, because signals for hLib mRNA were detected in reactive astrocytes in AD brain, but not in quiescent astrocytes in non-AD brain nor in lesion-free areas of AD brains. In contrast, neurons express hLib mRNA in non-AD brains and in lesion-free areas of AD

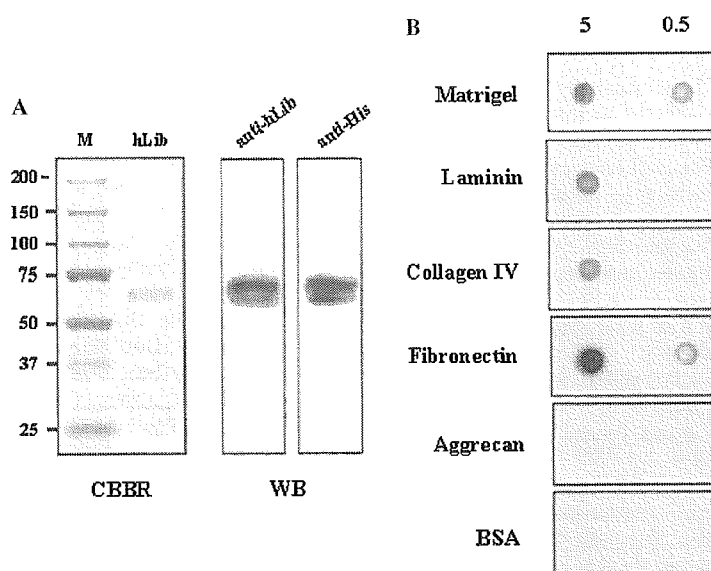


Fig. 3. Binding of hLib to ECM molecules. (A) Recombinant extracellular region of hLib was affinity purified from cultured supernatants of infected sf9 cells, followed by electrophoresis, and staining with CBBR250 (CBBR, left panel) (M, molecular size marker) or Western blotting with anti-hLib antibody (WB, right panel). (B) Matrigel, laminin, collagen type IV, fibronectin, aggrecan, and BSA were immobilized on PVDF membrane at 5 μ g and 0.5 μ g/spot. The PVDF membrane was then incubated with recombinant hLib, excessively washed, and immuno-detected using anti-hLib antibody.

brains. These results suggest that hLib expression may be required for maintenance of homeostasis in neuronal activities, although it is not clear whether loss of hLib mRNA in neurons of AD brains is caused by cellular death or loss of homeostasis in diseased neurons. It is also possible that Lib may play different roles in astrocytes and neurons, because some LRR proteins are involved in the regulation of neurite guidance and synapse formation [15–17].

Based on the presence of the LRR motif, Lib has been thought to play a role in specific cell–cell and/or cell–matrix interactions in astrocytes. The finding, that hLib mRNA is transcriptionally induced in activated astrocytes of AD brains, prompted us to evaluate the possibility that hLib may participate in the accumulation of astrocytes around senile plaques in cell–matrix interactions. The current data show that glial cells expressing hLib display accelerated migration through Matrigel, a reconstituted ECM. This effect on cellular motility is consistent with an other study showing reduction of cellular migration after suppressing hLib expression in a tumor cell line [18]. In addition, hLib protein demonstrates binding to some ECM constituents with some preferentiality, similar to other LRR proteins [19–21]. These results suggest that Lib may contribute to the regulation of cell–matrix adhesion interactions with respect to astrocyte recruitment around senile plaques.

In our previous study, ADAMTS-4, an ECM-degrading enzyme, was screened out from the same A β -treated astrocyte cDNA library [22]. Other studies

have demonstrated that matrix metalloprotease (MMP) activities responsible for degradation of ECM are higher in brains from AD patients than in controls, and that these ECM degradation enzymes are derived from astrocytes [23,24]. To investigate the possibility that these reported MMP (MMP-2, MMP-3, and MMP-9) activities were transcriptionally up-regulated in hLib-expressing glial cells, their mRNA expression levels were evaluated by reverse transcriptase PCR (RT-PCR). However, they were not increased in hLib-transfected cells compared to parental or control mock cells in both U87MG and H4 cells (data not shown).

Astrocyte recruitment toward lesions is thought to be dependent on chemotactic molecules, such as MCP-1, originated from the core of senile plaques in lesions [25], accompanied with recognition of, adhesion to, and reducing integrity of ECM. Lib appears to participate in these steps by specific protein–protein and/or matrix interactions. Further investigation into Lib molecular mechanisms may provide additional insight into astroglial motility around lesions, suggesting novel therapeutic strategies.

Acknowledgments

We greatly appreciate Seiji Takahara and Hidetoshi Tsuzaki for technical support and advice, and Yasuhide Hirota for helpful discussion and encouragement.

References

- [1] C.J. Pike, B.J. Cummings, C.W. Cotman, Early association of reactive astrocytes with senile plaques in Alzheimer's disease, *Exp. Neurol.* 132 (1995) 172–179.
- [2] E.G. McGeer, P.L. McGeer, The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases, *Brain Res.* 21 (1995) 195–218.
- [3] R.E. Mrak, J.G. Sheng, W.S. Griffin, Glial cytokines in Alzheimer's disease: review and pathogenic implications, *Hum. Pathol.* 26 (1995) 816–823.
- [4] D.W. Dickson, The pathogenesis of senile plaques, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56 (1997) 321–339.
- [5] M. Johnstone, A.J. Gearing, K.M. Miller, A central role for astrocytes in the inflammatory response to beta-amyloid; chemokines, cytokines and reactive oxygen species are produced, *J. Neuroimmunol.* 93 (1999) 182–193.
- [6] K. Satoh, M. Hata, H. Yokota, A novel member of the leucine-rich repeat superfamily induced in rat astrocytes by beta-amyloid, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290 (2002) 756–762.
- [7] B. Kobe, J. Deisenhofer, The leucine-rich repeat: a versatile binding motif, *Trends Biochem. Sci.* 19 (1994) 415–421.
- [8] S.G. Buchanan, N.J. Gay, Structural and functional diversity in the leucine-rich repeat family of proteins, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 65 (1996) 1–44.
- [9] B. Kobe, A.V. Kajava, The leucine-rich repeat as a protein recognition motif, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11 (2001) 725–732.
- [10] K. Satoh, M. Hata, H. Yokota, High Lib mRNA expression in breast carcinomas, *DNA Res.* 11 (2004) 199–203.
- [11] Z.S. Khachaturian, Diagnosis of Alzheimer's disease, *Arch. Neurol.* 42 (1985) 1097–1105.
- [12] S.S. Mirra, A. Heyman, D. McKeel, S.M. Sumi, B.J. Crain, L.M. Brownlee, F.S. Vogel, J.P. Hughes, G. van Belle, L. Berg, The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease, *Neurology* 41 (1991) 479–486.
- [13] T. Yamada, Y. Tsujioka, J. Taguchi, M. Takahashi, Y. Tsuboi, T. Shimomura, White matter astrocytes produce hepatocyte growth factor activator inhibitor in human brain tissues, *Exp. Neurol.* 153 (1998) 60–64.
- [14] V.M. Paralkar, B.S. Weeks, Y.M. Yu, H.K. Kleinman, A.H. Reddi, Recombinant human bone morphogenetic protein 2B stimulates PC12 cell differentiation: potentiation and binding to type IV collagen, *J. Cell Biol.* 119 (1992) 1721–1728.
- [15] E. Shishido, M. Takeichi, A. Nose, *Drosophila* synapse formation: regulation by transmembrane protein with Leu-rich repeats, *CAPRICIOUS*, *Science* 280 (1998) 2118–2121.
- [16] J.A. Howitt, N.J. Clout, E. Hohenester, Binding site for Robo receptors revealed by dissection of the leucine-rich repeat region of Slit, *EMBO J.* 23 (2004) 4406–4412.
- [17] J. Kuja-Panula, M. Kiiltomaki, T. Yamashiro, A. Rouhiainen, H. Rauvala, AMIGO, a transmembrane protein implicated in axon tract development, defines a novel protein family with leucine-rich repeats, *J. Cell Biol.* 160 (2003) 963–973.
- [18] P.A. Reynolds, G.A. Smolen, R.E. Palmer, D. Sgroi, V. Yajnik, W.L. Gerald, D.A. Haber, Identification of a DNA-binding site and transcriptional target for the EWS-WT1(+KTS) oncoprotein, *Genes Dev.* 17 (2003) 2094–2107.
- [19] R.V. Iozzo, The biology of the small leucine-rich proteoglycans. Functional network of interactive proteins, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 18843–18846.
- [20] K. Saito, T. Tanaka, H. Kanda, Y. Ebisuno, D. Izawa, S. Kawamoto, K. Okubo, M. Miyasaka, Gene expression profiling of mucosal addressin cell adhesion molecule-1+ high endothelial venule cells (HEV) and identification of a leucine-rich HEV glycoprotein as a HEV marker, *J. Immunol.* 168 (2002) 1050–1059.
- [21] A.N. Malhas, R.A. Abuknesha, R.G. Price, Interaction of the leucine-rich repeats of polycystin-1 with extracellular matrix proteins: possible role in cell proliferation, *J. Am. Soc. Nephrol.* 13 (2002) 19–26.
- [22] K. Satoh, N. Suzuki, H. Yokota, ADAMTS-4 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) is transcriptionally induced in beta-amyloid treated rat astrocytes, *Neurosci. Lett.* 289 (2000) 177–180.
- [23] A. Lukes, S. Mun-Bryce, M. Lukes, G.A. Rosenberg, Extracellular matrix degradation by metalloproteinases and central nervous system diseases, *Mol. Neurobiol.* 19 (1999) 267–284.
- [24] S. Deb, P.E. Gottschall, Increased production of matrix metalloproteinases in enriched astrocyte and mixed hippocampal cultures treated with beta-amyloid peptides, *J. Neurochem.* 66 (1996) 1641–1647.
- [25] T. Wyss-Coray, J.D. Loike, T.C. Brionne, E. Lu, R. Anankov, F. Yan, S.C. Silverstein, J. Husemann, Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ, *Nat. Med.* 9 (2003) 453–457.

