

にAβ 40アミロイド沈着の減少も認められた。これより一旦沈着した脳Aβアミロイドの除去効果が確認された。脳内アミロイド除去効果のメカニズムを検証する目的で施行した脳・脳脊髄液・血液中AβのELISAにおける検討では、BC05抗体投与マウスでは未治療群と比較し血液中Aβ40濃度には著変が認められなかったが、Aβ 42では血液中に約2倍・脳脊髄液中には約6倍量の選択的増加を認めた。一方、脳内リン酸緩衝液可溶性及びアミロイド分画（蟻酸抽出）中Aβ 42濃度は治療群でむしろ増加していた。

D. 考察

今回の検討から、Aβ42分子種特異的モノクローナル抗体による受動免疫療法では、若年マウスでの検証からは脳内アミロイド沈着抑制効果が、また老齢マウスにおける検証からは一旦沈着した脳内アミロイド除去効果が観察された。Aβ42分子種特異的モノクローナル抗体による受動免疫療法は予防・治療の両効果を併せ持つことが明らかとなった。この治療効果発現のメカニズムとしては、以下に述べる脳内におけるAβ分子種への修飾が考えられた。まず第一点は、脳内におけるAβの存在様式への修飾である。腹腔内・脳室内投与いずれにしても不溶性画分から可溶性画分へとAβの存在様式が変化することで、アミロイド沈着を逆行させ（不溶性から可溶性へのシフト）、脳内から脳外へのクリアランスを促進させる効果が認められた。その際、より選択的な標的のみ（Aβ 42）のクリアランスが為されうることも明らかとなった。

現在脳内Aβオリゴマーが記憶障害を引き起こす元凶であるとの知見が集積されてきており、本年度施行したAβ42分子種特異的モノクローナル抗体による受動免疫療法が、Aβ42オリゴマーを標的とし、そのオリゴマーからモノマーへの移行を促進することで脳外へとクリアランスをさせ、治療効果を発揮している可能性も示唆される。今後、脳内Aβオリゴマー分子の詳細な検討が必要である。

E. 結論

Aβ42分子種特異的モノクローナル抗体による受

動免疫療法は脳内アミロイド沈着抑制効果と一旦沈着した脳内アミロイド除去効果を併せ持つ。この効果は脳内でのAβの存在様式修飾に起因した、脳内から脳外へのAβ42選択的なクリアランスによることが判明し、Aβ42分子種特異的モノクローナル抗体による受動免疫療法はアルツハイマー病治療薬として有望であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kawarabayashi T, **Shoji M**, Younkin L, Wen-Lang L, Dickson DW, Murakami T, Matsubara E, Abe K, Ashe KH and Younkin SG, Dimeric Aβ Rapidly Accumulates in Lipid Rafts Followed by ApoE and Phosphorylated Tau as Memory is Impaired in the Tg2576 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Neuroscience* 24: 3801-3809, 2004.

2) Asami-Odaka A, Obayashi-Adachi Y, Matsumoto Y, Takahashi H, Fukumoto H, Horiguchi T, Suzuki N, and **Shoji M**. Passive immunization of the Aβ42(43) C-terminal-specific antibody BC05 in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurodegenerative Disease* 2: 36-43, 2005.

2. 学会発表

1) Kawarabayashi T, Xu W, **Shoji M**, Matsubara E, Deguchi K, Murakami T, Takehisa Y, Nagata, T, Hayashi, T, and Abe K: Immune response to Aβ40 and tolerance to Aβ42 occur naturally without relationship to brain Aβ burden. X VIII th World Congress of Neurology, Sydney, Nov 5-11, 2005.

2) Kawarabayashi T, Xu W, **Shoji M**, Matsubara E, Deguchi K, Murakami T, Takehisa Y, Nagata T, Hayashi T, and Abe K: Immune response to Aβ40 and tolerance to Aβ42 occur naturally without relationship to brain Aβ burden. *Neuroscience* 2005, the Society for Neuroscience 35th Annual Meeting, Washington DC, Nov 12-16, 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得 脳 Aβ42 選択的除去療法 特願

2003-317443

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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)
アミロイドーシスに関する調査研究班 分担研究報告書

遺伝性アルツハイマー病における脳内 A β アミロイド沈着への血清 アミロイド P 成分の関与に関する研究

分担研究者 前田秀一郎 山梨大学・大学院・医学工学総合研究部・生化学
共同研究者 Henny Wati*, 河西あゆみ**, 伊藤禎洋***, 東海林幹夫****, 瓦林 毅*****,
松原悦朗*****, 河野裕夫*****, 石原得博*****

*山梨大学大学院医学工学総合研究部生化学、**同分子情報伝達学、
山梨大学総合分析実験センター、*弘前大学医学部脳神経統御部門、
*****岡山大学大学院医歯学総合研究科神経病態内科、
*****国立長寿医療センター研究所アルツハイマー病研究部、
*****山口大学医学部構造制御病態学

研究要旨 遺伝性アルツハイマー病のトランスジェニックマウスモデル (APPsw; Tg2576) と我々が作製した無血清アミロイド P 成分 (Apcs; Sap) マウスを用いて、昨年度に引き続き、遺伝性アルツハイマー病での脳内 A β アミロイドの沈着に Sap がどう関与するかを解析し、以下の結果を得た。

11~25 カ月齢の Apcs 欠損 APPsw 37 匹につき、脳内 A β アミロイド沈着程度を、同月齢の対照ヘテロ接合体 APPsw 合計 35 匹と比較解析した。この結果、18 カ月齢までは両者に差異を認めなかった。しかし、25 カ月齢の高齢マウスにおいては、Sap が脳内 A β アミロイドの沈着を促進することを示唆する結果を得た。

A. 研究目的

血清アミロイド P 成分 (SAP; APCS) は肝で合成される血清糖蛋白質で、種々のアミロイドーシスで沈着するアミロイドに共通に数~20% の構成成分として含まれ、アミロイド形成を促進すると考えられている。一方、SAP のリガンドの一種である低分子化合物を *in vivo* でアミロイドに作用させると、アミロイドから SAP が除去され、分解され易くなる可能性が報告され、この化合物は、種々のアミロイドーシスに有効な治療薬として注目された。そこで本研究は、この遺伝性神経難病の治療法や予防法を確立することを目的に、遺伝性アルツハイマー病のトランスジェニックマウスモデル (APPsw) と我々が作製した無 Sap マウスを用いて、遺伝性アルツハイマー病での脳内 A β アミロイドの沈着に Sap がどう関与するかを解析する。

