

Science 2004. 351-354, 2005

- 2) Kobayashi A, Satoh S, Ironside J W, Mohri S, Kitamoto T : Type 1 and type 2 human PrP^{Sc} have different aggregation sizes in methionine homozygotes with sporadic, iatrogenic and variant Creutzfeldt-Jakob disease. J Gen Virol. **86** : 237-240, 2005

2. 学会発表

- 1) Yuichi Matsuura, Shirou Mohri, Yukiko Ishikawa, Yukitoki Fujita, Masamichi

Doiguchi, Tetsuyuki Kitamoto : Conversion of recombinant PrP^C to PrP^{Res} in transgenic mice promotes conversion of endogenous mouse PrP^C to PrP^{Res}. Prion 2005 Between fundamentals and society's needs. 〈Düsseldorf〉 October 19-21, 2005

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
なし

GPI アンカー欠損プリオン蛋白発現トランスジェニックマウスおよび Fyn 欠損マウスにおけるプリオン病

分担研究者：村本 環 東北大学・大学院医・CJD 早期診断・治療法開発分野
分担研究者：三好 一郎 名古屋市立大学・大学院医・実験動物研究教育センター
分担研究者：堂浦 克美 東北大学・大学院医・プリオン蛋白機能解析分野
分担研究者：毛利 資郎 九州大学・大学院医・実験動物学
研究協力者：北本 哲之 東北大学・大学院医・CJD 早期診断・治療法開発分野
研究協力者：八木 健 大阪大学・大学院・生命機能研究科・時空生物学講座
研究協力者：田川 裕一 動物衛生研究所・感染症研究部・細菌病研究室
研究協力者：松浦 裕一 九州大学・大学院医・実験動物学

研究要旨

GPI アンカー欠損プリオン蛋白[GPI(-)PrP]発現トランスジェニックマウス[GPI(-)PrP マウス]、ならびにプロテインキナーゼ Fyn を欠損するマウスにプリオンを接種し、発生するプリオン病の病態を解析した。GPI(-)PrP マウスの脳組織には、GPI(-)PrP の異常化、プリオンの増殖、高度のアミロイド形成が生じるが海綿状変性を欠く特異なプリオン病が生じた。この病変は同じ GPI(-)PrP マウスへ伝搬可能であった。野生型マウスへ伝搬した場合は、典型的プリオン病の病理像が回復した。これらのことから、GPI(-)PrP は野生型 PrP と同等のプリオン形成能を持つと考えられた。また、GPI アンカーの有無が病理像を決定する因子として働いていることが明らかとなった。Fyn 欠損マウスでは、病理像、潜伏期間ともに野生型マウスと同様の典型的病変が認められ、Fyn 欠損はプリオン病の病態形成を妨げないと考えられた。

A. 研究目的

プリオン病における病態、とくにプリオン蛋白(PrP)の構造と異常化能、プリオン形成能、神経変性形成能の関係を明らかにするために、我々は、GPI アンカーを欠損するプリオン蛋白[GPI(-)PrP]を発現するトランスジェニック(Tg)マウスを作成し、同マウスにプリオンを接種した場合に生じるプリオン病の病態を解析した。また、同研究の結果から、GPI アンカーが神経変性に重要な役割を演じている可能性

が示唆されたため、GPI アンカー型 PrP から発せられるシグナルを細胞内に伝達する働きを持つ Fyn(Src family に属する非受容体型プロテインキナーゼ)に注目し、Fyn がプリオン病の神経変性に果たす役割を明らかにするために、Fyn 欠損マウスへのプリオン接種実験を行い、その病態を解析した。これらの研究は、現在まったく謎であるプリオン病の神経変性の発生機序解明の突破口となる可能性のある全く新しい試みであり、プリオン病の新しい予

防・治療法の開発へと繋がることを期待できる。

B. 研究方法

1) Tg マウスの作成

Tg マウスの作成には、全長 24.5kb のマウスプリオン蛋白遺伝子からなる発現コンストラクトの exon 3 に含まれるアミノ酸コード領域の 231 番コドンに STOP コドンで置換した遺伝子を BDF1 マウス受精卵に microinjection した。High copy founder #19 と low copy founder #24 を C57BL/6 マウスとの交配によって繁殖させ、確立した [GPI(-)19B6 マウス、GPI(-)24B6 マウス]。同時に、これらのマウスを理研の糸原重美博士より分与して頂いた PrP ノックアウトマウスと交配させることによって、内因性の野生型 PrP を持たず、GPI(-)PrP のみを発現する Tg マウス [GPI(-)19KO マウス、GPI(-)24KO マウス] を作成した。GPI(-)19KO、GPI(-)24KO マウスにおける GPI(-)PrP 発現量は、C57BL/6 マウスにおける野生型 PrP 発現量のそれぞれ 25% および 3% であった。

2) プリオン接種実験

プリオン株としては福岡 1 株を用いた。福岡 1 株感染 NZW マウス 10% 脳乳剤 20ml を、マウスの左大脳半球へ接種した。神経障害症候を発症するか、または全身状態の悪化のため生存を維持できなくなったマウスを屠殺した後、脳を単離した。脳を左右に半切し、左半側をホルマリン固定して組織学的解析に用いた。右側半側は凍結保存し、異常型 PrP の生化学的検出に用いた。後述する floatation assay には、単離した脳を直ちに液体窒素で凍結してサンプルとした。

3) 異常型 PrP の生化学的検出

脳組織をバッファー [50mM Tris (pH 8.0)/10mM NaCl/10mM MgCl₂] 中でホモゲナイズした後、DNase I を加え 90 分間、37°C で DNA を消化した。Sarkosyl を 10% まで加えた

後、17,400g で 30 分間遠心分離して、上清と沈渣に分けた。沈渣は、Sarkosyl 10% を含むバッファー中に再懸濁、遠心分離することを 2 回繰り返してリンスしたのち、Sarkosyl 10% を含むバッファーに再懸濁した。上清と沈渣を proteinase K (脳組織 100mg 当たり 12.5mg) で消化した。反応液に Pefabloc を加え proteinase K を失活させた後、453,000g で遠心分離し、沈渣を Western blot で解析した。一部の Western blot には、PNGase F を用いて、糖蛋白のアスパラギン側鎖へ付加した糖鎖を除去したサンプルを用いた。

4) Western blot による PrP の検出に用いた抗体

異常型 PrP の検出には、組換えマウス PrP⁹⁰⁻²³⁰ ペプチドに対するポリクローナル抗体 anti-MoPrP^{II} (北本) を主に用いた。異常型 PrP のエピトープ解析にはさらに、市販の 8G8、SAF83、SAF84 モノクローナル抗体 (Cayman Chemical)、および抗マウス PrP モノクローナル抗体 #1、#17 (田川)、マウス PrP²¹⁸⁻²³² ペプチドに対するポリクローナル抗体 PRP3 (堂浦) も用いた。非感染脳に含まれる PrP の検出には抗ヒト PrP^{NP} (IBL) を用いた。モノクローナル抗体のエピトープは、8G8 が 94-109、SAF83 が 141-159、SAF84 が 159-169、田川 #1 が 132-144、田川 #17 が 174-217 であった。