Pentosan polysulphate (PPS)

坪井 義夫 山田 達夫

■ はじめに

2003年1月に、英国にて初めて、ペントサンポリサルフェート Pentosan polysulphate (PPS) の脳室内持続投与方法の手術および治療が変異型 Creutzfeldt-Jakob 病 (vCJD) の19歳男性に行われた¹⁾。この経緯で注目に値するのは、この治療に関する臨床治験が、段階的にこれまでに行われてきたわけではなく、患者の父親が8ヵ月にわたる裁判の結果、勝ち得た新しい治療法であることである²⁾。後述するように PPS の抗プリオン病効果は、培養細胞や、動物実験で注目すべき結果を上げてきた。そしてその結果をもとに、福岡大学でも2001年よりその治療の可能性について倫理委員会における検討や、手術のシミュレーションを重ねてきたのである。この新しいプリオン病の治療の背景にはいうまでもなく、本邦において100例を超えた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と、英国で多発し本邦でも確認された、牛海綿状脳症 (BSE) との関連が確実視されている vCJD の影響が大きく、即戦力のある可能性の同治療の臨床応用が急速に求められた事実がある。

異常型プリオン蛋白とプリオン病

正常プリオン蛋白 (PrP^C) は253アミノ酸蛋白 (分子量は35~36 kDa) で、正常脳において存在している。ヒトでは主に中枢神経系で、少量はリンパ球組織で発現する。PrP^C は、その生理的作用は必ずしも確定的ではないが、銅結合蛋白質としての機能や酸化的ストレスに関与している可能性が報告されている。PrP^C はプリオン蛋白遺伝子 (PRNP) がコードする蛋白であり、転写後に Golgi 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³⁾。

異常プリオン蛋白 (PrP^{Sc}) は、すべての型のプリオン病の病理でみられ、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。PrP^{Sc} は不溶性の蛋白で分解を受けにくい性質を有するが、さらに PrP^{Sc} は感染性を有する可能性が考えられている。事実、接種感染実験において、種を越えての伝播が可能であり、プリオン病は伝播性海綿状脳症 transmissible spongiform encephalopathies (TSE) とも呼ばれる。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。その理由は PrP^{Sc} の感染後に、正常の PrP^C 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} へと構造変化が生じて、病的蓄積を生じる機序が考えられている⁴⁾。

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。

ペントサンポリサルフェート (PPS) について

PPS は硫酸化多糖で、ヘパリンに構造が似ている。これまでにその抗凝固作用や抗炎症作用から、海外で間質性膀胱炎や関節炎の治療に用いられてきた。経口、筋肉内投与、静脈内投与のいずれも可能であるが、髄腔内投与の報告はない。静脈内に投与された PPS の半減期は1 mg, 10 mg, 100 mg でそれぞれ7分, 21分, 55分とされている。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 は脱硫酸化を受けて、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%)⁵⁾。経口で投与された場合、4時間もすると膀胱において認められる。膀胱炎などに対する抗炎症作用が認められるが、代謝物質が有する作用と考えられる。副作用は少なく、抗凝固療法として静脈内投与した場合、ヘパリンと同様に血小板

つばい よしお 福岡大学助教授/内科学第五(神経内科)
やまだ たつお 同 教授

図1におけるペントサンポリサルフェート(PPS)脳室内持続投与法の症例(Ramovら^{7,8)}より

No.	Age	Gender	Diagnosis	Survival after TX. (M)	Maximum PPS dose($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)
1	17	M	vCJD	23	11
2	19	M	sCJD	10	11
3	12	F	vCJD	13	11
4	15	M	vCJD	9	11
5	34	F	GSS	10	11
6	32	F	GSS	3	11
7	37	M	Iatrogenic CJD	6	110
8	27	F	Iatrogenic CJD	9	110
9	39	F	vCJD	4 (died)	110
10	44	M	GSS	4	110
11	34	M	Iatrogenic CJD	1	110
12	39	F	GSS	—	110
13	66	F	sCJD	—	110

減少をきたすことが知られている。中枢神経に対する PPS の作用はほとんどなく、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。PPS はほとんど血液脳関門を通過しない。脳室内投与を行った場合に、PPS が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 とプリオン病

Doh-ura ら⁶⁾は脳内感染させたマウスに対して PPS の脳内持続投与の実験系を作成した。感染後 10 日目および 35 日目に、PPS の 4 週間連続で脳室内投与を行った。この実験系で使用された薬物は PPS の他キナクリン、アンホテリシン B などであった。

PPS はアンホテリシン B などの他の薬剤より際立った発症抑制効果を示した。10 日目に投与を開始した場合 173%、35 日目に開始した場合で 93% の抑制効果を示した。さらにヒトプリオン病の治療を想定して、発病後に投与を開始した実験では、延命効果が確認され、その最も有効な投与量は $230 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ であった。これらの結果から PPS の抗プリオン病効果は、投与開始が早いほど発症抑制効果は強力であることが判明した。マウス脳の免疫組織学的検討や Western blot 法でも、PPS を投与した脳への PrP^{Sc}蓄積は著明に抑制されていた。また $230 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 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 $230 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ までの投与量ではいかなる副作用も示さなかった。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^{7,8)}。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。

ペントサンポリサルフェート脳室内持続投与療法

これまでに英国を中心に 13 例の治療が行われてきた(表)。福岡大学では 2004 年の 11 月に 1 例目の治療が開始されている。ここでは福岡大学で作成した治療プロトコルの概略を説明する⁹⁾。

- (1) 診断： 病歴、既往歴、家族歴を詳細にとり、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)、および遺伝学的検査(遺伝子変異の有無、遺伝子多型)などから WHO 診断基準により診断と治療前評価を行う。
- (2) インフォームドコンセント： 同意書の取得。
- (3) 手術： 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(図 1)。脳室チューブは前頭部から耳介後方を通して右側頸部から右前胸部、上腹部まで誘導。臍の高さで右腹部皮下に埋め込み持続注入ポンプに接続する。埋め込み型持続注入ポンプは Archimedes (20 ml reservoir, Flow rate 0.5 ml/24 h, Codman Inc., Germany) を使用している(図 2)。
- (4) PPS 注入： 留置術直後、第 7 病日に頭部 CT scan にて出血等の合併症の有無をチェックする(図 3)。術後 8 日目より PPS 投与を埋め込み型ポンプから低濃度で脳