B. 研究方法

Hsiao 博士から供与された、スウェーデンの早期発症型遺伝性アルツハイマー病の原因となるヒトの変異アミロイド前駆体蛋白 (APP) 遺伝子を運ぶトランスジェニックマウス (APPsw; Tg2576) と我々が確立した無 Sap マウス株とを交配させて得た Sap 欠損 APPsw と対照ヘテロ接合体 APPsw とにおける脳内 A β アミロイド沈着の開始時期や程度を、月齢を追って比較解析し、A β アミロイドの沈着に Sap がどう関与するかを解析した。脳内 A β アミロイドの沈着は、コンゴー赤染色法、およびポリクローナル抗 A β 抗体 (A β 9204) を用いて検出した。A β 9204 で染色されたマウス脳切片は AxioCam (Carl Zeiss) にてデジタル化し、Image-Pro Plus Ver4.5 (Plantron) を用いて染色陽性部位 (アミロイド斑 + 血管アミロイド) の面積と大脳皮質全体の面積の比を計測した。計測はマウスあたり 4 切片で行った。血清中のアミロイド前駆体タンパク

質 (APP) は、抗 APP C 末端抗体、Saeko を用い、ウエスタンブロット法で検出した。

(倫理面への配慮)

マウスの飼育およびマウスを用いた実験は、山梨大学の動物実験専門委員会の承認を得て行った。動物愛護の観点から倫理的に問題は無いと考えられる。

C. 研究結果

まず、Sap 欠損 APPsw と対照ヘテロ接合体 APPsw 血清中の APP 量をウエスタンブロット法で比較、解析したところ両者に差異を認めなかった。

そこで、11~25カ月齢のSap欠損APPsw 37匹につき、脳内Aβアミロイド沈着程度を、同月齢の対照ヘテロ接合体APPsw 合計35匹と比較解析した(11~12カ月齢のSap欠損APPsw 9匹、同月齢のヘテロ接合体APPsw 10匹; 13~14カ月齢のSap欠損APPsw 10匹、同月齢のヘテロ接合体APPsw 8匹; 15~16カ月齢のSap欠損APPsw 8匹、同月齢のヘテロ接合体APPsw 8匹; 18カ月齢のSap欠損APPsw 6匹、同月齢のヘテロ接合体APPsw 5匹; 25カ月齢のSap欠損APPsw 4匹、同月齢のヘテロ接合体APPsw 4匹)。この結果、18カ月齢までは両者に差異を認めなかった。しかし、25カ月齢の高齢マウスにおいては、Sapが脳内Aβアミロイドの沈着を促進することを示唆する結果を得た(表)。さらに、25カ月齢の高齢マウスにおけるアミロイド斑と血管アミロイドの沈着程度を解析し、前者には、有意な差異を認めないが、後者に差異を認めることを見出した。また、18カ月齢及び25カ月齢のヘテロ接合体APPswマウス脳内に沈着したAβアミロイドに、抗マウスSap抗体が結合するかどうかを、免疫組織化学的に調べたが、明らかな結合を認めなかった。

D. 考察

免疫組織化学な解析では、ヘテロ接合体 APPsw 脳内に沈着した Aβアミロイドは、抗マウス Sap 抗体と反応しなかった。Sap の主要産生臓器は肝であり、本結果は、若齢マウスでは、血液脳関門により Sap の脳実質への移行が阻害

されていることを示唆する。従って、高齢のモデルマウスではおそらく血液脳関門の機能が低下し、Sap が脳実質へ移行して、Aβアミロイドの沈着を促進すると考えられる。しかし、25カ月齢の高齢ヘテロ接合体 APPsw マウスでも抗マウス Sap 抗体は、Aβアミロイドと反応しなかった。この結果は、高齢のモデルマウスで血液脳関門の機能が低下し、Sap が血中より脳内に移行したとしても、光学顕微鏡を用いた、通常の免疫組織化学的方法で検出できる量の Sap は、未だ Aβアミロイドに結合していないことを示唆する。今後、より鋭敏な方法で解析することが必要であろう。

E. 結論

高齢マウスにおいては、Sap が遺伝性アルツハイマー病のモデルマウスにおける脳内 Aβアミロイドの沈着を促進することを示唆する結果を得た。この結果から、アルツハイマー病の予防を目的として、血中 SAP 濃度を下げる等の方法により Aβアミロイドへの SAP の結合を阻害しても、アルツハイマー病の発症時期を遅らせることはできないが、その進行を遅らせることはできる可能性があると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Terazaki H, Ando Y, Fernandes R, Yamamura KI, Maeda S, Saraiva MJ: Immunization in familial amyloidotic polyneuropathy: Counteracting deposition by immunization with a Y78F TTR mutant. *Lab Invest* 86(1):23-31, 2006.

2) Inoue S, Kawano H, Ishihara T, Maeda S, Ohno S: Formation of experimental murine AA amyloid fibrils in SAP-deficient mice: High resolution ultrastructural study. *Amyloid* 12(3):157-163, 2005.

3) Tamaoki T, Tezuka H, Okada Y, Ito S, Shimura H, Sakamoto M, Endo T, Ozaki Y, Kanba S, Maeda S: Avoiding the effect of linked genes is crucial to

elucidate the role of *Apcs* in autoimmunity. *Nature Medicine* 11(1):11-12, 2005.

4) 前田秀一郎, 伊藤禎洋: 遺伝子改変マウスを用いた家族性アミロイドポリニューロパチー発症の分子機構の解析. 「アミロイドーシスの基礎と臨床」石原得博監修、池田修一編、pp68-74、金原出版、東京、2005.

2. 学会発表

1) Wati Henny, 瓦林毅、河西あゆみ、伊藤禎洋、松原悦朗、東海林幹夫、前田秀一郎: 遺伝性アルツハイマー病における A β アミロイド沈着への血清アミロイドP成分の関与に関する研究. 第28回日本分子生物学会年会、福岡、12月8日、2005年.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Aβ deposition in the cortex

Tg2576/Apcs +/- Tg2576/Apcs +/-

Age (months)	Mean ±SD	N	Mean ±SD	N
11-12	0.000317624 ± 0.000554483	10	0.000267011 ± 0.000396547	9
13-14	0.000817361 ± 0.000735528	8	0.001183822 ± 0.000933003	10
15-16	0.002203034 ± 0.001481389	8	0.00220735 ± 0.001737686	8
18	0.002539189 ± 0.001556779	5	0.003363676 ± 0.004334413	6
25 *	0.008976529 ± 0.004265247	4	0.006403921 ± 0.004267122	4
P<0.01				

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)

アミロイドーシスに関する調査研究班 分担研究報告書

アルツハイマー病患者の脳脊髄液は β アミロイド線維形成を促進する

分担研究者 山田正仁 金沢大学大学院脳老化・神経病態学 (神経内科)