5) Floatation assay

凍結したままの脳組織を、1% Triton X-100 を含む氷冷 MBS バッファー [25mM MES (pH 6.5)/0.15M NaCl] 中で急速にホモゲナイズした。ホモジェネートを氷冷した状態で 30 分振盪したのち、遠心分離 (2,000g、2°C、30 分) して上清と沈渣に分けた。沈渣は、上記の 1% Triton X-100 入りバッファーに再懸濁、遠心することを 3 回繰り返してリンスした。上清 400ml (または 800ml) を、氷冷した超遠心分離用チューブに移し、その上に 0.8ml (または 1.6ml) の 35% sucrose in MBS、および 0.8ml (または 1.6ml) の 5% sucrose in MBS を

順に上に乗せ、遠心分離(200,000g, 2°C, 20時間)した。遠心分離後、液面から200ml(または400ml)のフラクションを10個採取した。非感染脳の解析では、同フラクションをWestern blotで解析した。感染脳の解析では、10個の400mlフラクションと、上記2,000g遠心分離で得られた沈渣(1%Triton X-100を含むMBSバッファーに再懸濁したもの)にMgCl₂(10mM)、DNase Iを加え、37°Cで1時間、DNAを消化した。その後、Sarkosyl(5%)とproteinase K 1mgを加え、1時間反応させた。Pefablocを加えた後、10mM Tris(pH 8.0)/5% Sarkosylを加えて全体量を3.2mlとし、各フラクションのsucrose濃度を5%以下に下げた。サンプルを遠心分離(453,000g, 4°C, 1時間)し、得られた沈渣をWestern blotで解析した。同時に、フラクションのGM1 ganglioside含量をペルオキシダーゼ標識cholera toxin subunit Bを用いたdot blotにより解析した。

C. 研究結果

GPI(-)19KO マウスへの初代プリオン接種では、病理学的には脳組織への高度アミロイド沈着が生じた(図4A, E)。一方、プリオン病の特徴的神経変性である海綿状変性は認められなかった。脳組織の生化学的解析では、GPI(-)PrPの異常化が認められた(図1A)。野生型PrPScは、脳組織を10%Sarkosylで溶解した後、17,400gで遠心分離して得られた上清をproteinase Kで消化したのち、453,000gで遠心分離して得られる沈渣に検出されるが、対照的にGPI(-)PrPの異常型[GPI(-)PrPSc]は、174,00gの遠心分離で得られた沈渣をproteinase Kで消化したのち、453,000gで遠心分離して得られる沈渣に主に検出された(図1A)。野生型の異常型PrP (PrPSc)とGPI(-)PrPScの持つエピトープを、種々の抗体を用いて比較すると両者に差は無く、いずれもアミノ酸番号94-109番を認識する抗体

(8G8)、および218-232番を認識する抗体(堂浦PRP3)で検出された(図2)。Floataction assayでは、プリオン感染していないGPI(-)PrPマウスの脳組織中のGPI(-)PrPは、detergent-resistant membrane microdomain (DRM)に局在していることが示されたが、感染したGPI(-)PrPマウス脳組織中のGPI(-)PrPScはほとんど全てが、cold Triton X-100に溶けず2,000gで沈降する分画に含まれていることが明らかとなった(図3)。

アミロイド型病変を生じたGPI(-)19KOマウス2匹の脳乳剤を野生型マウス(NZW)へ継代接種すると平均138日、および144日で発症した。この値からGPI(-)PrPマウスの脳組織中には106.5および106.3 LD₅₀/gのプリオンが増殖していたことになり、野生型マウス[GPI(-)PrPマウスのnon-Tg siblings]へ接種した場合のプリオン増殖106.5 LD₅₀/g(NZWマウスへ継代接種した場合の潜伏期間137日)と同等であった。一方、同じ材料をGPI(-)PrPマウスへ継代接種すると、400日以上観察されたマウスにおいて、初代接種と同様の高度アミロイド型病変が生じた(図4B, F)。生化学的にも、脳組織内中にはGPI(-)PrPScが検出された(図1B)。GPI(-)PrPScの量を初代接種の場合と比較すると、病態形成は継代接種において促進されている可能性が示唆された(図1B)。

GPI(-)PrPマウスからNZWマウスへの継代接種では、海綿状変性と灰白質のシナプス型びまん性異常プリオン蛋白沈着を伴う典型的プリオン病の病理所見が生じ、アミロイドや斑状の異常プリオン蛋白沈着は生じなかった(図4C, G)。このことは、福岡1株がGPI(-)PrPマウスの脳組織中でアミロイド形成性の株へと変化したのではないという考えを支持する。

GPI(-)PrPマウス脳組織内で増殖することによって福岡1株の性状が変化したか否かを、さらにもう2つの方法で検討した。まず、福岡1株を野生型マウス[GPI(-)B6マウスの

non-Tg siblings]へ初代接種し、発病したマウスの脳乳剤を野生型マウス(NZW)へ継代接種した場合のNZW脳における異常PrPの分布(図4D)と、アミロイド病を生じたGPI(-)PrPマウスからNZWマウスへ継代した場合のNZW脳における異常PrPの分布(図4C)を比較したところ、明らかな差は認められなかった。また、両NZWマウスの脳組織中の野生型PrPScのWestern blot上でのパターンを比較しても明らかな差は認められなかった(図1C)。以上のごとく、GPI(-)PrPマウスの脳組織中で増殖することによって福岡1株の性状が変化したことを示す所見は得られなかった。

Fyn欠損マウスへのプリオン接種実験では、海綿状変性と灰白質へのびまん性異常プリオン蛋白沈着を伴う典型的なプリオン病の病理所見が認められ(図5)、潜伏期間も野生型マウスと差が認められなかった(表1)。

表1 Fyn欠損のプリオン病潜伏期間への影響

Inocula*	Recipient genotype	Incubation period (days)
A	+/+	161, 161, 161, 161
A	-/-	161, 161, 161, 161
B	+/-	157, 157, 157, 157 161
B	-/-	152, 152
C	+/+	146, 146, 146, 146 146, 146
C	+/-	146, 146, 146
C	-/-	146, 146, 146, 146

* A, B, Cいずれも福岡1株感染NZWマウス10%脳乳剤(20 ml脳内接種)

D. 考察

アミロイド病変を形成したGPI(-)PrPマウスからの継代接種が、野生型(NZW)マウスおよびGPI(-)PrPマウスの両方で成功したことから、GPI(-)PrPは野生型PrPと同等のプリオン形成能を持つと考えられた。

継代接種における病理像は、GPI(-)PrPマウ

スにおいてはアミロイド病変の再現、NZWマウスにおいては典型的福岡1株病変の回復であった。NZWマウスの病変には、「GPI(-)PrPマウスでpassageしたことによって福岡1株がアミロイド形成性の株に変化した」ことを示唆する所見は認められなかった。また、同マウスの脳組織内のPrPScのパターンは、福岡1株を野生型マウス[GPI(-)PrPB6マウスのnon-Tg siblings]からNZWマウスへ継代接種した場合のPrPScのパターンと差がなかった。これらことから、福岡1株をGPI(-)PrPマウスでpassageすることで株の性状が変化したことを示す証拠は病理学的にも生化学的にもなかったと言える。したがって、継代接種での病理像は、接種を受けたマウスの発現するPrPがGPIアンカーを持つか否かによって決定されたと考えられる。