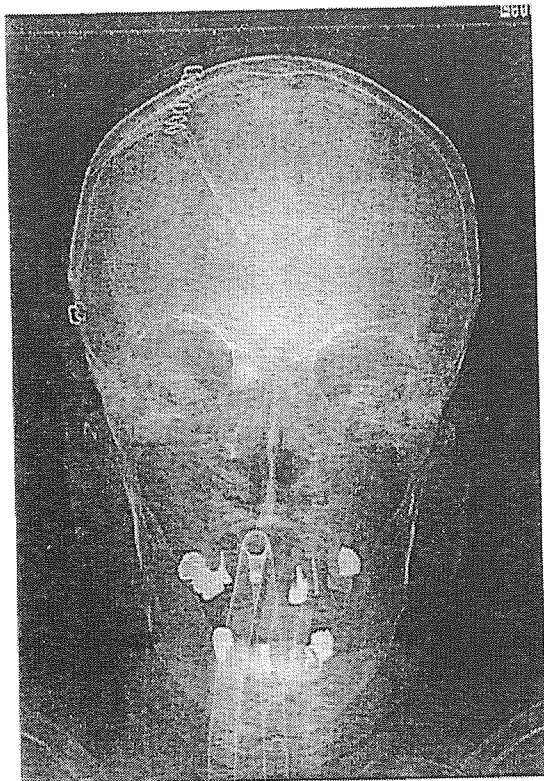


図 1 脳室カテーテル

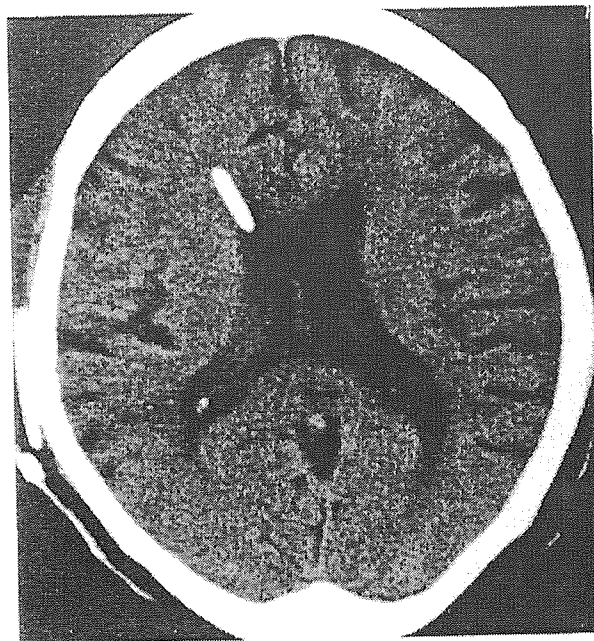


図 3 脳室内カテーテルおよび持続注入ポンプ埋め込み術後7日目の頭部CT

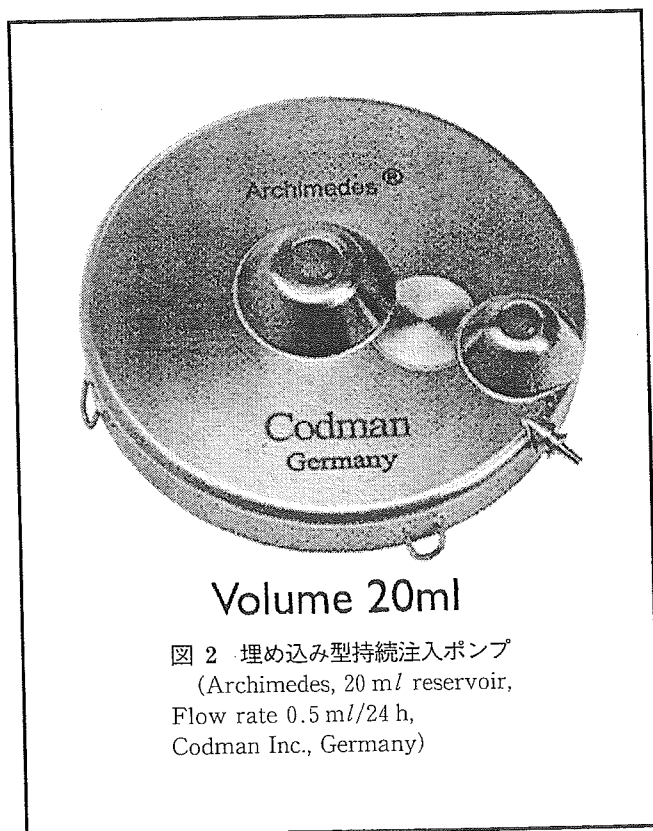


図 2 埋め込み型持続注入ポンプ
(Archimedes, 20 ml reservoir,
Flow rate 0.5 ml/24 h,
Codman Inc., Germany)

室内持続投与を開始する。その後、副作用がなければ漸増し維持量に到達させる。現在、福岡大学内では $60 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ を維持量としている。その後、4週間毎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創部の安定とともに回復し、生活の制限は必要がない。1例目は治療開始ほぼ1年になるが、明らかな臨床的改善は示していない。脳波上もほぼ変化を示していない。一方で、血算、生化学、凝固検査、頭部CTで治療に伴う副作用は認められない。おそらく脳内に拡散し、細胞内への取りこみが飽和した状態で血中に移行することから、全身性の作用は少ないと考えられる。

ペントサンポリサルフェート脳室内持続投与療法 の今後

至適維持量の設定はこれまでのところ動物実験の結果を参考に行っているが、まだ検討の余地がある。すなわち動物実験にて、感染後期にPPSの脳室内持続投与を行ったマウスモデルでは、至適治療濃度は $230 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ であった。この濃度では明らかな副作用は出現しておらず、一応これらの実験結果をもとに投与量を決めてきた。現在、英国ではその約半分量の $110 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ を標準維持量としている¹⁰⁾。これまでPPS濃度をあげたことによる副作用の

報告はない。また至適治療濃度の決定に際して、我々は髄液中あるいは血中のPPS濃度を測定することが、その薬理動態から考え、有用と思われるので現在濃度測定系を検討している。

プリオン病は、その臨床症状が出現したときにはすでに脳内には多くのPrP^{Sc}の沈着が認められ、神経細胞の減少などの病理がすでにかなり進行していることが予想される。理想的には発症前、すなわちPrP^{Sc}の蓄積がまだ脳機能障害をお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。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。髄液所見、MRIの拡散強調画像の進歩などから、早期患者の診断精度が上がっているが、今後も早期CJD診断の感受性を高める必要がある。

文献

- 1) Todd NV, Morrow J, Doh-ura K, et al. Cerebroventricular infusion of pentosan polysulphate in human variant Creutzfeldt-Jakob disease. *J Infect Dis.* 2005; 50: 394-6.
- 2) Giles J. Rapid drug trial offers hope to CJD patients. *Nature.* 2003; 426: 487.
- 3) Prusiner SB. Biology and genetics of prion diseases. *Annu Rev Microbiol.* 1994; 48: 655-86.
- 4) Harris DA. Biosynthesis and cellular processing of the prion protein. *Adv Protein Chem.* 2001; 57: 203-28.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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方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. p. 8-9.
- 10) 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.

神経科学界ニュース

ICS 2006 開催のお知らせ

期 日 2006年11月27日(月)~12月1日(金)
会 場 Christchurch, New Zealand
学会会長 Prof. Ted Arnold
抄録締切 4月1日
航空便 Air New Zealand & Star Alliance
飛行ルート Christchurch/Aucklandへ直行便有り

出発地/所要時間 成田, 大阪, 名古屋/11時間
詳細情報 <http://ics2006.co.nz/>
学会の特徴 1. 医学水準の高い国際尿禁制学会
2. 快適な飛行計画(時差は+4時間)
3. 4500万匹の羊と大自然が歓迎

Quinacrine

坪井 義夫 田中 美紀 山田 達夫

■ はじめに

伝染性海綿状脳症として知られているプリオン病は、いまだに進行性、致死性の疾患であり例外的に長い経過をとる病型はあるものの、診断から数週間から数ヵ月で無動無言に陥る。病型は大きく分けて、頻度の最も多い孤発性、プリオン遺伝子に変異を有する遺伝性(家族性)、そして感染性の3つに分類される。近年話題のBSEからの伝染が疑われるいわゆる変異型Creutzfeldt-Jakob病(vCJD)、あるいは硬膜移植などにより感染した医原性のCJDは感染性プリオン病に含まれる¹⁾。臨床病型としてヒトプリオン病は、孤発性あるいは家族性CJD、Gerstmann-Sträussler-Scheinker(GSS)症候群、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。対症療法以外の治療法はまったく確立していない。

プリオン病の3つの病型は病態機序が異なる可能性が高いが、あらゆる病型において共通して認められるのがプリオン蛋白の代謝異常である。正常脳細胞にも存在する正常型プリオン蛋白(PrP^C)が、何らかの原因で蛋白高次構造の変化をおこし、病原性を持つプロテアーゼ抵抗性の感染性プリオン蛋白(PrP^{Sc})となり、それらが主に中枢神経へ蓄積することによって、進行性の脳障害をきたす機序が考えられている²⁾。したがって近年におけるプリオンの治療開発は、このPrP^{Sc}の抑制にターゲットが絞られている。

近年、英国で150例以上の発生を認めたvCJDおよび、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は、どちらも人類史上、古くから存在した疾患ではなく、人為的な行為の結果作られた疾患man-made diseaseであり、若年者で多発したことから、即戦的治療への期待が高まった。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が、この中でキナクリンがなぜ注目を浴びたかについて、また治療研究の概略と、今後の課題について述べる。

■ キナクリン quinacrine の抗プリオン効果と治療への応用

抗マalaria薬であるキナクリンや抗精神病薬であるクロルプロマジン³⁾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^{3,4)}ことが示された。さらにキナクリンはマalariaに対する治療薬として60年以上の歴史があり、一方で、プリオン病の治療はこれまでに効果を期待し得る治療が皆無であったという背景、さらに経口投与に血液脳関門の通過も良好であるという利点などからキニーネquinineと共に臨床応用されるに至った。本稿では、キナクリン治療の本邦および海外での実施状況、ならびにCJD治療の今後の展望について、最近の知見を交えて概説する。