共同研究者 小野賢二郎*、野口もえ子*、松本泰子*、柳瀬大亮*、岩佐和夫*、内木宏延**

*金沢大学大学院脳老化・神経病態学 (神経内科)、

**福井大学医学部病因病態医学講座・分子病理学領域

研究要旨 健常者脳においてなぜアミロイド β 蛋白 ($A\beta$) が凝集して β アミロイド線維 ($fA\beta$) を形成しないかを明らかにする目的で蛍光色素チオフラビン T (ThT) 法および電子顕微鏡を用いてアルツハイマー病 (AD) 患者と non-AD 患者の脳脊髄液が $fA\beta$ 形成に及ぼす影響を解析した。両群の脳脊髄液はともに $fA\beta$ 形成を抑制したが、non-AD 患者群の方が AD 患者群に比し、強い抑制効果を示した。また、AD 患者群における $fA\beta$ 形成の最終平衡値は脳脊髄液中における $A\beta(1-42)$ レベルと有意な逆相関を示した。AD 脳における $fA\beta$ 沈着は脳脊髄液中の特異的な因子の増減によって反映されている可能性がある。

A. 研究目的

脳内における $A\beta$ の沈着がアルツハイマー病 (AD) における特異的な病態である。 $A\beta$ は、細胞の正常な代謝産物で健常人の脳脊髄液や血漿からも検出されるが、今回、我々は、健常者脳においてなぜ、 $fA\beta$ が形成されないかを明らかにする目的で AD 患者と non-AD 患者の脳脊髄液が $fA\beta$ 形成に及ぼす影響を解析した。

B. 研究方法

pH 7.5、37°Cにおいて、AD 患者 40 名、non-AD 患者 40 名から得られた脳脊髄液が $fA\beta(1-40)$ および $fA\beta(1-42)$ の形成に及ぼす影響を、ThT を用いた分光蛍光定量法、及びネガティブ染色後の電子顕微鏡観察を用いて経時的に観測した。また、脳脊髄液中の $A\beta(1-42)$ 、tau、総蛋白、IgG 値を測定し、 $fA\beta$ 形成の最終平衡値との相関を調べた。

(倫理面への配慮)

AD 患者及び non-AD 患者の脳脊髄液採取は本人、または家族から十分なインフォームドコンセントを書式にて得てから行われた。

C. 研究結果

AD患者群、non-AD患者群から得られた脳脊髄液はともに $fA\beta(1-40)$ および $fA\beta(1-42)$ 形成を抑制したが、non-AD患者群の方がAD患者群に比し、強い抑制効果を示した (図1)。電顕観察においてもAD患者群では多くの短い線維が観察されたが、non-AD患者群では線維はほとんど観察されず、無構造な凝集体が観察された。また、AD患者群における $fA\beta$ 形成の最終平衡値は脳脊髄液中における $A\beta(1-42)$ レベルと有意な逆相関を示した一方で (図2)、tau、総蛋白、IgGレベルとは有意な相関を示さなかった。

D. 考察

今回の実験で我々は、AD 患者 40 名と non-AD 患者 40 名の脳脊髄液が $fA\beta$ 形成に及ぼす影響を解析した。Wisniewski らは、AD 患者 5 名と non-AD 患者 5 名の脳脊髄液の影響を解析したところ、両群ともに抑制効果を示すが、両群に有意な差は見られなかったと報告している。ただ、彼らの研究は患者数が少なく、測定方法も予備的であったため、有意な差が認められなかった可能性がある。

これまでにアポリポ蛋白 E (ApoE)、ApoJ、

$\alpha 2$ マクログロブリン、トランスサイレチン、抗 A β 抗体などの因子が fA β 形成を抑制することが報告されている一方で、アンチキモトリプシンや ApoE などの因子が fA β 形成を促進することが報告されている。よって、脳脊髄液中のこれらの抑制因子や促進因子の総バランスによって fA β 形成への抑制効果が規定されている可能性がある。

また、AD 患者群における fA β 形成の最終平衡値が脳脊髄液中の A β (1-42) レベルと有意な逆相関を示したが、このことから脳内の A β 凝集に伴う A β 消費と平行して脳脊髄液中の特異的な抑制因子もトラップされている可能性があると考えた。

E. 結論

AD 脳における fA β 沈着は脳脊髄液中の特異的な因子の増減によって反映されている可能性がある。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ono K, Hasegawa K, Naiki H, Yamada M. Preformed beta-amyloid fibrils are destabilized by coenzyme Q10 in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 330: 111-116, 2005.
- 2) Hirohata M, Ono K, Naiki H, Yamada M. Non-steroidal anti-inflammatory drugs have anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. *Neuropharmacology* 49: 1088-1099, 2005.
- 3) Ono K, Hirohata M, Yamada M. Ferulic acid destabilizes preformed beta-amyloid fibrils in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 336: 444-449, 2005.
- 4) Ono K, Noguchi M, Matsumoto Y, Yanase D, Iwasa K, Naiki H, Yamada M. Cerebrospinal fluid Alzheimer patients promotes beta-amyloid fibril formation in vitro. *Neurobiol Dis* 20: 233-240, 2005.
- 5) Ono K, Hasegawa K, Naiki H, Yamada M. Anti-Parkinsonian agents have anti-amyloidogenic activity

for Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. *Neurochem Int*, in press.

- 6) Ono K, Hirohata M, Yamada M. alpha-lipoic acid exhibits anti-amyloidogenicity for beta-amyloid fibrils in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, in press.
- 7) 山田正仁：アルツハイマー病の病因。日本医師会雑誌 134: 1007-1011, 2005。
- 8) 山田正仁：痴呆の診断と治療—アルツハイマー病を中心に—。リハビリテーション医学 42: 1007-1011, 2005。
- 9) 坂井健二、山田正仁：アルツハイマー病の血管病理。脳と循環 10: 25-28, 2005。

2. 学会発表

- 1) 小野 賢二郎、長谷川一浩、内木宏延、山田正仁：タンニン酸によるアルツハイマー病 β アミロイド線維の分解効果。第 45 回日本神経学会総会。鹿児島。2005 年 5 月 25-27 日。
- 2) 廣畑美枝、小野 賢二郎、内木宏延、山田正仁：NSAIDs による β アミロイド線維形成・伸長抑制および不安定化作用。第 45 回日本神経学会総会。鹿児島。2005 年 5 月 25-27 日。
- 3) 小野賢二郎、山田正仁：ワイン関連ポリフェノール類によるアルツハイマー病 β アミロイド線維の分解効果。第 2 回日本カテキン学会。横浜。2005 年 6 月 5-6 日。
- 4) 山田正仁、小野賢二郎、浜口毅、内木宏延：Anti-amyloidogenic effects of polyphenols: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease。第 48 回日本神経化学学会大会。福岡。2005 年 9 月 28-30 日。
- 5) 小野賢二郎、吉池裕二、高島明彦、長谷川一浩、内木宏延、山田正仁：Vitamin A exhibits potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects in vitro。第 48 回日本神経化学学会大会。福岡。2005 年 9 月 28-30 日。
- 6) 小野賢二郎、野口もえ子、松本泰子、柳瀬大亮、岩佐和夫、内木宏延、山田正仁：アルツハイマー病患者の髄液は β アミロイド形成を促進する。第 24 回日本痴呆学会。大阪。2005 年 9 月 30 日-10 月 1 日。
- 7) 野口もえ子、柳瀬大亮、松本泰子、佐村木美