GPI(-)PrPマウスにおけるアミロイド形成は、明らかなプリオン株の性状の変化を伴わずに起こっていることから、GPI(-)PrPScまたはGPI(-)PrPScが生じるプロセスの特異性に基づく現象と考えられる。1つの可能性は、GPI(-)PrPScがそれ自身アミロイドを構成しやすい性質を持つということである。GPI(-)PrPScが、10% Sarkosyl中での17,400g遠心分離で大部分が沈降したこと、およびcold 1% Triton X-100中での2,000g遠心分離で殆ど全て沈降したことは、GPI(-)PrPScがアミロイドの中に含まれていることを示唆する。ただし、GPI(-)PrPSc自身がアミロイドそのものを構成しているのか、あるいはGPI(-)PrPScはアミロイドの中に含まれてはいるものの、実際にアミロイドを構成しているのは他の成分[たとえば、より断片化したGPI(-)PrP]であるかは不明である。すなわち、GPI(-)PrPScが産生される過程で、アミロイドを形成しやすい副産物が産生されており、それがアミロイド形成を引き起こしている可能性は残されている。

GPI(-)PrPの研究で得られた重要な示唆の

一つは、PrP の膜との association の様式がプリオン病の神経変性に大きく影響するということであった。今回の研究では、プリオン病の神経変性機序における Fyn の役割は否定されたが、引き続き研究でも、我々は継続して神経変性の機序に焦点を置いていく予定である。我々は、昨年の班会議で報告した「異常化能を持つ膜貫通型 PrP」を発現する Tg マウスの作成に、最近成功した。同マウスへのプリオン接種実験では、全くユニークな膜との association の様式を持つ PrP が異常化した場合に神経変性が生じるのか、生じるとすればどのようなタイプの変性かが明らかにされる。また、膜貫通ドメインを持つ PrP がプリオンを形成した場合、同ドメインはプリオンが組織の中を広がっていく効率にどのような影響を与えるかにも焦点が当てられる。これによって逆に、野生型 PrP の GPI アンカーが、組織内でのプリオンの

拡散能に関してどんな働きを演じているかという、全く新しいパラダイムへの突破口が開かれる可能性がある。

E. 結論

GPI(-)PrP は、野生型 PrP と同様のプリオン形成能を持つ。PrP の GPI アンカーの有無は、病理像を決定する因子として働く。Fyn 欠損はプリオン病の病態形成を妨げない。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

プリオン感染および治療に伴う遺伝子発現の解析

分担研究者：三好一郎 名古屋市立大学大学院医学研究科

研究要旨

コンゴレッド(CR)存在下での培養でプリオン持続感染マウス神経芽細胞腫株 ScN2a を「治療」し、その後さらに PrP^{Sc} に暴露させて「再感染」させることにより、異常型プリオンタンパク (PrP^{Sc}) の増幅に伴う遺伝子の発現をマイクロアレイを用いて解析した。異常タンパク反応、あるいはシャペロン活性化、小胞体関連分解など、たんぱく質の品質管理や細胞内輸送に関連すると考えられる 11 種の遺伝子の発現に変動が認められた。

A. 研究目的

近年、プリオン病に対する有効な治療法が開発されつつあるが、そのためには早期診断あるいは他の脳神経変性疾患との鑑別、更に PrP^{Sc} の伝達・増殖機構の解明が必要とされる。従来、ScN2a 細胞は PrP^{Sc} への構造変換や種の壁の試験管内解析に利用され、CR 投与によって PrP^{Sc} の産生が阻止される、いわゆる治療も可能な実験系を提供している。本研究では、この実験系を用いて PrP^C の構造変換に関与する分子、あるいは早期診断や発症機構の解明、治療に有用な分子を把握する目的でマイクロアレイによる遺伝子発現プロファイリングを行った。特に今回、CR 処置により PrP^{Sc} を産生しなくなった ScN2a を PrP^{Sc} に試験管内暴露させ、再び PrP^{Sc} を増幅するように感染させること、および、細胞密度を 2 段階に設定し培養条件を変えることによって細胞増殖あるいは維持、代謝に関わる要素を排除し、感染に伴う特徴的なプロファイリングを試みた。

B. 研究方法

CR 存在下 (2.5 μ g/ml) で 14 日間培養した後、

CR を除去して 14 日間経過してもウエスタンブロット法で PrP^{Sc} が検出されないことを指標に持続的な治療効果を確認した ScN2a に、PrP^{Sc} を産生している ScN2a あるいは対照の N2a を各々 5 回凍結融解を繰り返した後に超音波処理して作製した乳剤を加え、2 時間暴露した。5 回継代 (13 日) 後に ScN2a に暴露された細胞だけに PrP^{Sc} が検出されることを確認 (ウエスタンブロット法) した。さらにその 8 日後 (継代 3 回) に細胞濃度を変えて (1:12 および 1:8) 継代し、2 日後 (各々 60% および 90% confluent) に凍結保存した。

常法によりこれらの細胞から抽出・精製した RNA を単色蛍光標識後、マイクロアレイ (QIAGEN AROS 32k Oligo DNA MicroArray) を実施し GeneSpring GX を用いて実測値を補正後、解析を行った。標準化したデータから、培養時の細胞密度の因子 1 (高細胞密度 vs 低細胞密度) および再感染させたか否かの因子 2 (再感染 vs 非感染) を同時に考慮に入れた二元配置分散分析 (2-way ANOVA) により、各々高細胞密度 vs 低細胞密度あるいは再感染 vs 非感染群で発現の差が有意 ($p < 0.05$) である遺伝子を選

び、更に、高細胞濃度-再感染 vs-非感染および低細胞濃度-再感染 vs-非感染、再感染-高細胞濃度 vs-低細胞濃度、非感染-高細胞濃度 vs-低細胞濃度に分類して明らかに2倍以上の変動を呈した遺伝子を抽出した。次に、培養時の異なる細胞密度間あるいは、再感染および非感染間での(非)共通性に基づき遺伝子を分類し、継代時の細胞密度の相違に左右されることなく感染あるいは非感染の間で著しい変動を示す遺伝子を調べた。

各々の遺伝子について、TaqMan プローブを用いてリアルタイム PCR を行い比較定量した。

C. 研究結果

CR 処置により、ScN2a の PrP^{Sc} の産生は阻害されるが(図 1)、試験管内での PrP^{Sc} への暴露により PrP^{Sc} 増幅能は完全に回復した(図 2)。