■ 本邦のキナクリン・キニーネ治療の現状

研究の詳細は2003年12月、厚生労働科学研究費の補助を得て施行された治療研究班の一環として報告された「クロイツフェルト・ヤコブ病患者におけるキナクリン治療の効果と安全性に関する報告書」に記載されている。ここではその内容をもとに、本邦でプリオン病に対して行われたキナクリン治療研究を概説する^{5,6)}。

■ 対象と方法

対象は孤発性CJD 22例、医原性(すべて硬膜移植後発症)CJD 5例、および遺伝性プリオン病4例の計31症例に行った。使用薬剤は、研究試薬のキナクリン2塩酸(C₂₃H₃₀N₁₀O₂ · 2HCl · H₂O)を、1カプセル100mgに製剤化したものが用いられた。1日量は300mgとし、経口もしくは経管にて1日3回の分割投与とした。副作用が出現した場合を除いて投与は連日行われ、12週間で投与完了とした。後述する副作用が出現した場合は投与を中断または中止とした。

効果判定のパラメーターとして、各症例の診断、年齢、性、発症から治療開始までの期間、治療開始時の認知機能レベル(レベル1:自発開眼、運動を認める、レベル2:聴覚・視覚刺激に追視、驚愕反応を認める、レベル3:無動無

つばい よしお 福岡大学助教授/内科学第五(神経内科)

たなか みき 福岡大学/内科学第五(神経内科)

やまだ たつお 同 教授

0289-0585/06/¥500/論文/JCLS

表1 プリオン病31症例に対するキナクリン治療の効果(加齢性22例、医原性5例、遺伝性4例)

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=12)	3：9	61.0±9	13.6±16.2	9	3	3.3±3.5
なし(N=19)	7：12	62.0±10.5	9.0±7.3	4	15	0
p値	ns	ns	ns	<0.05		—

ns：有意差なし

言)などの臨床データを用いた。本疾患の性質上、臨床症状を客観的な数値に置き換え、経過を追うことが困難であったため、治療効果は症状の安定化、あるいは臨床症状の観察から何らかの変化、改善をもって治療効果ありと判定した。具体的には、開眼時間の延長、痛みや光などの刺激に対する反応性の上昇、発語の出現、eye contact や笑顔の表出などに見られる意志疎通性の上昇、自発運動の増加や反射性ミオクローヌスの減少などである。これらは非常に主観的な評価と捉えられるかもしれないが、観察者の臨床的印象も、十分な評価の対象となると考えられた。

■ 結果

対象症例31例中、臨床的に効果が認められたのは12例(38.7%)であった。病型別の有効率は、それぞれ孤発性CJDが9例(40.9%)、医原性CJDが2例(40%)、遺伝性CJDが1例(25%)であり、遺伝性CJDの有効率が最も低かった。効果発現を規定する因子についてそれぞれの臨床データについて検討した結果、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見られた。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12例では、1例(8%)にしか確かな変化は認められなかった。治療前の認知機能レベルが良好であるほど有効率が高かった。一方、無動無言の状態から何らかの反応が蘇る例はほとんどない。治療効果は主に刺激への反応性や自発運動の増加として現れた。ただし、12例中2例において、客観的結果として脳波検査においてPSDの一過性消失および基礎波の再出現が認められた。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。本治療はプリオン病において初めての「効果」を示した治療法であったが、残念ながらその効果は一過性であった。副作用によってキナクリン治療を中止せざるを得なかった場合に限らず、プロトコル通り12週間投与を行った例も含め、効果を認めた全症例において、平均2~4週間でその効果は消失した。その後の経過は治療の継続にもかかわらず

治療前の状態に戻り、さらに進行、悪化した。脳波所見も同様であり、経過と共に治療前のPSDを認める脳波に戻った。これらの一過性の臨床的效果はin vitroで示された抗プリオン作用である可能性もあるが、キナクリンの薬理作用の一つである中枢神経刺激作用の発現に過ぎなかった可能性も否定できない。キナクリン治療を行った症例の内訳を表1に示す。

■ 副作用の分析

キナクリン治療の完了症例数と中止症例数、キナクリン治療中止の原因を表2に示す。治療中止および中断の基準は、痙攣の出現、骨髄抑制(白血球数<2000/ μ lまたは顆粒球数<1000/ μ l、血小板数<50000/ μ l、Hb<8.0 g/dl)、高度肝機能障害(AST, ALT>正常上限の5倍)、感染症、電解質異常、消化管症状の出現時とした。12週間のプロトコルを完了したのは、31例中10例(32.2%)にとどまった。中止の主な理由は肝機能障害の出現であり、中止症例21例のうち16例(76.1%)を占めた。しかしプロトコルを終了した10例中にも肝機能障害(トランスアミナーゼの上昇)を認めた症例が8例あるため、全症例31例中24例(77.4%)に何らかの肝機能障害を認めたことになり、キナクリン治療の最も頻度の高い副作用と考えられた。それ以外の副作用としては、発熱、溶血性貧血、偽膜性大腸炎、頸部の水泡性皮疹、誤嚥(死亡)をそれぞれ1例ずつに認めたが、誤嚥による死亡例以外の全症例において、キナクリン中止後、副作用症状は改善した。

海外でのキナクリン治療の現状

キナクリン治療の可能性を最初に伝えたのは、2001年、2名のvCJDの患者にキナクリン治療を開始して一時的に言語機能の改善が得られたとの臨床報告であった⁷⁾。当時、CJDに対する治療法は発見されておらず、in vitroの研究結果、少なくとも動物実験の効果などの検討が必ずしも十分でない状況下ではあったものの、キナクリン治療は本邦をはじめ複数の施設であらゆる型のプリオン病に対して行われた。そのうち、フランスで2001年8月~2002年末の期間に実施された32例に対するキナクリン治療の結果が、2004年Haikらより報告された⁸⁾。これまでに少数例での

表2. プリオン病31症例におけるキナクリン治療の副作用

完了		10例
中止		21例
中止原因	肝機能障害	16例
	発熱	1例
	溶血性貧血	1例
	偽膜性大腸炎	1例
	皮疹	1例
	誤嚥	1例

報告が散見されたがこの治療についての結論は出しえなかった⁹⁻¹¹⁾。しかし、この報告はキナクリンの抗プリオン病効果に対する疑問を投げかける結果となった。この論文の内容を概説する。

同治療の対象は、WHOのclinically probable CJDの診断基準を満たした、孤発性CJD 30例とvCJD 2例の計32例である。キナクリン投与は初日1日量1000mgを5分割、6時間毎に経口投与し、後は本邦同様1日量300mgを3分割投与した。同報告は臨床的效果をRankin Scaleにて評価した。またキナクリン治療を行った症例の剖検例を、非治療群のものと病理学的に、半定量的な評価、比較をした。またキナクリン治療群の孤発性CJD 30例のうち、Codon 129遺伝子多型を検討した27例をMethionine/Methionine(MM)型、Methionine/Valine(MV)型、Valine/Valine(VV)型の3型に分類し、同様に分類した未治療群(計125例)と生存期間を比較した。この方法は評価法の妥当性は議論があるものの、この疾患の治療評価がいかに困難であるかを考えると理解ができる。結果として、治療後のRankin Scaleは全例で変化がないか、もしくは悪化を示した。本邦の研究のように個々の臨床的变化の詳細な記述はなされていない。剖検脳の評価では、脳の10カ所にてspongiform change, gliosis, neuronal lossの3項目について、それぞれ半定量化し、その合計点数にて脳細胞障害を評価した。比較対象として、1994年以降、同施設の孤発性CJDの未治療群132例の剖検脳を同様に評価した。キナクリン治療群の脳細胞障害は若干対象群より高度であった。さらにCodon 129遺伝子多型による分類でも、キナクリン治療群のMM型とMV型において、非治療群より若干生存期間が長かったのみであった。以上より同報告では、キナクリン治療の効果に対して否定的な見解であった。出現した副作用で、最も多いものは6例に発症した肝機能障害であった。その他皮疹を2例に、消化管障害と白血球減少をそれぞれ1例に認めているが、本邦における報告と大差はない。

キナクリン治療の今後の展望

プリオン病に対するキナクリン治療は、本邦、欧州の報

告を合わせて、効果が不明で、副作用出現の頻度が高い、といった期待されただけに残念な結論になった。キナクリン治療が単独で、これまでと同じ方法では結果は同様であると思われる。しかし、本邦で施行されたキナクリン治療の約4割に見られた一過性の症状の改善は何によるものか。すなわちin vitroで認められた抗プリオン蛋白作用がin vivoでも認められた可能性があるのかどうかはまだ課題である。十分に血液脳関門を通過したかどうかのdrug deliveryの問題もある。さらに副作用の肝障害もまた問題であり、副作用軽減や中枢神経への移行を含めたプロトコルの再考の可能性がある。英国の臨床試験機関であるMRC(Medical Research Council)は、2004年6月よりThe PRION-1 trialと呼ばれるキナクリンを用いた新たな臨床試験を開始した¹²⁾。The PRION-1 trialは、2004年6月1日~2006年12月1日の2年半の間に目標患者数を160例とし、CJD患者の病型は問わず、観察期間は3年間としている。変則ではあるが、対象を1)キナクリン投与群、2)キナクリン非投与群、3)無作為群(24週間後にキナクリン投与もしくは非投与のいずれか)に分けるという、初めてのrandomized controlled trialである。これらの評価を参考に、さらに相互作用を期待した新たな治療研究の発展が期待される。