晴、小野賢二郎、山田正仁：非典型的脳血流パターンを示すアルツハイマー病：MRI、髄液マーカー、ApoE フェノタイプの特徴。第 24 回日本痴呆学会。大阪。2005 年 9 月 30 日-10 月 1 日。

2. 実用新案登録なし。
3. その他なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

アルツハイマー病の検査方法。特願 2005-104850。

図 1. AD 患者群および non-AD 患者群の fA β (1-40)(A)および fA β (1-42)(B)

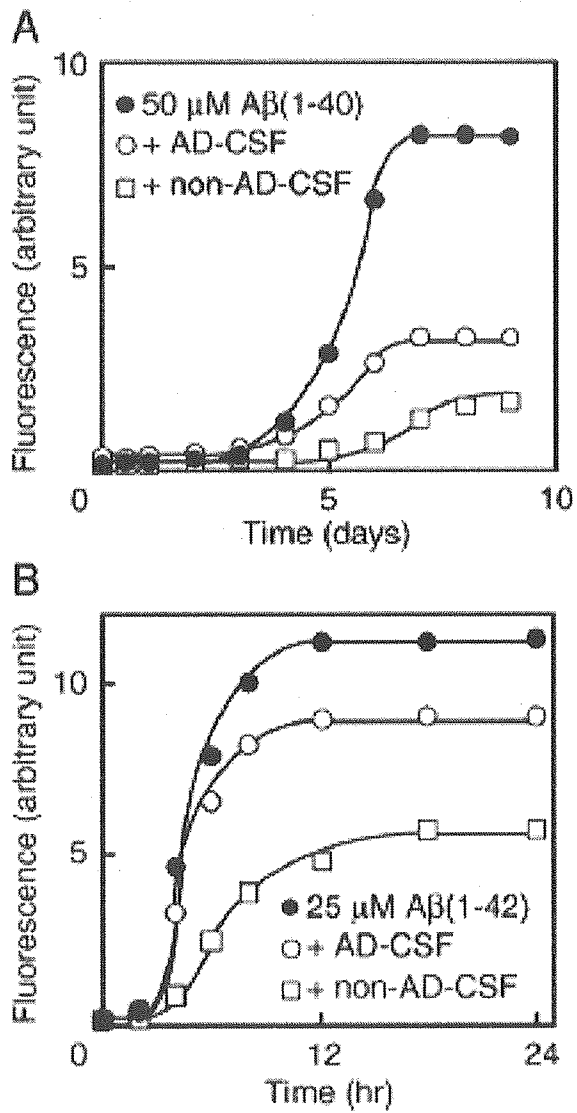
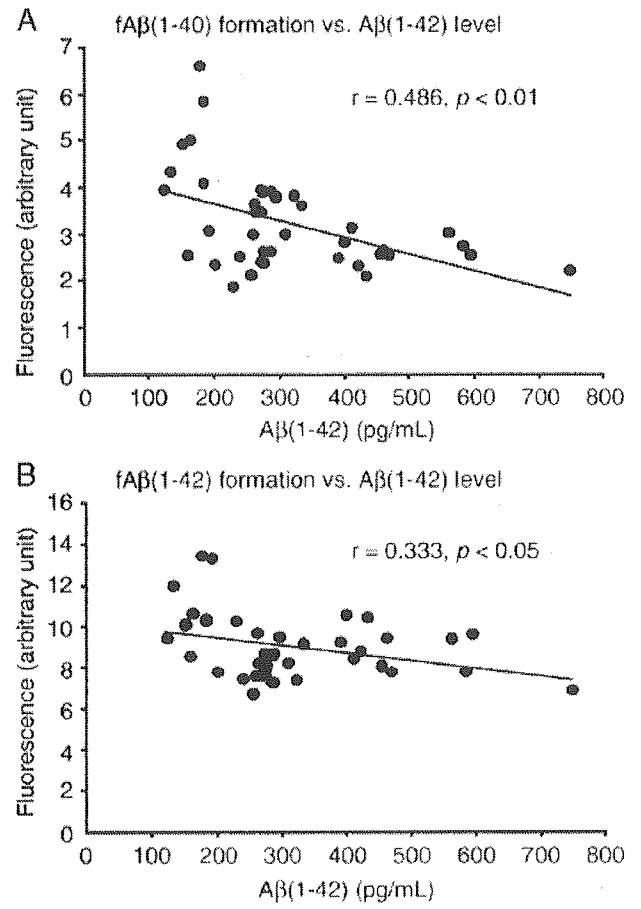


図 2. AD 患者群における fA β (1-40)(A)および fA β (1-42)(B)形成の最終平衡値と脳脊髄液中の A β (1-42)レベルとの相関



厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)
アミロイドーシスに関する調査研究 分担研究報告書

我が国における脳アミロイドアンギオパチーに関する全国疫学調査

分担研究者 山田正仁 金沢大学大学院脳老化・神経病態学 (神経内科)
共同研究者 廣畑美枝*、吉田光宏*、池田修一**、玉岡晃***、葛原茂樹****、
東海林幹夫*****、安東由喜雄*****、徳田隆彦*****
*金沢大学大学院脳老化・神経病態学 (神経内科)、
**信州大学医学部神経内科、リウマチ・膠原病内科、
筑波大学臨床医学系神経内科、*三重大学医学部神経内科、
*****岡山大学大学院神経病態内科学、*****熊本大学臨床検査医学、
*****京都府立医科大学神経内科

研究要旨 我が国における脳アミロイドアンギオパチー (CAA)、中枢神経系限局性血管炎 (IACNS) の疫学病態を明らかにするため、世界初となる CAA 全国疫学調査を行った。「CAA に関連する脳出血の診断基準」および「IACNS の診断基準」を作成後、平成 15 年に、全国の主要な神経内科 (625 施設)、脳神経外科 (378 施設)、および病理 (375 施設)、計 884 施設 1378 部門を対象に、郵送によるアンケート方式で第 1 次全国調査を実施した。第 1 次調査の結果、CAA 関連脳出血のべ 794 例、CAA 関連他病態 21 例、IACNS 64 例を見出した。その結果をもとに、平成 16~17 年度に第 2 次全国調査を実施し、個々の症例についての詳細な調査を行った。第 2 次調査の結果、CAA 関連脳出血患者は、総数 303 例 (平均 74.9±8.4 歳)、男性 43.5% (平均 73.7±7.9 歳)、女性 56.5% (平均 75.8±8.6 歳) のデータが集計され、剖検による「確実」例 9 例、生検陽性の「ほぼ確実」例 34 例、「臨床的にほぼ確実」例 93 例、「疑い」例 167 例他であった。CAA 関連脳出血の全国患者数 (5 年間) は 2882 人と推定された。