マイクロアレイに用いた 32000 遺伝子のうち 11 遺伝子が培養時の細胞密度の相違に左右されることなく再感染あるいは非感染の間で顕著な

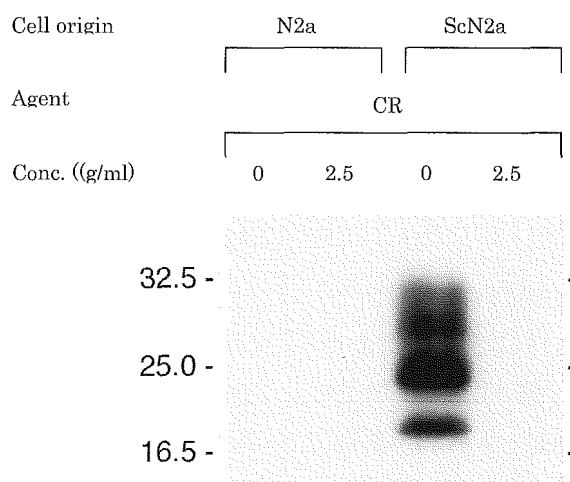


図 1 CR 処理による PrP^{Sc} 増幅の阻害

N2a および ScN2a を CR 処理した後、プロテアーゼ処理画分と抗マウス PrP モノクローナル抗体#6 を用いてウエスタンブロッティングを実施した

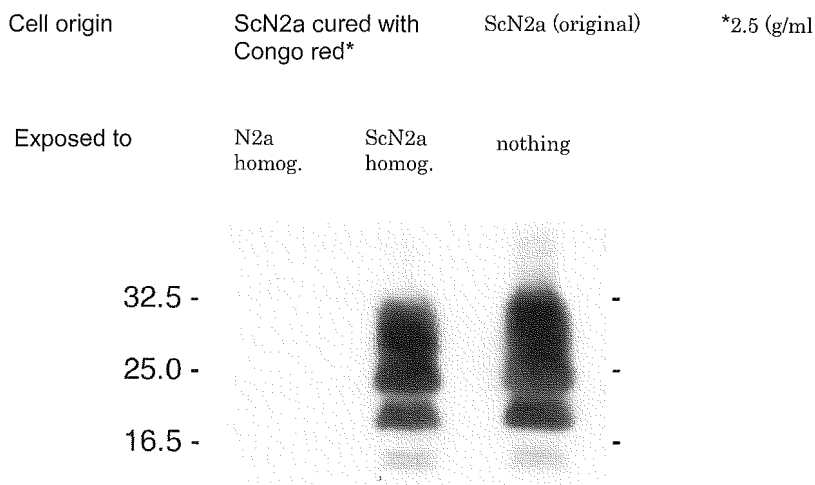


図 2 再感染による PrP^{Sc} 増幅

CR 処理した ScN2a に、N2a および ScN2a 乳剤を暴露(再感染)させた後、プロテアーゼ処理画分と抗マウス PrP モノクローナル抗体#6 を用いてウエスタンブロッティングを実施した

変動を示す遺伝子として抽出された(表 1)。そのうちの 10 遺伝子についてリアルタイム PCR で定量したところ、期待したほど大きく無かったが、再感染および非感染の間に明らかな発現

の変動が認められた(図 3)。

これらの遺伝子産物および PrPC を加えて Ingenuity Pathway Analysis によりタンパク分子間の相互作用の有無を調べた。ARFGEF1

表 1 再感染実験で変動を示した遺伝子

<u>stromal cell-derived factor 2-like 1 (Sdf2l1)</u> : O-mannosyltransferase活性を有するPmt/rt protein family memberの一つでUPR pathwayで誘導され、DnaK Cochaperoneと相互作用。
<u>sorting nexin 4 (Snx4)</u> : タンパク輸送時の小胞形成等に関与しているSNX family member の一員。
<u>nucleoporin 43 (Nup43)</u> : mRNAやタンパクの輸送に関与する核膜孔複合体を形成すると考えられている nucleoporinの一つ。
<u>DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 3 (Dnaj3)</u> : DnaJ Cochaperoneタンパクで、ショウジョウバエのtumor suppressor Tid56のホモログ。ミトコンドリアにおける膜輸送に関与。
<u>protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isoform (Ppp1cb)</u> : セリン・スレオニンフォスファターゼの一つで、ポリグルタミンを含むペプチドの分解に関与か？。
<u>AFG3 (ATPase family gene 3)-like 1 (yeast) (Afg3l)</u> : ATP-dependent zinc metalloprotease familyと高いホモログを示すタンパクをコードする。ミトコンドリアに局在する。
<u>ADP-ribosylation factor guanine nucleotide-exchange factor 1 (brefeldin A-inhibited) (Arfgef)</u> : Sec7 domainを有し、小胞体輸送に関与する。
<u>surfeit gene 4 (Surf4)</u> : SURF4 family memberでこの酵母のホモログはER-Golgi輸送において、小胞を形成および小胞輸送に関与している。
<u>cell division cycle associated 3 (Cdc3)</u> : cell cycleを制御、ユビキチン化に関与。
<u>ENSMUSG00000042984</u> : NK receptor Ly-49Q (lectin-like transmembrane protein)のホモログ
<u>ENSMUSG00000021470</u> : PUTATIVE REPAIR AND RECOMBINATION HELICASE RAD26Lのホモログ

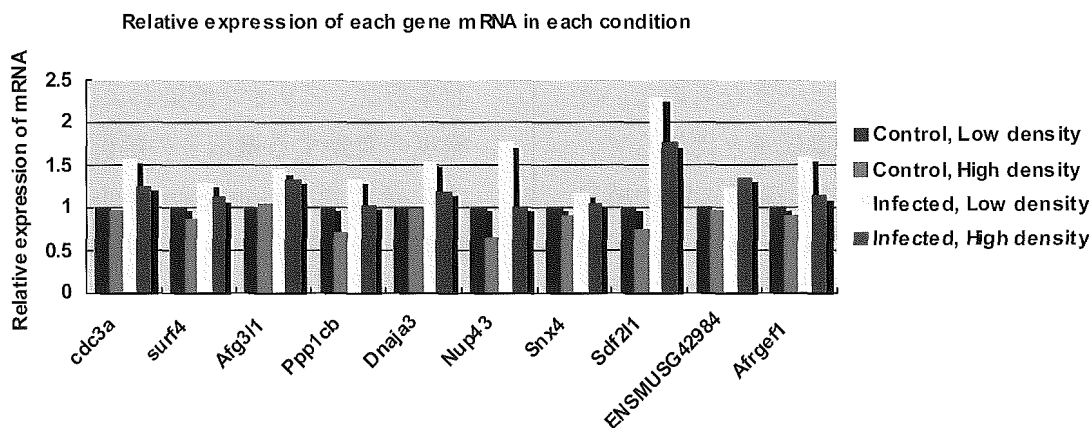


図 3 再感染実験で変動を示した遺伝子のリアルタイム PCR

再感染実験で変動を示した遺伝子を TaqMan プローブを用いて定量し、各々低密度非感染 ScN2a の値を 1 として相対値にした

および SNX4、PPP1CB、DNAJA3、CDCA3 に若干の関係が見られたものの、現時点ではその他の分子に相互作用は見出されなかった。

D. 考察

今回の実験では、検出限界まで PrP^{Sc} が検出されなくなることを確認した培養細胞を再感染させることで、より厳密な感染—非感染の比較を可能にし、さらにこれまでのプロファイリングで、発現変動する遺伝子に含まれる細胞増殖、および維持、に関する多くの要因を除去する目的で異なる細胞密度条件で培養を実施した。

目的の分子が除外されてしまう可能性もあるためか、今回の条件により抽出された遺伝子数は予想よりも少なかった。これらの遺伝子は、異常タンパク反応、あるいはシャペロン活性化、小胞体関連分解など、たんぱく質の品質管理や細胞内輸送に関連すると考えられる遺伝子であり PrP^{Sc} が増幅されつつある細胞内での生体側の反応としては正しいのかもしれない。また、一方では、こういう分子群が凝集化した PrP^{Sc} を反応可能な状態に触媒する可能性も考えられる。これまでの報告では、ScN2a と N2a および、視床下部由来株化細胞 GT1 とその PrP^{Sc} 産生クローン ScGT1 を比較したものが知られている。いずれも数百の遺伝子の変動が検出され、感染したヒト脳のプロファイルと異なるだけでなく、株化細胞間での相違も大きい。我々の結果は、これらプロファイリングとの相同性も低く、方法を反映したユニークなものといえるかもしれない。今回の 11 遺伝子と比較して、私が実施した個体レベルでの接種実験の感染初期に脾臓などで変動を示した遺伝子との共通性、および CR による試験管内治療に関与する遺伝子との共通性は見られなかった。