文 献

- 1) Prusiner SB. Biology and genetics of prion diseases. *Annu Rev Microbiol.* 1994; 48: 655-86.
- 2) Harris DA. Biosynthesis and cellular processing of the prion protein. *Adv Protein Chem.* 2001; 57: 203-28.
- 3) Doh-ura K, Iwaki T, Caughey B. Lysosomotropic agents and cysteine protease inhibitors inhibit scrapie-associated prion protein accumulation. *J Virol.* 2000; 74: 4894-7.
- 4) Korth C, May BC, Cohen FE, et al. Acridine and phenothiazine derivatives as pharmacotherapeutics for prion disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98: 9836-41.
- 5) 山田達夫, 坪井義夫, 中島雅士, 他. 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年度分担研究報告書。p.11-22.
- 6) 山田達夫, 坪井義夫, 中島雅士, 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。p.113-24.
- 7) Josefson D. Drugs for malaria and psychosis may offer hope to people with CJD. *BMJ.* 2001; 323: 416.
- 8) Haik S, Brandel JP, Salomon D, et al. Compassionate use of quinacrine in Creutzfeldt-Jakob disease fails to show significant effects. *Neurology.* 2004; 63: 2413-5.
- 9) Scoazec JY, Krolak-Salmon P, Cases O, et al. Quinacrine-induced cytolytic hepatitis in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol.* 2003; 53: 546-7.
- 10) Kobayashi Y, Hirata K, Tanaka H, et al. Quinacrine administration to a patient with Creutzfeldt-Jakob disease who received a cadaveric dura mater graft—an EEG evaluation. *Rinsho Shinkeigaku.* 2003; 43: 403-8.
- 11) Nakajima M, Yamada T, Kusuhara T, et al. Results of quinacrine administration to patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2004; 17: 158-63.
- 12) <http://www.ctu.mrc.ac.uk/studies/cjd.asp>

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)

吉田香織¹⁾、中荘ひとみ¹⁾、遠嶋由紀¹⁾、小林誠子¹⁾、
糸永嘉子¹⁾、吉田ユリ子¹⁾、杉村美佳²⁾、中野正剛²⁾、
山田達夫 (文責・写真)²⁾

1) 大分県宇佐市安心院支所健康福祉課
2) 福岡大学医学部第五内科

連絡先：福岡市城南区七隈7-45-1
福岡大学医学部第五内科 山田達夫
電 話 092-741-5602, FAX 092-865-7900
e-mail : tyamada@fukuoka-u.ac.jp



りわけ独居高齢者に向けて、整備して
いく必要がある。

われわれが都市在住独居高齢者を対
象に行った研究では、独居者の日常生
活動作 (ADL) は比較的保たれ、運
動能力も高く維持されているが、生活
全般の満足度が低く、潜在的に高い割
合でうつ状態がみられた。また大部
市近郊独居者についての研究では、外
出頻度は比較的高く保持されていた。
しかし隣近所には外出できるが、一人
で遠出はしない者は、精神的身体的虚
弱性があり、近隣閉じこもりとも呼べ
る状態で予防的支援の必要性が指摘さ
れた。さらには独居高齢者の生活空
間狭小化が死亡に関連すると報告され
ている。このように様々な視点から
独居高齢者の問題点が取り上げられて
いるが、調べ得た範囲で認知症との関
連での検討はない。

われわれは3年前から大分県宇佐市
安心院町で主として認知症予防の視点
からフィールドワークを実施している

。この研究活動では認知症早期発見
のみならず、その後の治療をも行うた
めの相談業務も取り入れている。その
過程の中から、認知症発症独居高齢者
への早急な取り組みと認知症予防対策
立案の緊急性と重要性を実感した。今
回の研究では安心院町安心院地区独居
高齢者の全皆調査により認知症疑いや
ADL障害とうつを有する住民の頻度
を求め、行政への提言という意味合い
を込めて検討した結果を報告する。

対象

安心院町安心院地区に居住する65歳
以上高齢者のうち独居老人全員の13
9名を対象とし、非独居高齢者312
名を対照群にした。

方法

平成16年度に公民館で、記憶、注意、
言語、視空間認知と類推に着目した設

はじめに

友人・近隣・親族との接触頻度より
地域集団への参加頻度の方が生存率を
高め、地域活動への参加は健康障害や
死亡の低減に関連するという。従って
高齢期には閉じこもることなく、外出
し、社会的刺激を受ける生活習慣が重
要と考えられている。

独居高齢者数は今後益々の増加が予
想されている。独居であるが故に、認
知症の発見が遅れ、さらには独居状態
で認知症になると介護環境の整備によ
り深刻な対応が求められる。物理的に
孤立し、家庭内支援環境を持たない独
居高齢者が最後まで自立した生活を維
持するには行政のみでなく、コミュニ
ティレベルでの対応が要求されるが、
これに対する施策整備は急務である。
特に認知症予防的な意味からも社会全
体で、高齢者の社会参加や生き甲斐を
創出することの可能な社会基盤を、と

問から構成されている集団的認知機能
検査ファイブ・コグ[®]を実施し、同時に手
段的ADL[®] (IADL: 電話使用、買
物、会の世話係、交通手段、薬の管理、
家計管理、申告書作成の7項目)と
Geriatric Depression Scale (GDS)[®]
を用いて評価を行った。公民館に来館
できなかった独居者には訪問を行い、
そこでの認知機能検査にはMMSE[®]を
用いた。統計学的検定にはt検定と
度数検定としてKolmogorov-Smirnovテ
ストを用いた。この研究は福岡大学医
学部倫理委員会の承認を得ている。

結果

表1に対象者の背景と検査結果の平
均値 (標準偏差) と検定結果を示す。
平成16年度に独居と登録されていた1
39名のうち、113名がこの研究に
参加した (80%)。平均年齢は74.5歳
で、男性21名、女性86名であった。非
参加者は26名で検査拒否や入院中であ

表1. 対象者の背景、各検査の平均値 (標準偏差) と統計学的解析

	独居者	非独居者	有意差
年齢(才)	74.5(6.4) n=113	74.3(6.3) n=312	
教育歴(年)	9.8(1.7) n=113	10.4(2.1) n=312	
ファイブ・コグ	1.1(1.15) n=79	1.1(1.13) n=312	
GDS	4.6(4.0) n=112	3.3(2.6) n=311	p<0.01
IADL	5.2(1.6) n=111	5.2(1.8) n=311	

ることが主な理由であった。非独居群は平均年齢74.3歳で男性105名、女性207名であった。教育歴は独居群は9.8年、非独居群が10.4年で有意差はなかった。

ファイブ・コグの成績

(表2、3、図1)

Age-associated Cognitive Decline

表2. 独居者のファイブ・コグ成績 (79名)

AACD数	男	女	計
0	6	39	45
1	1	11	12
2	1	8	9
3	0	7	7
4	1	5	6
5	0	0	0
計	9	70	79

表3. 非独居者のファイブ・コグ成績 (312名)

AACD数	男	女	計
0	45	92	137
1	33	49	82
2	11	40	51
3	8	15	23
4	4	8	12
5	4	3	7
計	105	207	312

(AACD) 0でない正常独居者は45名(男6、女39)であり、約57%であった。Mild Cognitive Impairment (MCI) を含む軽度の認知障害を疑わせる者(AACD数が1から2)は21名(27%)で、AACD数3以上(認知症が強く疑われる)は13人(16%)であった。非独居者群では正常者が137名(44%)、軽度認知障害が133名(44%)で、認知症疑いは42名(13%)

図1. 両群でのファイブ・コグの結果(A、B)とMMSEの得点を加味した結果(C)

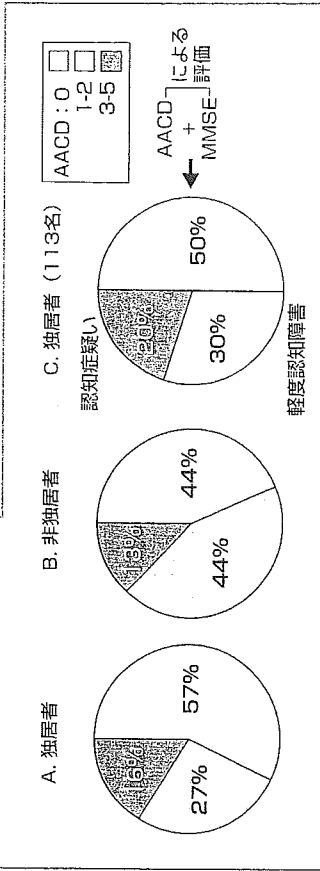


表4. 独居者のMMSE値 (34名)