A. 研究目的

脳アミロイドアンギオパチー (cerebral amyloid angiopathy: CAA) は高齢者でしばしばみられ、高齢者の脳血管障害や痴呆 (認知症) と関連する重要な疾患であるが、その疫学調査は、世界的にみてもこれまで行われていない。一方、中枢神経系限局性血管炎 (isolated angitis of the CNS: IACNS) は、時に CAA に合併してみられ、的確に診断すれば治療可能な病態であるが、やはりこれまで調査されていない。

本研究は、CAA、IACNS の診断基準を作成し、我が国における疫学病態、患者数を明らかにし、これにより本症の病態解明、早期診断法や治療法の確立に寄与することを目的とした。

B. 研究方法

1. 診断基準

調査に先立ち、2003年8月に京都で開催された当研究班の脳アミロイドーシス分科会において、『CAAに関連する脳出血の診断基準 (案)』および『IACNSの診断基準 (案)』を作成した。更に、本研究の調査項目が検討された。

2. 第1次全国調査

全国の主要な神経内科 (日本神経学会教育病院 221施設および教育関連病院404施設)、脳神経外科 (日本脳神経外科学会A項施設378施設)、および病理 (日本病理学会認定施設375施設)、計884施設1378部門を対象とした。

平成15年10月から12月を調査期間とし、対象施設に対し郵送によるアンケート方式で調査を行っ

た。過去5年間に、CAAに関連する脳出血と診断された症例の有無、症例数、その診断の確実さ、CAAに関連する脳出血以外の病態（白質脳症、痴呆（認知症）、IACNS、その他）と診断された症例の有無と患者数、IACNSと診断された症例の有無とその患者数を調査項目とした。

3. 第2次全国調査

第1次調査にて症例経験ありと回答した施設（神経内科83施設、脳神経外科59施設、病理28施設）計170部門を対象に第2次調査を実施した。

平成16～17年を調査期間とし、対象施設に個人調査票を送付し、記入後に返送を求める方式とした。調査票は、「CAAに関連する脳出血」「CAAに関連する白質脳症/痴呆（認知症）」「IACNS」について作成し、個々の症例の病歴、症候、検査所見、病理、臨床経過などを調査項目とした。

4. 倫理面への配慮

いずれの調査も、疫学研究に関する倫理指針に基づき、金沢大学・医の倫理審査委員会の審査、承認を得た。

C. 研究結果

1. 診断基準

『CAAに関連する脳出血の診断基準（案）』（表1）、『IACNSの診断基準（案）』（表2）を作成した。

2. 第1次全国調査

418施設の481部門より回答を得た（回答率34.9%）。CAA関連脳出血のべ794例、CAAに関連する他の病態病変（白質脳症、痴呆、IACNS、他）21例、IACNS 64例を見出した。

3. 第2次全国調査

CAA関連脳出血については、回答が有意であった患者数は、総数303例（平均74.9±8.4歳）、男性43.5%（平均73.7±7.9歳）、女性56.5%（平均75.8±8.6歳）であった。診断レベル別では、剖検による「確実」9例、生検陽性の「ほぼ確実」34例、「臨床的にほぼ確実」93例、「疑い」167例他のデータが集計された。

CAA関連脳出血患者の性別割合の検討では、「確実およびほぼ確実」例の群で、全国55歳以上人口（平成12国勢調査）と比べて、女性の割合が有意に高かった（ $p<0.05$ ）。

血腫の回数では、総数の28.4%に多発性出血がみとめられた。多発性出血のうち、再発性が67.4%で、同時多発が22.1%、再発+同時多発が5.8%であった。

血腫部位別頻度は、CT/MRI検査所見では、前頭葉および頭頂葉の頻度が他の部位に比べて有意に高く（ $p<0.001$ ）、これは脳病理所見でも裏付けられた（ $p<0.05$ ）。血腫のクモ膜下腔への交通の頻度は、CT/MRI検査で14.1%、脳病理所見で21.4%といずれも低かった。

IACNSについては、「確実」4例、「臨床的にほぼ確実」3例、「疑い」9例他のデータが集計された。

D. 考察

『CAAに関連する脳出血の診断基準（案）』、『IACNSの診断基準（案）』を作成し、CAAと、CAAと関係が深いIACNSの疫学調査を行った。CAA、IACNSの全国疫学調査は、我が国では初めてであり、世界的にみても類例がない。

CAAに関連する脳出血は、のべ794例に見いだされ、CAA関連脳出血の全国推定患者数（5年間）は、2882人と推定された。また、IACNSなどCAAに関連する脳出血以外の病態の存在も明らかになった。

第2次調査の結果、CAA関連脳出血の病像の特徴として、前頭葉および頭頂葉に好発すること、クモ膜下腔への穿破の割合が従来考えられていたよりも低率であることなどが明らかになった。今後、第2次調査の結果を更に詳細に解析すると共に、脳脊髄液等の診断マーカー、病理所見等を検討するために第3次調査を計画する予定である。

E. 結論

CAA関連脳出血の全国推定患者数（5年間）は、2882人と推定された。本症は、「確実およびほぼ確実」例で女性に多く、血腫部位別頻度は、前頭葉および頭頂葉が高かった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Hamaguchi T, Okino S, Sodeyama N, Itoh Y, Takahashi A, Otomo E, Matsushita M, Mizusawa H, Yamada M. Association of a polymorphism of the transforming growth factor- β 1 gene with cerebral amyloid angiopathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76: 696-699, 2005.

2) 坂井健二、山田正仁：アルツハイマー病の血管病理。脳と循環 5113-116, 2005.

2. 学会発表

1) 山田正仁：＜シンポジウム：脳卒中の分子遺伝学的アプローチ＞脳内出血の分子遺伝学。第30回日本脳卒中学会総会、岩手、2005.4.22

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 1. 脳アミロイドアンギオパチー (cerebral amyloid angiopathy: CAA) に関連する脳出血の診断基準 (案) *

1. 確実 (definite CAA)

剖検による完全な脳の検索により以下の 3 点が証明される：

- (1) 脳葉型、皮質あるいは皮質皮質下出血、
- (2) CAA 関連血管変化**を伴う高度な CAA、
- (3) 他の原因病変の欠除。

2. ほぼ確実 (生検組織の陽性所見を伴う) (probable CAA with supporting pathology)

臨床データおよび病理組織 (血腫吸引標本あるいは皮質生検) が以下の 3 点を示す：

- (1) 脳葉型、皮質あるいは皮質皮質下出血、
- (2) 標本内に CAA、
- (3) 他の原因病変の欠除。

3. 臨床的にほぼ確実 (probable CAA)

臨床データおよび MRI/CT が以下の 3 点を示す：

- (1) 脳葉型、皮質あるいは皮質皮質下に限局する多発性出血 (小脳出血を含む)、
- (2) 年齢 55 歳以上、
- (3) 他の出血の原因***の欠除。

4. 疑い (possible CAA)