PrP^CからPrP^{Sc}への構造変換・増幅、および

その抑制・阻害に関与する分子の情報を収集し、早期診断や発症機構の解明、治療の標的分子を探索するために、今回の手法は有用であり、関連分子の遺伝子発現プロファイルにおける方向性の一つを示すものと期待する。

E. 結論

培養細胞を試験管内治療後に改めて再感染させ、培養条件(細胞密度)の違いに依存しない感染、即ち PrP^{Sc} 増幅に伴う遺伝子発現をマイクロアレイにより検索し 11 種の遺伝子を同定した。

以上は、東北大学・村本環助教授、および北本哲之教授、九州大学(現動物衛生研究所)・毛利資郎教授、動物衛生研究所・田川裕一博士との共同研究である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 三好一郎：遺伝子組換え動物を用いた疾患モデル動物の開発および疾患原因遺伝子の同定・機能解析. 名古屋市立大学医学会雑誌 **56**(2, 3) : 29-40, 2005.

2. 学会発表

1) 三好一郎, 宮本智美, 毛利資郎, 村本 環, 北本哲之：プリオン感染および治療に伴って発現の変動する遺伝子の解析. 2005 年プリオン研究会 (Prion Symposium in Tohoku 2005) (天童), 2005 年 8 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金(難治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症に関する調査研究班
分担研究報告書

プリオン病及び遅発性ウイルス感染に関する研究
クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)
ー患者におけるキナクリン投与の治療成績とその問題点ー

研究協力者：調 漸 長崎大学医学部・歯学部附属病院 へき地病院再生支援・教育機構

研究要旨

抗マalaria薬であるキナクリンは、クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)の治療法として *in vitro* の持続感染系や感染実験動物で有効性が知られている。現在当教室では CJD 患者における治療薬としてキナクリンとペントサン投与を開始している。今回我々は CJD 患者におけるキナクリンにおける治療効果及び病態マーカーの検索を研究の目的とした。現在まで probable case 及び definite case の CJD 患者 10 例に対し、キナクリン投与を開始し、我々の考案した各種スケールにおいて臨床的効果判定基準を行い、さらに髄液の生化学マーカーと画像検査にて検討を行った。又同時に CJD 患者におけるキナクリン非投与群と投与群との病理学的検討と予後比較を検討した。

結果として我々の考案した各種スケールにおいて臨床的効果判定基準では評価する事ができなかったために、既存の各種スケールにおける評価を行った。現在までの Unified MSA Rating Scales II の修正版を利用した。又髄液の生化学マーカーと画像検査では明確な違いはなかった。さらに CJD 患者におけるキナクリン非投与群と投与群との病理学的な検討では違いはなかった。しかしながら生命予後的な検討では CJD 患者におけるキナクリン投与群が非投与群の方よりも長かった。

以上よりキナクリン投与では余命の延長効果が予想されるものの、臨床的な観察では有用性は不随意運動、表情表出などの限定的な効果に限られた。今後、より強力な新規薬剤の開発が必要であると考えられる。

A. 研究目的

急速に脳の変性を引き起こし数ヶ月以内に脳死状態に陥るプリオン病は、有効な治療法が確立されていない致死性疾患である。狂牛病の伝播による変異型クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)の出現や、本邦における汚染ヒト脳硬膜移植による医原性 CJD の多発を背景に、治療あるいは病態進展阻止のための臨床方策の開発が急務となっている。

これまでに、我々は 10 例の CJD 患者にキナクリンを投与してきたが、今回、臨床的指標、生存期間、神経病理学的解析を行いその結果をまとめた。平成 12 年から平成 17 年までの長崎大治療研究プロトコールに参加していただいた CJD 患者(キナクリン投与群)における現在までの診断・神経病理学・治療効果の側面での検討を行う。

B. 研究方法

1) 知的機能検査と行動・生活評価尺度の検討

知的機能検査と行動・生活評価尺度において

1) 認知症のスケールの検討 (GBS, GDS, MMSE, Brief Psychiatric Rating Scale)、
2) ALS のスケールの検討 (ALS functional Rating Scale, ALS assessments questionnaire 40, Quality of Life for Ventilator Dependent ALS)、
3) MSA のスケールの検討 (Unified MSA Rating Scales I, II and III) について検討を行った。

2) 既存薬剤の脳内送達性向上のための併用薬剤の探索

キナクリン投与については以下に述べる脳内送達性の向上のためのベラパミルの併用をプロトコールに追加し、常用量とされた 300mg/day を 200mg/day に減量した上で髄液中の薬物濃度をモニターした。

3) 患者抽出について

CJD、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病、家族性クロイツフェルト・ヤコブ病、ヒト硬膜移植による医原性クロイツフェルト・ヤコブ病、家族性致死性不眠症からなるプリオン病患者を対象とする。その診断は本会議の提唱する診断マニュアル 1) に加えて、髄液 tau 蛋白、髄液 14-3-3 蛋白測定で診断が確認できた症例及び画像検査に陽性症例に対し、長崎大学倫理委員会の定めるインフォームドコンセントを十分に得た上で上記のいずれかの診断の患者の治療への参加を得る。これまでに、使用薬剤は米国で一定の効果が報告されたキナクリン 2) と試験管内で最大の異常プリオン蛋白抑制効果を発揮することが判明している PPS 3) を候補薬剤として用いる。今回はキナクリン投与患者とし、孤発性 CJD6 例、硬膜移植例 1 例、遺伝性 CJD3 例について検討を行った。

4) Haik 論文を利用した病理学的具体的検討

Haik の原著の脳の約 10 ヶ所とは前頭葉、側

頭葉、頭頂葉、後頭葉、嗅内野、海馬、視床、線条体、黒質、小脳であるがさらに中脳水道周囲灰白質、青斑核、延髄(下オリーブ核)を加えた 13 ヶ所の検討である。

又 Haik の原著では、海綿状変化、神経細胞脱落、グリオーシスで検討しているが、神経細胞脱落とグリオーシスを分けて検討されている論文が少なく、一緒に検討されている可能性が多い。海綿状変化(Grade 0-4)、神経細胞脱落・グリオーシス(Grade 0-4)、プリオン蛋白の沈着(Grade 0-4)について検討を行った。

5) 予後調査について

平成 12 年から平成 17 年までの長崎大治療研究プロトコールに参加していただいた CJD 患者(キナクリン投与群)における現在までの予後・生存期間の調査について検討した。

(倫理面への配慮)

1) 本研究は長崎大学倫理委員会の承認を経て行われている。(承認番号 14042342)

2) 副作用監視に特に注意を払うために副作用監視医師を当該研究グループに属さない内科教官に委託している。

C. 研究結果

1) 知的機能検査と行動・生活評価尺度の検討について

認知症のスケールの検討 (GBS, GDS, MMSE, Brief Psychiatric Rating Scale)、ALS のスケールの検討 (ALS functional Rating Scale, ALS assessments questionnaire 40, Quality of Life for Ventilator Dependent ALS)、MSA のスケールの検討 (Unified MSA Rating Scales I, II, III) について検討を行ったが、今回の検討に利用可能であったスケールは Unified MSA Rating Scales II 及び III であり、このスケールは MSA のみであったために、Unified MSA Rating Scales II を修正し、症状変動の評価スケールとして利用可能となった。(表 1) 又今回キナクリン投与患者 10 症例にお

