

No.10

痴呆性神経疾患鑑別の為の微量蛋白測定技術の開発研究

株式会社 ニッショー大館工場

報 告 要 旨

研究委託の名称	痴呆性神経疾患鑑別の為の微量蛋白測定技術の開発研究
企業名	株式会社 ニッショー
研究委託の目標	
<p>本研究は、主題である「脳活動に伴う二次信号の計測とその発生機序に関する研究」に関連する事業として、遺伝子および微量蛋白を用いた研究がどのように貢献できるかについて検討を加えることを目的とした。主にアルツハイマー型痴呆(AD)を例にとり、以下の3項目について、診断・治療経過および予後を客観的に検討する際に不可欠な遺伝子の検出方法の改善に関する技術開発、および特異的微量蛋白を測定する際の問題点を明らかにし、その有用性について検討した。</p>	
実施項目	
PCR改良法	熱伝導を高め、遺伝子増幅(PCR)の時間短縮の可能性について検討
痴呆症例の経時的変化	痴呆症例でのタウ蛋白およびApoE型の臨床的有用性について検討
痴呆症例の剖検所見	痴呆患者の剖検脳から遺伝子を抽出し痴呆のメカニズムについて検討
結 果	
<p>熱伝導を高めることで、PCRの時間短縮が可能になった。 タウ蛋白およびApoE型の測定は痴呆の診断に有用であった。 アルツハイマー型痴呆の神経細胞死には、非典型的アポトーシスが示唆された。 以上から、微量蛋白及び遺伝子の測定から痴呆をきたす疾患の鑑別が可能となった。 こうした研究は、主題の研究促進に有用であることが示された。</p>	
取得物件の利用計画	
PCRサーマルサイクラー 等電点電気泳動装置 電子天秤 マイクロプレートリーダー 製氷器	痴呆症例等から抽出した遺伝子の増幅に利用 微量蛋白の分画に利用 微量物質の定量に利用 微量蛋白の測定に利用 低温下でDNAの抽出をするのに利用

1. 新技術の概要

1.1 研究委託の内容

本研究は、主題である「脳活動に伴う二次信号の測定とその発生機序に関する研究」に関連する事業として、遺伝子および微量蛋白を用いた研究がどのように貢献できるかについて検討を加えることを目的とした。主にアルツハイマー型痴呆(AD)を例にとり、以下の3項について診断・治療経過および予後を客観的に検討する際に不可欠な遺伝子の検出方法の改善に関する技術開発、および特異的微量タンパクを測定する際の問題点を明らかにし、その有効性について検討した。

PCR改良法開発に関する検討

痴呆症例の経時的変化に関する検討

痴呆症例の剖検所見の検討

アルツハイマー型老年痴呆例のアポトーシスについて

1.2 工業所有権

特になし

2. 実施期間

平成8年1月16日～平成8年12月31日

3. 実施場所

秋田県立脳血管研究センター

所在地：秋田県秋田市千秋久保田町6番10号

株式会社ニッショー 大館工場

所在地：秋田県大館市二井田字羽貫谷地8-7

株式会社ニッショー 総合研究所

所在地：滋賀県草津市野路町700

4. 実施経過

項目/月	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PCR会両方に関する検討									
痴呆症例の経時的変化			
痴呆症例の剖検所見の			
まとめ											

..... 計画 _____ 実行

5. 研究委託の結果

5.1 実施項目

PCR改良法開発に関する検討

痴呆症例の経時的変化に関する検討

痴呆症例の剖検所見の検討

アルツハイマー型老年痴呆例のアポトーシスについて

5.2 実施結果

PCR改良法開発に関する検討

熱伝導性を高め、遺伝子増幅(PCR)の時間短縮の可能性について検討した。

アルミ容器による直熱方式では時間短縮ができたが、遺伝子が増幅されないことが判明した。

また、アルミ容器の表面をテフロンコーティングし、遺伝子の増幅を試みたが、こちらでも遺伝子の増幅は検出できなかった。

そこで、PCR時の温度設定、容器素材について検討し、直接方式での遺伝子増幅の際の温度変化を通常のマイクロチューブ使用時の温度変化と同じに調製したが、遺伝子の増幅は検出できなかった。次にマイクロチューブと同じ素材でシート状の容器を作製しPCRを行ったところ、遺伝子増幅を検出できた。

痴呆症例の経時変化に関する検討

AD症例では脳脊髄液中のタウ蛋白が有意に高値であり、ADの鑑別のためのマーカーとして有用であることが示唆された。のまたAD症例ではApoE遺伝子型の4が高頻度に認められ、4を持つ人ではAD発症年齢が早かった。ADの危険因子としての役割が示唆された。

しかし、剖検症例ではタウ蛋白がAD以外の症例においても異常に高値を示しており、これについては今後の課題となった。

痴呆症例の剖検所見の検討

アルツハイマー型老年痴呆例のアポトーシスについて

当初の計画では、脳脊髄液中のタウ蛋白濃度が剖検例での組織学的変化とどのように対応するかを検討する予定であったが、臨床例と異なり剖検例においては、タウ蛋白に各種の非特異的な要素が加わり、特に頭蓋内に出血を伴う例では異常高値を示す可能性があることが判明し、今後更に検討を要することが明らかになった。そこで、今回は典型的なアルツハイマー型痴呆例における神経細胞の変性消失を形態学的、生化学的に示されるアポトーシスによる細胞死を検討した。この結果、従来から示されているprogrammed cell deathの要素を残しながら、非典型的アポトーシスが示唆された。

以上から、微量蛋白および遺伝子の測定に関する研究から痴呆をきたす疾患の鑑別が可能となった。こうした研究は、主題である「脳活動に伴う二次信号の計測とその発生機序に関する研究」の研究促進の一助として有用であることが示された。