臨床データおよび MRI/CT が以下の 3 点を示す：

- (1) 脳葉型、皮質あるいは皮質皮質下の単発性出血、
- (2) 年齢 55 歳以上、
- (3) 他の出血の原因***の欠除。

* Knudsen *et al. Neurology* 56:537, 2001 を改変

** CAA 関連血管変化：フィブリノイド壊死を伴う微小動脈瘤形成など

*** 他の脳出血の原因：高血圧、ワーファリン過量 (INR>3.0)、頭部外傷、虚血性脳血管障害、脳腫瘍、血管奇形、血管炎、血液疾患あるいは凝固障害

表 2. 中枢神経系限局性血管炎 (isolated angitis of the CNS: IACNS) の診断基準 (案) *

<p>1. 確実 (definite IACNS) *</p> <p>剖検あるいは生検によって得られた脳組織の検索により以下の 2 点が証明される：</p> <p>(1) 血管炎の所見が病理学的に確認されている。</p> <p>(2) 全身性の血管炎および他の原因疾患(膠原病、リンパ系腫瘍、敗血症、動脈硬化症、中毒など)が否定できる。</p> <p>2. 臨床的にほぼ確実 (probable IACNS) **</p> <p>臨床所見、検査データおよび画像所見が以下の 3 点を満たす：</p> <p>(1) 急性または亜急性に出現する神経症状 (意識障害、頭痛、幻覚、局所神経症状のいずれか 2 つ以上) を認める。</p> <p>(2) 脳血管撮影で複数箇所の動脈に求心性の狭窄病変を認める。</p> <p>(3) 全身性の血管炎および他の原因疾患(膠原病、リンパ系腫瘍、敗血症、動脈硬化症、中毒など)が否定できる。</p> <p>3. 疑い (possible IACNS) *</p> <p>臨床所見、検査データおよび画像所見が次ぎの 3 項目を満たし、他の原因疾患が否定される：</p> <p>(1) 急性または亜急性に出現する神経症状 (意識障害、頭痛、幻覚、局所神経症状のいずれか 2 つ以上) を認める。</p> <p>(2) 血沈の亢進あるいは髄液の蛋白増多(細胞増多、キサントクロミーを認めることもある)を認める。</p> <p>(3) 急性期の MRI/CT で以下の所見のいずれか 1 つを認める：</p> <ul style="list-style-type: none"> i) 皮質あるいは皮質下の腫瘤性病変、 ii) 多発性の白質病変、 iii) 皮質あるいは皮質下の出血性病変。
--

* Fountain NB and Eberhard DA. *Neurology* 46: 190-197, 1996

** Calabrese LH and Mallek JA. *Medicine(Baltimore)* 67: 20-39, 1988

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)
 アミロイドーシスに関する調査研究班 分担研究報告書

Cerebral Amyloid Angiopathy の脳脊髄液マーカー研究

分担研究者 葛原茂樹 三重大学医学部神経内科

共同研究者 伊藤伸朗*、金丸和富**、齊藤裕子***、石黒幸一****、村山繁雄*****

*三重大学医学部神経内科、**東京都老人医療センター神経内科、

東京都老人医療センター剖検病理科、**三菱化学生命科学研究所、

*****東京都老人総合研究所 老年病のゲノム解析研究チーム (神経病理)

研究要旨 孤発性 cerebral amyloid angiopathy (CAA)における、脳脊髄液(CSF)総 tau 蛋白、リン酸化 tau 蛋白、 β amyloid(1-42)の各生化学マーカーを検討した。脳葉型脳出血 (CAA 疑い)症例の CSF では AD 診断マーカーの変化が認められた。また、病理学的に診断された CAA 症例において、CAA の病期進行と β amyloid(1-42)値が逆相関していた。これらのマーカーの CAA の臨床診断に関しての有用性が示唆された。また、CAA がアルツハイマー病の病態と関連することが示唆された。

A. 研究目的

孤発性 cerebral amyloid angiopathy (以下CAA)は、高齢者の脳血管障害や痴呆症の原因として重要であり、さらにアルツハイマー病(AD)の痴呆への関与や治療との関係など様々な面において注目される疾患・病態である。新しい補助検査法を用いてのCAAの生前臨床診断についての検討、病態に関する基礎研究を行ない、脳出血、脳硬塞、痴呆症の診断、治療、予防につながる知見を得る。本年度はCAAの脳脊髄液を用いた生物学的マーカーを検討し、臨床診断に関する有用性、病態の考察を行なう。

B. 研究方法

対象：A.三重大学神経内科および関連病院にて臨床的に診断した高齢、非高血圧性の脳葉型脳出血(皮質あるいは皮質下型出血)一孤発性CAA8例 (probable CAA with supporting pathology 4例、probable CAA 4例) (70.0 \pm 6.7 yo)。うち4例に記銘力低下を中心とした進行性の認知症が認められた (CAA with dementia)。AD 67 例 (68.2 \pm 10.6 yo)、正常コントロール (NC) 40 例 (65.4 \pm 12.9 yo)。非痴呆性神経変性疾患コントロール(ND) (Parkinson病、脊髄小脳変性症) 68例 62.3 \pm 10.4 yo) を対照とした。

B.東京都老人医療センターにて剖検され脳病理学的に診断された孤発性CAA 18例 (definite CAA) (平均 80.8 \pm 6.1 yo)とCAAのない高齢者26例。CAAのstageは1:小血管壁のみ。2: 平滑筋に沈着し変性あり。3: 出血か梗塞を伴う、とした。各ステージの最終病理診断はCAA stage3 : AD(familial), CAA stage2 : AD 2例、DLBD/AD? 2例、CAA stage1 : AD, DLBD/AD?、PSP 2例、PSP/Grain Dementia(GD)?、NFTD/GD?、PD?/GD?/AD?、vascular dementia(VD) 3例、small fiber neuropathy、leukemic embolism CAA stage0.5 : PDD/AD?、CAA stage0 : AD/DLB、PD、PD with dementia、DLB/GD、PSP 3例、CBD 3例、GD 2例、motor neuron disease 4例、Creutzfeldt Jacob disease 2例、VD 2例、polymyositis、hydrocephalus。方法：腰椎穿刺 (脳出血例は血腫改善後) にて採取し-80℃凍結保存したCSF検体を以下を用いて測定。CSF total-tau測定：フィノスカラーhTAU。CSF phosphorylated-tau 測定：CSF phospho-tau(serine199部位リン酸化tau)測定ELISA Kit (三菱科学生命科学研究所) (A)。CSF phospho-tau(serine181部位リン酸化tau)測定ELISA (Innotest p-TAU) (B)。CSF A β 測定：Human β amyloid (1-42) ELISA Kit Wako、Human β amyloid (1-40) ELISA Kit Wako (A)。Human β amyloid (1-42) ELISA Kit