いてはおのこのケースで修正版 Unified MSA Rating Scales II を利用し、評価を行った。

2) 既存薬剤の脳内送達性向上のための併用薬剤の探索

キナクリン脳移行におよぼす P-gp 阻害薬として昨年度 cyclosporine および verapamil 存在下でキナクリンの脳移行が *in vitro* で有意に増大することを報告した。今年度は verapamil をキナクリン 200mg/day と併用し、作用、副作用、髄液中の薬剤濃度を検討したところ、有効性は 300mg/day とほぼ同等で、副作用では皮膚黄染は全例にみられるものの肝障害は軽度で2名にみられるに留まり、髄液中薬剤濃度は、0.23-0.4Mm と *in vitro* の有効濃度とされる0.4-1M に近いレベルまで上昇することが判った。(表 2)

3) 患者について

これまでに 10 例のキナクリンの投与を終了した。(表 1) ミオクローヌスの減少は全例に見られた。一例のみ一過性の脳波所見の改善がみられたが、他の例では覚醒度の改善が一過性に観察されるが臨床経過を修飾し得るものではなく、経過中一過性の周囲への反応の改善などみられたものの脳波所見は改善後 2 週間以内に全汎徐波から PSD へ移行した症例があった。結論的にはミオクローヌスなどごく一部の症状が軽快傾向にあったのみで、有効性に乏しかった。副作用としては肝機能障害、幻覚妄想が各々 1 例である。

知的機能検査と行動・生活評価尺度の検討において評価のスケールである修正版 Unified MSA Rating Scales II を利用すると一過性に改善を認められるが、数週間投与行くと元の状態に戻り傾向しかなかった。

4) Haik 論文を利用した病理学的具体的検討

剖検の時期・ステージが異なるために、又は症例数が少ないために正確な評価は難しいが、現在まではキナクリン投与例での病理学的な明確な効果は見出すことはできなかった。(図 1)

5) 予後調査について

キナクリン投与例と非投与例での予後調査ではエンドポイントを無動性無言にするという考えもあるが、キナクリン投与例において無動性無言以後の患者も対象となっており、さらに無動性無言の症例でも一過性の効果も認められる症例もあり、純粹に生存期間のみを比較とした。又対象となっているキナクリン非投与例では IVH, 経管栄養を投与した患者のみとした。キナクリン投与例では非投与例に比べ明らかに生命予後は延長する傾向にあった。(図 2)

表 2 髄液中のキナクリン濃度

	濃度(μ M)
MM1★	0.3981
MM1	0.2261
dura CJD★	0.401

★p 糖蛋白阻害剤併用とする

表 1 Unified MSA Rating Scales II

	スコア		スコア
1. facial expression	0-4	8. finger taps	0-4
2. speech	0-4	9. leg agility	0-4
3. ocular function	0-4	10. Heel-kneel test	0-4
4. myoclonus	0-4	11. Arising from chair	0-4
5. action myoclonus	0-4	12. posture	0-4
6. Increased tone	0-4	13. body sway	0-4
7. rapid alternating movements of hands	0-4	14. gait	0-4

(修正版)

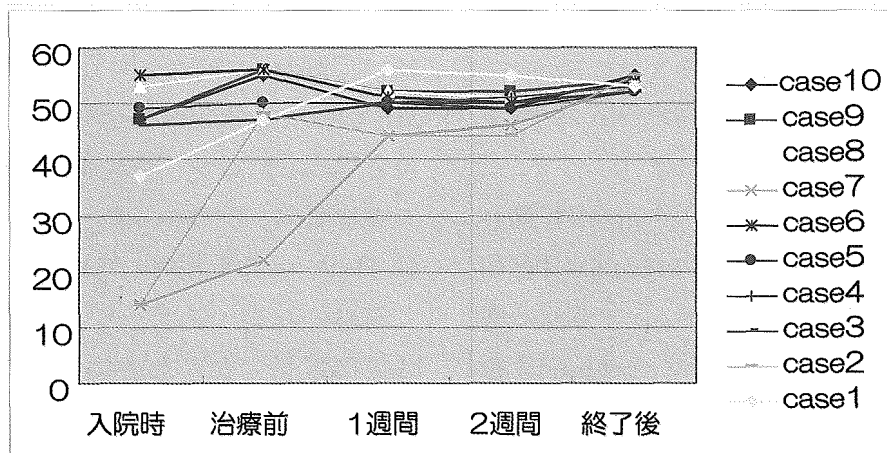


図1 キナクリン投与例における Unified MSA Rating Scales II

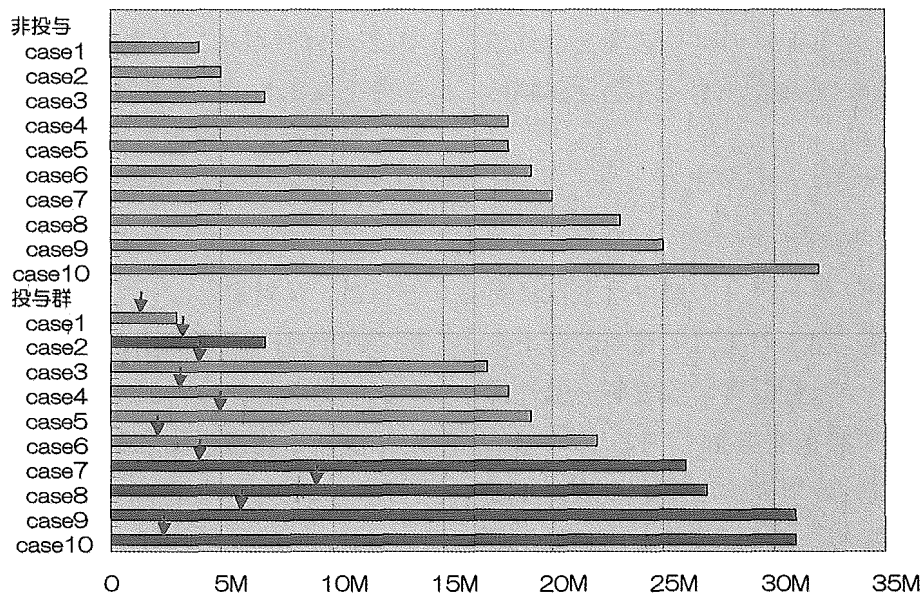


図2 予後調査の結果

D. 考察

1) 知的機能検査と行動・生活評価尺度の研究

現在までCJDの評価スケールについては現在まではっきりとしたものは存在していなかった。すべての疾患において評価スケールは存在するが、CJDに対する利用できる最初のスケールであり、修正版 Unified MSA Rating Scales IIを利用していきいたいと思う。

2) 既存薬剤の脳内送達性向上のための併用薬剤の探索

キナクリンは、脳に移行する場合、能動的な細胞外排出輸送系によって排出されているが、

排出輸送系として P-gp が関与している。従って、P-gp 阻害によりキナクリンの脳内移行量が増大する可能性が考えられ、この知見に基づいてキナクリンと verapamil 併用療法を行なったところ、良好な治療効果と副作用の軽減が可能となり、髄液中のキナクリン濃度も治療可能なレベルに達すると思われた。新たな治療戦略として提案できると考えるが、現在までの臨床効果については効果無しといえる。