点数	男	女	計
0-19	1	1	2
20-23	2	5	7
24-27	5	8	13
28-30	3	9	12
計	11	23	34

表5. 独居者のIADL値 (111名)

点数	男	女	計
0-3	1	18	19
4-6	10	47	57
7	8	27	35
計	19	92	111

表6. 非独居者のIADL値 (312名)

点数	男	女	計
0-3	10	50	60
4-6	37	101	138
7	58	56	114
計	105	207	312

表7. 独居者のGDS値 (112名)

点数	男	女	計
0-4(正常)	11	56	67
5-9(5つ疑)	6	21	27
10-15(3つ)	2	16	18
計	19	93	112

表8. 非独居者のGDS値 (312名)

点数	男	女	計
0-4	80	148	228
5-9	21	53	74
10-15	4	8	10
計	105	207	312

であった。度数検定では両群間には有意差は認めず、独居でも非独居でも認知障害の割合には差がないことが示された。

独居者におけるMMSEの成績

(表4)

正常は12名で、軽度障害が13名で認知症疑いが9名に認められた。

ファイブコグとMMSEの独居者群

の成績を合わせると113名中正常は57名(50%)、軽度障害は34名(30%)、認知症疑いが22名(20%)であった(図1)。実際には調査できなかった26名中7名が認知症に罹患しているとの報告もあり、これを加えると認知症疑いは29名(24%)になる。

IADL値

7項目のIADLについては、独居

者群の111人中35名(32%)は自立(7点)しており、57名(55%)が軽度障害(4-6点)があり、19名(13%)は高度に日常生活が障害されていた(3-0点)(表5)。非独居者群においては自立が114名(37%)、軽度障害が138名(44%)で高度障害が60名(19%)であった(表6)。両群間の平均値には有意差はなかった。またIADLの障害の程度ごとの度数に関して

も両群間で有意差を認めなかった。

GDS値

独居者の112名のうち、うつでない者は67名(59%)で、うつの疑いは27名(24%)、うつは18名(17%)であった(表7)。一方非独居者では、312名中それぞれ228名(70%)、74名(24%)と10名(3%)であった(表8)。うつは明らかに独居群に多く、度数検定でも同様の結果であった。また認知症疑いではうつが2名、軽度認知障害では9名で認知障害がない者では7名がうつであった。

考察

この検討の結果、安心院地区の調査に協力していただいた多くの独居高齢者は非独居者と比べて、認知機能やIADLでは差はなく、一方でうつの頻度は高かった。この結果はわれわれが4年前に福岡市で行った独居高齢者調

査と一致する。今回の認知症に関する調査は一次調査のみで、詳細な二次調査での検討がなされていないため、正確な頻度とはいいがたい。またうつは認知症疑い例のうち2名に認められ、うつが認知症類似状態を引き起こしている可能性もある。

両群とも100%の住民調査ではないため明確には指摘できないが、非独居者群との比較を調査不参加例まで含めたとすると独居者群で24%に対し、非独居では13%と明らかに認知症疑いの割合が独居群で高頻度であり、独居という環境が認知症を生じやすいという可能性も考えられる。この点と関連して注目すべきは、独居群では日常生活遂行能力のみでなく認知機能も十分保たれている元気高齢者が多い一方で、中間的な軽度の認知障害者が少ない傾向がみられたことである。この事実は、軽度障害から明らかな認知障害への移行を、独居環境が早めた結果を意味しているのかもしれない。

うつはアルツハイマー病の危険因子であり、非独居群に比べて明らかに高頻度である独居者にみられたうつやうつ状態に薬物療法などで介入していく必要性和重要性が改めて認識された。独居者は家庭内支援がないために身体的な障害で容易に生活空間の狭小化がもたらせられ、対人的接触頻度はより少なくなり、このような面からも認知障害を引き起こしやすくと考えられる¹⁰⁾。

安心院町では認知症調査研究が3年前から始まり、AD前状態も考えられるMCI状態の65歳以上住民の頻度は約5%であった。すなわち約3000人いる高齢者のうち150人が記憶障害を有するMCIと推定される。問題は認知症への移行阻止であり、福岡大学第五内科と町の健康福祉科スタッフが介入する健康クラブ活動が25名の参加者で、1年前から始まった。内容は認知リハビリテーション¹¹⁾と運動療法であり、その成果は別誌で報告する。

しかしながら軽度認知障害を有する独居高齢者の参加が得られず、より一層の情宣活動が求められている。地域住民の追跡調査を行ったNunagaiらは¹²⁾地区組織の会員であったり、協会の行事に参加したり、老人センターを訪問するなどの社会統合の高い行動をすることが認知機能低下を予防できる可能性を示している。また渡辺らは¹³⁾社会交流のないことが要介

護移行により強く関連すると報告した。われわれが提唱している健康クラブ活動は、認知症患者が通所リハビリとして行っているような受け身の活動でなく、参加者一人ひとりの企画力の集積によって創造されたもので、かつ社会的意味合いを保持した活動である。独居高齢者にも積極的に参加しやすい仕組み作りが今

後必要であろうし、認知症予防に貢献し、それらは行政・住民・大学一体と なって作り上げられるべきだろう。

まとめ

安心院町独居高齢者は全般的にうつ の傾向が強く、統計学的には有意ではないが、認知症疑いの割合も高い傾向

にあった。認知症予防の観点から積極 的なうつの治療と見守りと予防介入事 業(安心院町での健康クラブへの参加 など)が求められている。

本研究は厚生労働科学効果的医療技 術の確立推進臨床研究事業の助成によ って行った。

参考文献

- 1) 杉澤秀博、高齢者における社会的統合と生命予後の関係、日本公衛誌、1994;41:131-139.
- 2) 中居龍平、都市在住独居高齢者の生活機能の評価、厚生科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業)平成13年度総括・分担報告書、2002;51-56.
- 3) 渡辺美鈴 他、ひとりで遠出できなくなる高齢者の背景要因：大都市近郊に独居する自立前期高齢者における調査、日本公衛誌、2004;51:854-861.
- 4) 安村誠司、閉じこもり高齢者のアスクリーニング尺度の作成と介入プログラムの開発。厚生労働科学研究費補助金 長寿科学総合研究事業研究報告書、2003;5-12.
- 5) 杉村美佳 他、痴呆の早期発見・早期予防を目的にした安心院プロジェクト、地域保健、2004;35:43-51.
- 6) 根本貴貴 他、軽度認知機能障害の脳血流および形態変化—茨城県利根町における横断研究—、Dementia Japan, 2004;18:263-273.
- 7) Lawton LP, the Philadelphia Geriatric Center Morale Scale-A revision, J Gerontol, 1975;1:85-89.
- 8) Yasavage JA, Geriatric Depression Scale, Psychopharmacol Bull, 1988;24:709-711.
- 9) Levy R, Aging-associated cognitive decline. Working Party of the International Psychogeriatric Association in collaboration with the World Health Organization. Int Psychogeriatr, 1994;6:63-68.
- 10) Petersen RC et al., Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome, Arch Neurol, 1999;56:303-308.
- 11) Flatigioni L et al., Influence of social network on occurrence of dementia: a community-based longitudinal study. Lancet, 2000;355:1315-1319.
- 12) 矢野直美、認知リハビリテーションによるアルツハイマー病の予防、Cognition and Dementia, 2003;2:52-57.
- 13) Zunzunegui MV et al., Social networks, social integration, and social engagement determine cognitive decline in community-dwelling Spanish older adults, J Gerontol: Social Science, 2003;58B:s93-s100.
- 14) 渡辺美鈴 他、自立生活の在宅高齢者の閉じこもりによる要介護の発生状況について、日老医誌、2005;42:99-105.

特集 プリオン病 update

プリオン病の治療*

—キナクリン・キニーネ治療—

● 田中美紀** / 坪井義夫** / 山田達夫**

Key Words : quinacrine, quinine, The PRION-1 trial, prion disease, Creutzfeldt-Jakob disease

はじめに

Creutzfeldt-Jakob病(CJD)に代表されるプリオン病は、いったん発症すると進行性で致死的な神経変性疾患群であり、対症療法以外に有効な治療法はまったく確立されていない。プリオン病はその原因別分類から、①原因不明の孤発性CJD (sporadic CJD : sCJD)、②感染性CJD ; 牛海綿状脳症 (bovine spongiform encephalopathy : BSE) の関与が疑われる変異型CJD (variant CJD : vCJD)、汚染硬膜移植など、医療行為が原因とされる医原性CJDを含む、③遺伝性プリオン病 ; 家族性CJD, Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) 症候群, 致死性家族性不眠症 (fatal familial insomnia : FFI)、に分類される。発症機序としては、正常脳細胞にも存在する正常型プリオン蛋白 (PrP^C) が、なんらかの原因で蛋白高次構造の変化を起こし、病原性をもつプロテアーゼ抵抗性の感染型プリオン蛋白 (PrP^{Sc}) となり、それらが中枢神経へ蓄積することによって、もしくはPrP^{Sc}が正常脳細胞に感染することによって生じる機序がもっとも考えられている。このプリオン蛋白病原説は、1982年にPrusinerらが本疾患の原因物質としての感染性蛋白質の概念を発表して以来、一般に考えられている¹⁾。これまでに

PrP^CからPrP^{Sc}への構造変化もしくは蓄積を阻害する化学物質を検索するため、さまざまな基礎研究が成されてきた。さらに、1986年にBSEが英国で初めて確認され、1996年にvCJDの発生が報告されてからは、世界的な問題として早急な治療法の発見が急務と考えられ、その研究速度は加速した。その結果、現在までに抗プリオン効果を有する数十種類の化合物が報告されている。そのうちキナクリン (quinacrine) は、2000年から2001年にかけて、*in vitro*でPrP^CからPrP^{Sc}への転換やPrP^{Sc}の蓄積を阻害する効果があることが報告された²⁾³⁾。同剤は、当時本疾患への効果を期待し得る治療が皆無であったという点や、長年マラリアの治療薬として使用されてきた歴史から、安全性が確立している薬剤であり、さらに血液脳関門の通過も良好であるという利点から、その類似の作用をもつキニーネ (quinine) とともに臨床応用されるに至った。本稿では、キナクリン・キニーネ治療の本邦および海外での実施状況ならびにCJD治療の今後の展望について、最近の知見を混えて概説する。

本邦のキナクリン治療の実施状況

1. 対象・方法

われわれは2003年12月、厚生労働科学研究費の補助を得て施行されたCJD治療研究の一環として、「クロイツフェルト・ヤコブ病患者における

* Quinacrine treatment for prion disease : Review.

** Miki TANAKA, M.D., 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.

キナクリン治療の効果と安全性に関する報告書⁴⁾にキナクリン治療の結果を発表した。プリオン病患者計31症例に対して実施された治療検討で、病型の内訳は、sCJD22例、医原性(すべて硬膜移植後発症)CJD 5例、遺伝性プリオン病4例である。使用薬剤は、研究試薬のキナクリン2塩酸($C_{23}H_{30}N_3O \cdot 2HCl \cdot H_2O$)を、1カプセル100mgに製剤化したものが用いられた。1日量は300mgとし、経口もしくは経管より1日3回の分割投与とした。投与は連日行われ、12週間で投与完了とした。副作用が出現した場合(後述)、投与を中断または中止した。効果判定のパラメーターとして、各症例の診断、年齢、性、発症から治療開始までの期間、治療開始時の認知機能レベル(レベル1:自発開眼、運動を認める、レベル2:聴覚・視覚刺激に追視、驚愕反応を認める、レベル3:無動性無言)などの臨床データが抽出された。キナクリン効果のメルクマールとしては、本疾患の性質上、なんらかの客観的な数値による評価ではなく、主に個別の神経学的臨床症状を観察し、その改善をもって治療効果ありと判定することとした。具体的には、開眼時間の延長、痛みや光などの刺激に対する反応性の上昇、発語の出現、eye contactや笑顔の表出などにみられる意志疎通性の上昇、自発運動の増加や反射性ミオクローヌスの減少などである。これらは非常に主観的な評価と捉えられるかもしれないが、観察者の臨床的印象も、十分な評価の対象となると考えられた。

2. 結 果

キナクリン治療を行った症例の内訳を表1、効果とその内容を表2、本治療開始時の認知機能レベルとその効果発現との関連を表3に示す。対象症例31例中、臨床的に効果が認められたのは12例(38.7%)であった。病型別の有効率は、それぞれsCJDが9例(40.9%)、医原性CJDが2例(40.0%)、遺伝性プリオン病が1例(25.0%)であり、遺伝性プリオン病の有効率がもっとも低かった。効果発現を規定する因子についてそれぞれの臨床データについて検討した結果、sCJD症例において、治療前の認知機能レベルが良好であるほど有効率が高かった。表2に示すように、治療効果は主に刺激への反応性や自発運動の増

加として現れた。ただし、12例中2例においては、客観的結果として脳波検査においてPSDの消失や基礎波の再出現が認められた。本治療はプリオン病において初めての「効果」を示した治療法であったが、残念ながらその効果は一過性であった。副作用によってキナクリン治療を中止せざるを得なかった症例に限らず、プロトコール通り12週間投与を行った症例も含め、効果を認めた全症例において、平均2~4週間でその効果は消失した。その後の経過は治療を継続していても治療前の状態に戻り、さらに進行、悪化した。脳波所見も同様であり、経過とともに治療前の脳波に戻った。一過性の臨床的效果は*in vitro*で示された抗プリオン作用ではなく、キナクリンの薬理効果の一つである中枢神経刺激作用の発現にすぎなかったのではないかという疑問も残った。

3. キナクリンの副作用

キナクリン治療の完了症例数と中止症例数を図1、キナクリン治療中止の原因を図2に示す。治療中止および中断の基準は、痙攣の出現、骨髄抑制(白血球数 $<2,000/\mu l$ または顆粒球数 $<1,000/\mu l$ 、血小板数 $<50,000/\mu l$ 、 $Hb < 8.0g/dl$)、高度肝機能障害($AST, ALT >$ 正常上限の5倍)、感染症、電解質異常、消化管症状の出現時とした。12週間のプロトコールを完了したのは31例中10例(32.2%)にとどまった。中止の主な理由は肝機能障害の出現であり、中止症例21例のうち16例(76.1%)を占めた。しかし、プロトコールを終了した10例中にも肝機能障害(トランスアミナーゼの上昇)を認めた症例が8例あるため、全症例31例中24例(77.4%)になんらかの肝機能障害を認めたことになり、キナクリン治療のもっとも頻度の高い副作用と考えられた。それ以外の副作用としては、発熱、溶血性貧血、偽膜性大腸炎、頸部の水泡性皮疹と誤嚥(死亡)をそれぞれ1例ずつに認めたが、誤嚥による死亡例以外の全症例において、キナクリン中止後、副作用症状は改善した。

4. キニーネ治療と3剤併用療法

症例数は少ないが、キナクリンと同様の治療効果を期待して、抗マラリア薬であるキニーネも治療に用いられた。sCJD 5例と遺伝性プリオ

表1 キナクリン治療症例のプロフィール(2003年12月時点の集計)

No./性/年齢	診断	発症からの期間 (月)	投与量(mg) 1日量/総量	投与 日数	開始時認知 機能	効果持続 期間(週)	治療中止	転帰
1/F/81	孤発性	4	300/4,800	16	3	-	中止	死亡
2/F/49	孤発性	9	300/23,400	78	2	-	中止	入院中
3/F/67	医原性	6	300/6,900	23	3	+(4)	中止	入院中
4/F/51	孤発性	2	300/5,700	19	3	-	中止	入院中
5/F/76	孤発性	6	300/24,300	81	3	-	完了	入院中
6/M/65	孤発性	7	300/19,500	65	3	-	中止	入院中
7/M/72	医原性	6	300/15,600	52	3	-	中止	入院中
8/M/76	孤発性	2	300/4,500	15	2	+(1)	中止	死亡
9/M/64	遺伝性 ²⁰⁰	3	300/25,200	84	3	-	完了	入院中
10/F/55	孤発性	5.5	300/600	2	3	-	中止	死亡
11/M/20	医原性	53	300/5,400	18	3	-	中止	入院中
12/M/63	孤発性	4	100/5,400	54	2	+(1)	中止	入院中
13/F/37	医原性	4	300/18,300	61	3	+(4)	中止	入院中
14/F/54	遺伝性 ²⁰⁰	4	300/28,200	94	3	-	完了	死亡
15/F/57	孤発性	25	300/3,000	10	3	-	中止	死亡**
16/F/72	孤発性	16	200-300/30,600	118	3	+(4)	完了	死亡**
17/M/62	孤発性	6	300/13,200	44	3	-	中止	死亡
18/F/64	孤発性	4	300/8,100	27	2	+(1)	中止	入院中
19/F/62	孤発性	4	300/25,200	84	1	+(1)	完了	入院中
20/F/59	遺伝性 ^{102*}	72	300/25,200	84	1	+(2)	完了	入院中
21/M/46	孤発性	11	300/25,800	86	2	+(3)	完了	入院中
22/M/60	孤発性	2.5	300/15,600	52	2	-	中止	入院中
23/F/64	遺伝性 ²⁰⁰	3.5	300/8,400	28	1	-	中止	入院中
24/F/68	孤発性	36	300/23,000	76	2	+(12)	中止	入院中
25/F/66	医原性	5	300/12,800	43	1	-	中止	死亡
26/F/70	孤発性	12.5	300/12,000	40	3	-	中止	入院中
27/F/59	孤発性	3	300/37,500	125	2	+(4)	完了	入院中
28/F/78	孤発性	6	300/24,200	84	3	-	完了	入院中
29/F/59	孤発性	2	300/27,000	90	2	+(2)	完了	入院中
30/M/64	孤発性	2	300/9,000	30	3	-	中止	入院中
31/F/63	孤発性	6	300/14,700	49	3	-	中止	入院中

* : 硬膜移植歴あり, ** : キナクリン投与中の死亡.

(文献⁴⁾より引用)

ン病1例の計6例に対し、1日量1.5gをキナクリン治療と同様のプロトコールで投与した。その結果、6例中2例(33%)に発語や刺激反応性の上昇が認められたが、持続期間はいずれも3週間であった。主な副作用は、肝機能障害であり、キナクリン治療とほぼ同様の経過をたどった。また、前述のキナクリン治療の反省点から、変法として、キナクリンの肝障害を予防するためにシメチジン(cimetidine)600mg/dayを、脳内濃度を上昇させるために塩酸ベラパミル(verapamil hydrochloride)120mg/dayを、キナクリン300mg/dayに併用した3剤併用療法を計3例に実施した。そのうち2例は12週間の投与プロトコールを終了したが、残り1例は1カ月後に肝

機能障害を認め中止した。3例とも明らかな臨床改善効果は認められなかった。

海外でのキナクリン治療の実施状況

2001年当時、CJDに対する治療法は皆無であったという事情により、*in vitro*の研究結果が十分に検討されていない状況下において、キナクリン治療は当時の唯一の治療として世界各国で実施された。そのうち、フランスで2001年8月～2002年末の期間に実施されたキナクリン治療の結果が、2004年Haikら⁵⁾より報告された。対象は、WHOのclinically probable CJDの診断基準を満たしたsCJD30例とvCJD2例の計32例である。キナクリン初回量は1,000mg/日(1回200mgを6時間

表2 キナクリン治療の効果とその他の内容

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)
3/F/67	医原性	開眼時間の延長, 発語の増加.	4
8/M/76	孤発性	自発開眼時間の延長. Eye to Eyeコンタクトが可能.	1
12/M/63	孤発性	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.	1
13/F/37	医原性	投与2週後に痛み刺激に検者への視覚注視が出現. 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
16/F/72	孤発性	痛覚刺激にて上肢の動きが出現.	4
18/F/64	孤発性	投与1週後で覚醒状態の改善が見られた.	1
19/F/62	孤発性	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
20/F/59	遺伝性 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
21/M/46	孤発性	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
24/F/68	孤発性	指示動作や挨拶が可能.	12
27/F/59	孤発性	追視, 笑顔が見られた. 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
29/F/59	孤発性	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

(文献⁴⁾より引用)

表3 キナクリン治療開始時の認知機能レベル

診断	治療開始時の認知機能レベル		
	自発語・運動あり: レベル1(有効例)	視覚・聴覚刺激に反応あり: レベル2(有効例)	無動性無言: レベル3(有効例)
孤発性(N=22)	1(1)	9(7)	12(1)
医原性(N=5)	1(0)	0	4(2)
遺伝性(N=4)	2(1)	0	2(0)

(文献⁴⁾より引用)

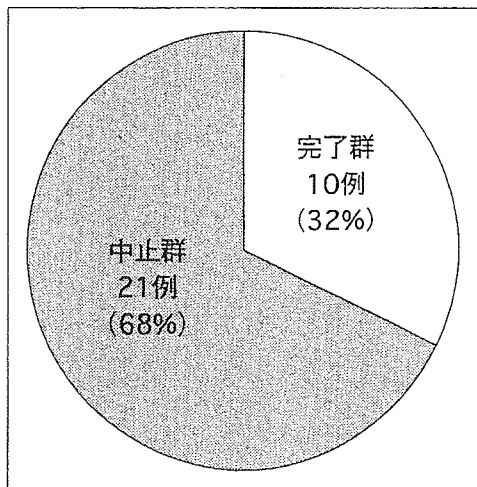


図1 キナクリン治療の完了症例数と中止症例数(文献⁴⁾より引用)

ごとに5回経口投与)とし, その後は本邦同様1
 日量300mgを3分割投与としている. 出現した副
 作用のうちもっとも多いものは6例に発症した
 肝機能障害であった. その他, 皮疹を2例に,
 消化管障害と白血球減少をそれぞれ1例に認め,
 われわれの報告と同様であった. 同報告の特徴
 は, ①臨床的効果をRankin Scoreで評価してい
 る, ②キナクリン治療群と非治療群の脳細胞障
 害を, 死亡後に病理学的に比較している, ③キ
 ナクリン治療群のsCJD30例のうち, Codon129多
 型を検討した計27例をmethionine/methionine
 (MM)型, methionine/valine(MV)型, Valine/
 Valine(VV)型の3群に分けて, 同様に検討した
 未治療群(計95例)と生存期間を比較している,

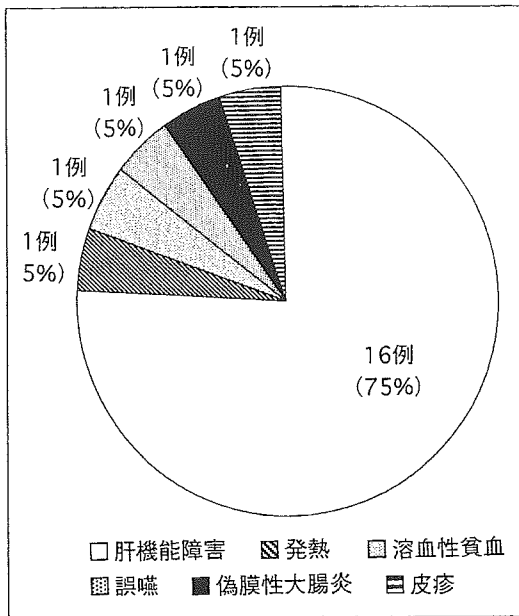


図2 キナクリン治療中止の原因
(文献⁴⁾より引用)

という3点があげられる。①に関しては、治療後はほとんどの例で変化なし、もしくはRankin Scoreで1ランク以上の悪化を示したと評価している。臨床的变化の詳細な記述はなされていない。また、②に関しては、キナクリン治療群の剖検脳10カ所で、①spongiform change, ②astrogliosis, ③neuronal lossの3項目をそれぞれ点数化し、その合計点数で脳細胞障害を評価している。比較対象として、1994年以降、同施設におけるsCJDの未治療群132例の剖検脳を同様に点数化して用いており、その結果、②では、全般的にキナクリン治療の細胞保護効果は認められない結果となった。また、③に関しては、キナクリン治療群のMM型とVV型において、非治療群より若干生存期間が長かったが、統計的有意差はなかった。以上より同報告では、キナクリン治療において明らかな効果は認められなかったと結論づけている。この治療が実施された後、Collinsら(2002)⁶⁾とBarretら(2003)⁷⁾は、*in vivo*の実験によりキナクリンに抗プリオン効果は認められないという報告をしている。

キナクリン治療の今後の展望

1986年にBSE, 1996年にvCJDが、いずれも英国で確認され世界的に大きなニュースとなった。さらにvCJDがBSEからの感染である可能性が高

いといった一連の報道は、世界を震撼させた。vCJDは若年層が多く罹患したという点が特徴的であり、食肉の安全性を問われた点と合わせて世界的な問題となり、一方でその治療法の確立が急務と考えられた。原因物質がプリオン蛋白であると同定されて以来、抗プリオン蛋白作用をもつ物質を探求する研究が進められた。かつて抗マalaria薬としてヒトへの安全性が確立されているキナクリン・キニーネが、一縷の望みを託され世界中でJakob病患者に用いられたのである。

これまでのところ、本邦、海外の結果をもととしては、その結果は決して満足のいくものではない。本邦で施行されたキナクリン・キニーネ治療の有効率は38.7%程度で、その効果はわずかであった。これは初めてCJDに対して臨床効果の手応えを感じ得た治療であったが、有効例のすべてにおいてその効果は一過性であり、副作用の肝障害も問題となった。フランスで行われた同様の治療については、報告者はさらに厳しい評価を下した。彼らの効果判定は、Rankin Scoreで評価を行ったため、われわれの報告のような個々の臨床的症状の微細な改善は抽出されず、治療効果は認められないという結論を出している。病理学的な検討に関しても、方法論的には純粋なcontrol studyではなく問題があるが、今後のCJDの標準的治療としては、キナクリン・キニーネ治療は不十分ではないかと考察されている。一方で、英国の臨床試験機関であるMRC(Medical Research Council)は、2004年6月からThe PRION-1 trialと呼ばれるキナクリンを用いた新たな臨床試験を開始した⁸⁾。The PRION-1 trialでは、2004年6月1日から2006年12月1日までの2年半の間に症例を集積する予定となっている。目標患者数は160例と今までにない大きな母集団である。対象は、12歳以上のCJD患者で、病型は問われず、個々の症例の観察期間は3年間としている。対象を、①キナクリン投与群、②キナクリン非投与群、③無作為群に分けるといふ、キナクリン治療初のrandomized controlled trialであることが大きな特徴である。もう一つの特徴は、効果判定の方法であり、①デジタルビデオで撮影した神経学的診察所見、②臨床的に改