(Innogenetics) (B)。CSF cystatine C測定 (Aのみ) : Human cystatine C ELISA (BioVender)。

(倫理面への配慮) 本研究について三重大倫理委員会、東京都老人総合研究所倫理委員会にて審査承認。

C. 結果

A.臨床診断例 total-tau : AD 596.6 ± 336.5 pM (vs NC $p < 0.001$), NC 247.0 ± 122.8 , ND 254.8 ± 153.2 ($p = 0.9$), CAA 379.4 ± 338.6 ($p = 0.31$), CAA with dementia 457.7 ± 187.7 ($p = 0.12$). phospho-tau199 (図1-1) : AD 1.6 ± 0.7 pM (vs NC $p < 0.001$), NC 0.7 ± 0.4 , ND 0.8 ± 0.5 ($p = 0.46$), CAA 0.7 ± 0.3 ($p = 0.92$), CAA with dementia 1.3 ± 0.6 ($p = 0.06$). total-tau、リン酸化tauともにCAA8例中、痴呆例4/4、非痴呆例3/4例で基準値を超えていた。

A β 1-42 (図1-2) : AD 15.9 ± 6.3 pM (vs NC $p < 0.001$), NC 30.4 ± 10.0 , ND 23.7 ± 7.8 ($p < 0.001$), CAA 15.3 ± 7.6 ($p < 0.001$), CAA with dementia 14.8 ± 5.6 ($p < 0.001$). A β 1-40 : AD 1223.6 ± 812.8 pM (vs NC $p = 0.05$), NC 1494.3 ± 654.0 , ND 993.1 ± 413.5 ($p = 0.05$), CAA 1387.2 ± 713.7 ($p = 0.8$), CAA with dementia 727.4 ± 288.0 ($p = 0.04$). A β 1-42はCAA8例中、痴呆例4/4、非痴呆例3/4例で基準値を下回っていた。

Cystatin C : AD, NC, ALS, CAA, CAA with dementia. 各群でcystatin Cレベルに有意差は認めなかった。

B.剖検例 剖検例でのAD関連の病理変化である神経原線維変化 (NFT)、老人斑 (SP)、CAAと、total-tau、phospho-tau181、A β 42の相関を表1に示す。CAAのステージ進行とともにA β 1-42の低下がみられた (図2)。

D. 考察

CAAの頻度は年齢とともに増加し、60歳以上の約半数、90歳以上では70%以上に認められるとされる。またADでは80-90%の高率に認められる。CAAは臨床的には、非高血圧性の高齢者の脳葉型脳出血の原因として重要である他、Binswanger病様の白質脳症、肉芽腫性血管炎などの原因になりうる。ADの病態への関与については循環障害により神経障害を増悪させている可能性があるが、A β の動態への関与は明らか

かにされていない。CAAの病態解明、診断・治療方法の確立は高齢者の脳血管障害、脳血管性およびアルツハイマー型の認知症の対策に重要である。

CAAの臨床診断について、遺伝子変異のない孤発性CAAについては有用性が明らかに確立された診断マーカーはない。皮質・皮質下型脳出血についてはT2* (gradient-echo法) MRI画像により診断率向上が期待できる。しかし、生化学的な診断マーカーについては、これまでに脳脊髄液中のcystatine Cの低下などが報告されているが、十分に確立されたものはない。

今回検討した脳葉型出血例のAD関連のCSFマーカーは、多くの例で、ADでみられる変化 (CSF tau、phospho-tau増加とA β 1-42低下) を認めた。A β 1-40は痴呆例で平均値が低いものの、A β 1-40値は他群においても各例で値の差が大きいため少数例での評価は困難であり、ADの多数例につき検討した既報告などから考えて、有意な変化ではないと思われた。CAAの程度や脳出血と、老人斑、神経原線維変化などADの病理学的変化との関連はこれまで明らかにされていないが、今回の結果からは、脳出血を来すCAA—血管障害の高度なCAAの多くで、臨床的に認知症が明らかでない場合においても、少なくとも生化学的なレベルでは、ADの病態(A β 、tauともに)が生じており、それがCSFに反映されている可能性が示唆された。臨床的には、AD関連CSFマーカー異常は、CAAによる脳出血であることを裏付ける可能性がある。さらにapoE多型でE4,(E2) alleleの頻度の高さもCAAの存在を示唆するものであり、これらのマーカー検査はCAA臨床診断に有用であると考えられる。

剖検例では、病理学的なCAAの程度に相関してCSF A β (1-42)低下がみられた。(phospho-tauは弱い相関)。CAAによるA β 代謝の変化による可能性がある。しかし老人斑とA β (1-42)にも相関があり、脳実質のA β 沈着の影響を否定しえない。今回検討した臨床診断例 (脳出血例) についても臨床的にAD型の認知症を来している症例の割合が多いため、純粋にCAAによる変化を確認するためには、より多くの症例の検討、CAAのみ来すAPP mutation(L705Vなど)症例、もしくはそのmodel

mouseでの検討が必要である。

Cystatin C レベルには臨床診断 CAA、また高率に CAA をもつはずである臨床診断の AD でも変化を認めなかった。

E. 結論

AD 関連の CSF マーカー (と apoE 多型) は、CAA による脳出血であることを裏付ける補助検査として有用である可能性がある。また、AD と CAA の病態の関連については、CAA が AD の病態を促進している可能性があると考えられた。これらを明らかにするために、今後、より多くの症例での検討が必要である。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kuzuhara S, Kokubo Y : Atypical parkinsonism of Japan: amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism-dementia complex of the Kii peninsula of Japan (Muro disease): An update. *Mov Disord* 20(Suppl. 12) : S108-S113, 2005.

2) 葛原茂樹: 前頭側頭型痴呆. *Annual Review 神経* 2006 : 79-312, 2006

2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

図1-1
phospho-tau 199 (pM)

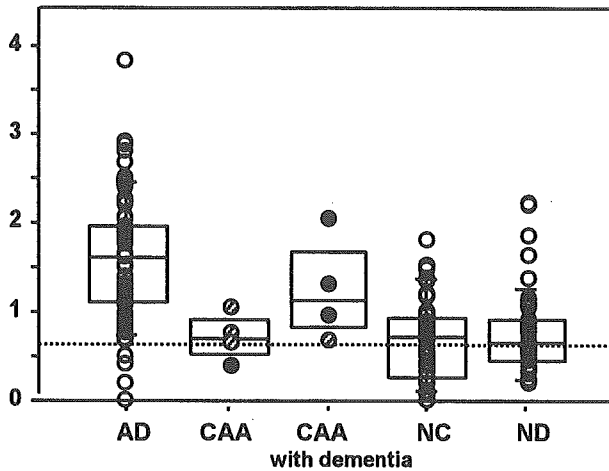


図1-2
Aβ 1-42 (pM)

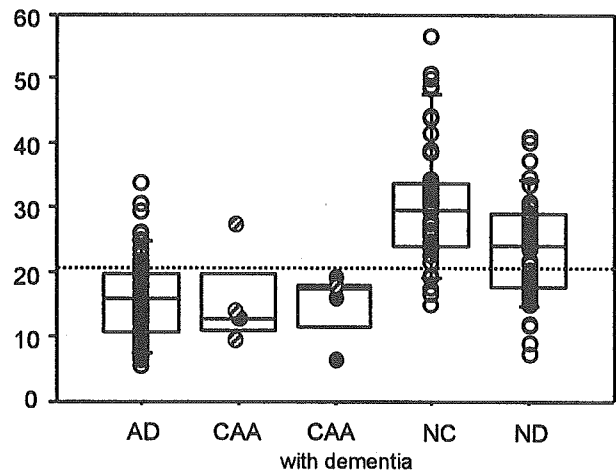


図1. 臨床診断例の各群のphospho-tau199とAβ 1-42

● probable CAA with supporting pathology ⊙ probable CAA

		NFT	SP	amyloid angiopathy
total-tau	r	-0.005	0.081	-0.032
	p	0.976	0.618	0.848
phospho-tau	r	0.534**	0.598**	0.374*
	p	0.003	0.000	0.042
Aβ42	r	-0.390*	-0.525**	-0.448**
	p	0.030	0.002	0.009

表1. 剖検診断例のCSF
マーカーと病理像

**強い相関、*弱い相関を示す。

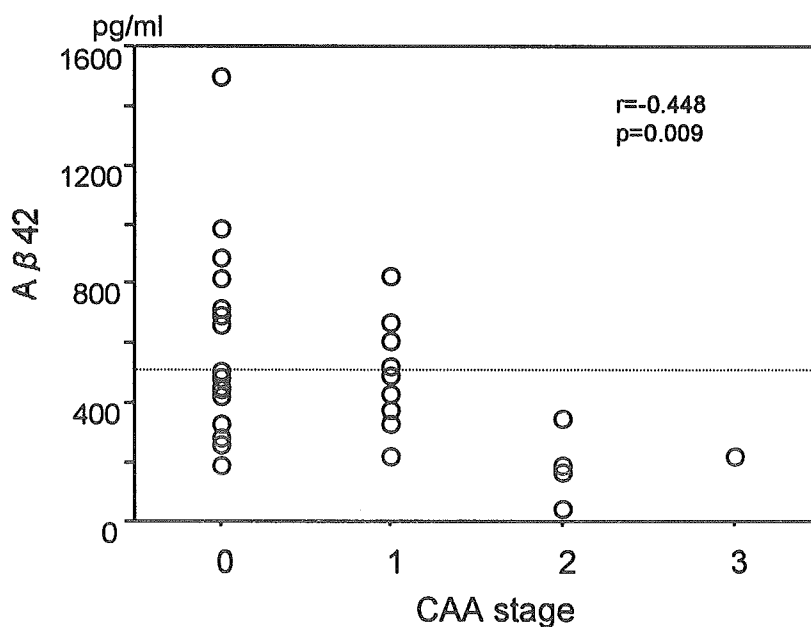


図2. 剖検診断例のCSF
Aβ 1-42とCAA stageの
相関

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)

アミロイドーシスに関する調査研究班 分担研究報告書

secondary amyloidosis における脂質代謝機構の検討 —高 SAA 血症マウスの DNA マイクロアレイによる解析—

分担研究者 中里雅光 宮崎大学医学部第三内科

共同研究者 伊達 紫 宮崎大学医学部第三内科

研究要旨 高 SAA 血症モデルマウスを作製し、肝臓における脂質代謝関連遺伝子の発現について、DNA マイクロアレイを用いて解析した。約 34,000 のマウス遺伝子のうち、肝臓において有意な発現が見られたものは、約 6,400 であった。その中で、高 SAA 血症マウスでは、127 の遺伝子発現が、コントロールに比べ 2 倍以上に増加しており、284 の遺伝子発現が 1/2 以下に減少していた。発現が増加した遺伝子の中に、脂質代謝関連遺伝子は含まれておらず、SAA family のうち、SAA1 が約 3 倍、SAA2 が約 20 倍に増加していた。また、TNF α 誘導膜蛋白、LPS 結合蛋白、メタロチオネインなども約 5~10 倍に増加していた。脂質代謝関連遺伝子では、中性脂肪を脂肪酸とグリセロールに分解する肝リパーゼや脂肪酸 β 酸化に関与する酵素群の遺伝子発現が、約 1/2~1/5 に減少しており、高 SAA 血症マウスにおける脂質のクリアランス低下が明らかになった。本研究結果から、secondary amyloidosis (AA アミロイドーシス) 発症における脂質代謝異常の関連が示唆された。

A. 研究目的

AA アミロイドーシスにおける脂質代謝機構を検討する目的で、カゼイン投与による高 SAA 血症マウスを作製し、1) 血中 SAA、中性脂肪、コレステロール、HDL-コレステロールの変化、2) SAA 産生細胞、3) DNA マイクロアレイによる遺伝子発現の変化について研究を行った。

B. 研究方法

1) AA アミロイドーシスモデルマウスの作製 8 週齢、雄性 C3H/He マウス を使用した。10% ミルクカゼインあるいは生食を 6 週間連続皮下投与 (各 n = 6) し、投与終了後、血液、肝臓、内臓脂肪を採取した。

2) 血清 SAA、中性脂肪、コレステロール、HDL-コレステロールの測定

カゼインあるいは生食 6 週間投与後、断頭採血し、血清 SAA は EIA キット (BioSource International, Inc.) を用い、中性脂肪、コレステロール、HDL-コレステロールは生化学自動分析装置 (富士ドライケム 3500) を用いて測定した。

3) 脂肪細胞における SAA 発現

カゼインあるいは生食 6 週間投与したマウスの腸間膜脂肪を採取し、ホルマリン固定後パラフィン切片を作製した。抗マウス SAA 抗体 (山口大学医学部構造制御病態学講座; 石原得博先生より供与) を用い、SAA 免疫活性を組織化学的に検討した。

4) DNA マイクロアレイによる遺伝子発現 カゼインあるいは生食 6 週間投与したマウス (各 n = 3) の肝臓より RNA を抽出し、reverse transcriptase により cDNA を作製後、in vitro transcription により cRNA を合成した。合成した cRNA を DNA マイクロアレイ; GeneChip[®] Mouse Genome 430 2.0 Array に hybridization させ、解析ソフト GeneSpring[®] 7.2 を用いて、カゼイン投与により 2 倍以上の発現増加を示す遺伝子、あるいは 1/2 以下の発現減少を示す遺伝子を同定した。

(倫理面への配慮)

実験動物にはその愛護に留意し、投与実験や屠殺の際の苦痛を最小限にとどめるように配慮した。