3) キナクリン投与の臨床効果

キナクリン投与では覚醒度、追視などの改善に加えて驚愕反射、ミオクローヌスの頻度に改

善がみられたが1例で脳波所見に一過性の改善がみられたが、無言無動に至る臨床経過には改善はみられなかった。Verapamilを併用すれば副作用を軽減した上で、有効な髄液中濃度に近い濃度が得られることが判った。しかしながら現在、早期診断においてはMRI、髄液検査で早期診断がある程度可能になり、治療効果の判定のための病態評価マーカーである修正版 Unified MSA Rating Scales IIを開始するものの、キナクリン投与による予後以外は明らかな投与効果は見られなかったと考えられる。キナクリン投与例及び非投与例での予後における比較は現在まだ生存例が正確ではないが、約1.6ヶ月程度延長している。Haikらの報告でも有意差は出ていないものの、キナクリン治療群が長期生存する傾向が出ており、その原因は不明であるが興味深い結果であり今後の更なる観察、検討が必要であると思われる。

E. 結論

- 1) 治療における効果の評価方法として Unified MSA Rating Scales IIを修正したものが優れていた。
- 2) キナクリン治療薬としては軽微な効果しか期待できない。
- 3) しかし、キナクリン治療群は生存期間が長い傾向にあり今後の検討が待たれる。

参考文献

- 1) 疾病対策研究会：難病の診断と治療指針 3、クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)の診断基準。六法出版社。138-140, 2002
- 2) Rebecca Love : Old drugs to treat new variant Creutzfeldt-Jakob disease. Lancet. 563, 2001
- 3) Chistine F. Alan D. Moria Bruce : Prophylactec potential of pentosan polysulfate in transmissible spongiform encephalopathies. Lancet. 353 : 117, 1999

- 4) 古川ひさ子. 中島雅士. 高橋美津雄. 山田達夫 : クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)に対する診療法(マラリア治療薬)の開発展望. 日本臨床. 60 : 1649-1657, 2002
- 5) Haik S, Brandel JP, Salomon D, et al. : Compassionate use of quinacrine in Creutzfeldt-Jakob disease fails to show significant effects. Neurology. 2004 Dec 28 ; 63(12) : 2413-5.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) K.Satoh, S.Shirabe, H.Eguchi, A.Tsujino, K.Eguchi, A.Satoh, M.Tsujihata, M.Niwa, S.Katamine, S.Kurihara, H.Matsuno : 14-3-3 protein, total tau and phosphorylated tau in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease and neurodegenerative disease in Japan. Cell Mol Neurobiol, in press, 2005
- 2) Shirabe : Therapeutic Trial and Diagnostic Markers of Human Prion Diseases. 21 COE Hokkaido University The 9 The International Symposium for Zoonosis Control Pathogenesis and Etiology of Zoonoses Causing Encephalitis and / or Encephalopathy 5, 2005
- 3) 調 漸 : 診療茶話 NO.312, 痴呆症の話. 長崎県医師会報 708 : 73-75, 2005
- 4) 調 漸, 佐藤克也 : プリオン病の概説と具体的事例. 難病と在宅ケア : 43-48, 2005
- 5) 江口博人, 佐藤克也, 調 漸, 江口勝美, 井手芳彦 : 早期に診断し得た Heidenhain 型 Creutzfeldt-Jakob 病の 1 例. 神経内科 63(3) : 276-280, 2005
- 6) 佐藤克也, 調 漸, 江口勝美 : プリオン病の

臨床検査(14-3-3 蛋白, NSE, Tau 蛋白)*
神経内科 **63**(5) : 429-434, 2005

2. 学会発表

- 1) 庄司紘史, 江口博人, 斉藤若菜, 辻野 彰, 福島直美, 白石裕一, 西浦義博, 本村政勝, 調 漸, 吉嶺裕之, 江口勝美: 非典型的トキソプラズマ脳症で発症した AIDS の一例. 日本神経学会九州地方会, 169, 福岡
- 2) 調 漸, 佐藤克也, 江口勝美, 丹羽正美, 片岡泰文, 片峰 茂: ペントサンポリ硫酸 (PPS) のクロイツフェルト・ヤコブ病治療効果と脳内移行性新規低分子 PPS. 第 78 日本薬理学会年会
- 3) 納 光弘, 調 漸, 佐藤克也, 江口勝美, 片峰 茂, 丹羽正美, 片岡泰文: クロイツフェルト・ヤコブ病の治療方策の開発. 第 46 回日本神経学会総会, 鹿児島

4) 納 光弘, 佐藤克也, 調 漸, 江口勝美, 大谷 博, 重松和人: 井関充及孤発性と codon 180 変異クロイツフェルト・ヤコブ病における画像検査と病理像の比較検討. 第 46 回日本神経学会総会, 鹿児島

5) S Shirabe, K Satoh, K Eguchi, S Katamine, M Niwa : The serial analysis of total tau protein and other biochemical markers of CSF, clinical signs and MR images in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease during disease time course. 2International Symposium on the New Prion Biology: Basic Science, Diagnosis and Therapy Adriano Aguzzi, Venice.

H. 知的財産所有権の取得状況

なし

Clinical, Neuropathological analysis of Administration of quinacrine
in Creutzfeldt–Jakob disease

Susumu SHIRABE, Katsuya SATOH, Katsumi EGUCHI, Shigeru KATAMINE,
Noriyuki NISHIDA, Masami NIWA, Yasufumi KATAOKA

Division of Clinical Neurosciences, Neurology and Neurosurgery Graduate School of
Biochemical Sciences, Nagasaki University.
Division of Cellular and Molecular Biology,
Department of Molecular Microbiology and Immunology Graduate School of
Biochemical Sciences, Nagasaki University.
Department of Pharmaceutical Care and Health Sciences,
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University

Objectives: Quinacrine has been reported as an anti-prion drug and was administered as the Creutzfeldt–Jakob disease's patients. In France and England, the quinacrine did not have the significant effect for CJD's patients, but in Japan patients, insensible before treatment, had integrative responses such as eye contact or voluntary movement in response to verbal and/or visual stimuli restored. We want to re-analyze for quinacrine's effects as using many clinical scales, neuropathological aspects and the survival time.

Methods: We studied the first 10 patients (4 men, 6 women) with CJD admitted to our hospital between 2002 and 2005. The clinical diagnosis of CJD was made according to standard criteria. And 10 patients were classified on Master's criteria and 10 patients showed 4 "definite" cases and 6 "probable" cases. We analyzed clinical courses of ten patients by many scales of other Alzheimer's disease or neurodegenerative diseases. Among these scales, "Unified Multiple System Atrophy (MSA) Rating Scales II" was most adaptable scale to have the influence on patients' condition. According to Nagasaki University's protocol in Japan, all patients received orally a loading dose of 100mg three times a day with verparmil(120mg/day) and cimetidine(800mg/day). Disease progression was evaluated every 30 days based on Modified "Unified MSA Rating Scales II". Blood cell count and transaminase level were controlled after every 4 days of treatment. The neuropathological study was performed after fixation of the brain. Formalin-fixed paraffin-embedded brain sections were subjected to histological analyses including hematoxylin-eosin staining and PrP immunohistochemistry using the 3F4 monoclonal antibody (MAb) as described.

Results: The duration between the onset and initiation of the treatment was 3.2 months (mean; range to 1 to 5 months) for 10 patients with CJD. Treatment duration was 28 days (1 to 36 days) for the patients with CJD. The survival terms of treated patients were 20 months in average and that of untreated patients was 17.1 months. Our neuropathological analysis of 13 selected lesions in CJD's brain has no remarkable difference between 4 patients treated with quinacrine and 2 patients without treatment.

Conclusion: Quinacrine was the potentially effective treatments for CJD, but our trial found effectiveness only decrease of amount of myoclonus and facial expression using modified "Unified MSA Rating Scales II". Neuropathologic scales fail to show significant effect. The survival term of treated patients was slightly longer than that of untreated patients, but, statistical analysis of survival term has not completed y

厚生労働科学研究費補助金(難治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症に関する調査研究班
分担研究報告書

ペントサンポリサルフェート脳室内持続投与による臨床試験

分担研究者：山田 達夫 福岡大学内科学第 5 教室
研究協力者：坪井 義夫 福岡大学内科学第 5 教室

研究要旨

プリオン病は致死性の疾患で、異常型プリオン蛋白(PrPsc)の脳内蓄積が共通の病理である。ヘパリン類似の活性を持つ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、発症遅延効果、PrPscの沈着抑制効果が認められている。プリオン病に対する PPS 脳室内持続投与法の効果と安全性の検討を行った。現在まで福岡大学病院にて PPS 脳室内持続投与法は 5 例に施行された(平均年齢 68 歳、すべて女性)。治療後の症状は安定あるいは悪化しており明らかな改善は認めない。副作用として 1 例に部分てんかんと硬膜下水腫を認めたが、他の 4 例には出現していない。同治療法は、全身への影響はきわめて少ない、安全な治療といえる。PPS の至適濃度の検討は今後の課題である。

A. 研究目的

クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)をはじめとするプリオン病にいまだ有効な治療法がない。孤発性 CJD に加え、硬膜移植後の医原性 CJD やウシ海綿状脳症の発生に伴う変異型 CJD 病の発生が懸念されており、治療法の開発が急務である。ヘパリン類似の活性を持つ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、発症遅延効果、PrPscの沈着抑制効果が認められている。PPS は血液脳関門を通過しないために直接脳室内に投与する必要がある。今回プリオン病に対する PPS 脳室内持続投与法の効果と安全性の検討を行った。

B. 研究方法

PPS 脳室内持続投与法は昨年までの研究で確立したプロトコールにしたがい行った。対象は 2004 年 11 月より現在まで福岡大学病院で同治療を行った 5 例(平均年齢 68 歳、すべて

女性)。

(倫理面への配慮)

本研究は倫理審査委員会の承認を得て行われ、患者・家族にインフォームドコンセントを行い、同意を得た場合にのみ治療研究が開始された。

C. 研究結果

治療後開始後の臨床症状は安定(2 例)あるいは悪化(3 例)しており明らかな改善を認めた症例はない。治療に関連した副作用として 1 例に部分てんかんと硬膜下水腫を認めた。血算、凝固、生化学などの全身性の副作用は認めていない。

D. 考察

我々の作成した PPS 脳室内持続投与法のプロトコールはこれまでのところ患者への負担、副作用などの点は問題がなく、今後も継続が可能と考えられた。治療効果の評価は現時点では

困難で、今後の症例の蓄積および臨床経過の長期観察において、対象となる自然経過との比較において評価すべきと思われた。

E. 結論

PPS 脳室内持続投与法の治療研究において、現時点では安全性は確認された。効果や PPS の至的濃度などは今後の継続した検討が必要である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hasegawa T, Ukai W, Jo DG, Xu X, Mattson MP, Nakagawa M, Araki W, Saito T, Yamada T : Homocysteic acid induces intraneuronal accumulation of neurotoxic Abeta42 : implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Neurosci Res.* **80** : 869-876, 2005
- 2) Hirata K, Yamaguchi H, Takamura Y, Takagi A, Fukushima T, Iwakami N, Saitoh A, Nakagawa M, Yamada T : A novel neurotrophic agent, T-817MA [1-{3-[2-(1-benzothiophen-5-yl)ethoxy]propyl}-3-azetidino] maleate, attenuates amyloid-beta-induced neurotoxicity and promotes neurite outgrowth in rat cultured central nervous system neurons. *J Pharmacol Exp Ther.* **314** : 252-259, 2005
- 3) Tsuboi Y, Baba Y, Doh-ura K, Imamura A, Fujioka S, Yamada T : Diffusion-weighted MRI in familial Creutzfeldt-Jakob disease with the codon 200 mutation in the prion protein gene. *J Neurol Sci.* **232** : 45-49, 2005
- 4) 吉田香織, 中荘ひとみ, 遠嶋由紀, 小林誠子, 糸永嘉子, 吉田ユリ子, 杉村美佳, 中野正剛, 山田達夫 : 安心院地区の独居老人

における認知障害調査結果(第一報). *地域保健* **36** : 80-85, 2005

- 5) Matsunaga Y, Yamada T. Hydrolytic Activity of Amyloid-beta and its Inhibition with Short Peptides. *Curr Med Chem* **5** : 165-170, 2005
 - 6) Satoh K, Hata M, Shimizu T, Yokota H, Akatsu H, Yamamoto T, Kosaka K, Yamada T : Lib, transcriptionally induced in senile plaque-associated astrocytes, promotes glial transmigration through extracellular matrix. *BBRC* **335** : 631-636, 2005
 - 7) Nakano S, Yamashita F, Matsuda H, Kodama C, Yamada T : Relationship between Delusions and Regional Cerebral Blood Flow in Alzheimer's Disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* **21** : 16-21, 2006
 - 8) 坪井義夫, 堂浦克美, 山田達夫 : プリオン病の治療ー経口キナクリン療法とペントサン硫酸の脳室内持続投与法の現状ー. 特集 : 治療の最前線 : 神経疾患の先端的治療. *Brain Medical* 2005. **17** : 59-64.
 - 9) 坪井義夫, 堂浦克美, 山田達夫 : プリオン病の治療ーペントサンポリサルフェート脳室内持続投与ー. *神経内科* 2005 ; **63** : 441-445
 - 10) 田中美紀, 坪井義夫, 山田達夫 : プリオン病の治療ーキナクリン・キニーネ治療ー. *神経内科* 2005 ; **63** : 446-451
 - 11) 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)平成16年度分担研究報告書 pp.8-9
- ### 2. 学会発表
- 1) 坪井義夫, 堂浦克美, 藤木富士夫, 山内淳史, 片岡泰文, 山田達夫 : Creutzfeldt-

Jakob病(CJD)に対する治療プロトコールの再考. プリオン病及び遅発性ウイルス感染に関する調査研究班. 平成 16 年度班会議. (平成 17 年 1 月 24 日, 全共連ビル, 東京)

- 2) 坪井義夫: プリオン病治療の現状と展望. プリオン病及び遅発性ウイルス感染に関する調査研究班. サーベイランス委員会・Creutzfeldt-Jakob 病(CJD)サーベイランスに関する全国担当者会議. (平成 17 年 2 月 10 日, 国際会議場, 東京)
- 3) 坪井義夫, 堂浦克美, 山田達夫. CJD の新

しい治療法の試みーペントサンポリサルフェート脳室内持続投与 2005 年プリオン研究会(天童ホテル, 平成 17 年 8 月 26ー27 日)

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

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし