

## 【2】痴呆症例の経時変化に関する検討および剖検診断所見との比較検討

はじめに

高齢化社会の中で痴呆をいかに対処するかは、大きな社会問題になっている。痴呆をきたす神経疾患は多数知られているが、先天性あるいは代謝異常など、遺伝性疾患を除くと、大多数はアルツハイマー型痴呆(AD)および脳血管性痴呆(VD)に含まれる。VDについては、基本的に脳血管障害が存在し、複数あるいは広汎な障害に基づくことから脳血管障害の対策が大きな比重を占めている。これについては神経症候学並びに画像による形態的、機能的変化の追跡が発達し、大きな成果をあげている。

これに対し、ADについては、病理学的に老人斑および神経原繊維変化の出現と神経細胞の減少という変化の特徴は見られるものの、臨床的な高次精神活動を客観的に評価する手段がないために、AD本来の病態に変化をきたしているか、特殊な機能を一過性に賦活している結果であるか等、治療効果および予後に対する検討方法の開発は重要な意味を持っている<sup>(11)</sup>。老人斑および神経原繊維変化に共通してみられる変化の1つに燐酸化タウ蛋白の増加があげられる<sup>(1)、(3)、(5)、(7)、(11)</sup>。この燐酸化タウ蛋白が脳脊髄液(CFS)にも出現することを手掛かりに、CFS中のタウ蛋白を定量的に測定することにより、ADの病態を把握できる可能性がある<sup>(6)</sup>。本研究では、AD症例、VDおよびその他の疾患での症例について、CFS中のタウ蛋白濃度を測定した。

また遺伝子工学の発達とともに、遺伝子の解析から疾患をみるアプローチが注目されてきている。Rosesら<sup>(12)</sup>はApoE遺伝子 2 / 3 / 4の3種のアレルのうち、ADでは 4の頻度が異常に高い事実を報告した。これはまず家族性遅発性ADで報告され<sup>(13)</sup>、次いで弧発性遅発性ADにも当てはまるものが相次いで報告された<sup>(14)-(17)</sup>。ApoE遺伝子とADとの関連は病理形態学的、遺伝的、生化学的にも示されており、ApoE遺伝子とりわけ 4は、遅発性ADの単なるマーカーではなく疾患の病態発現そのものに関係していると考えられる<sup>(2)・(4)</sup>。本研究では、AD症例、VDおよびその他の疾患での症例について、ApoE遺伝子とAD発症の危険率をみるとともにAD発症年齢との関係について検討した。

### 材料と方法

タウ蛋白は、臨床的に診断されたAD150例、VD27例、その他の疾患123例および剖検例12例について、INNOGENETICS社の酵素免疫法(ELISA)<sup>(9)・(10)</sup>を用いて測定した。図8に示すようにマイクロプレート上に固相したAT120(すべてのタウを認識: タウ蛋白のアミノ酸配列155-221、218-224を認識)にタウ蛋白が結合し、さらにビオチン標識したHT7(正常タウとPHFタウを認識: 159-163を認識)、BT2(正常タウを認識: 194-198を認識)とサンドウィッチ複合体を形成させ、さらにペルオキシダーゼ標識ストレプトアブジンと結合させる。次いでTMBを加え発色させ、所定時間後硫酸で反応を停止、450nmで測光する。測定手順は表1の通りである。

ApoE型は、臨床的に診断されたAD例、VD例、その他の疾患例について、INNOGENETICS社のラインイムノプローブ法(LIPA)を用いて測定した。図9に示すようにニトロセ

ルロース上に固相したプローブに増幅した DNA をハイブリダイゼーションし、さらにアルカリフォスファターゼ標識ストレプトアビジンを結合させる。次いで BCIP + NBT を加え発色させ、発色したプローブのバンドの組合せより ApoE 遺伝子型を判定する。測定手順は表 2 の通りである。

図 8 タウ測定原理

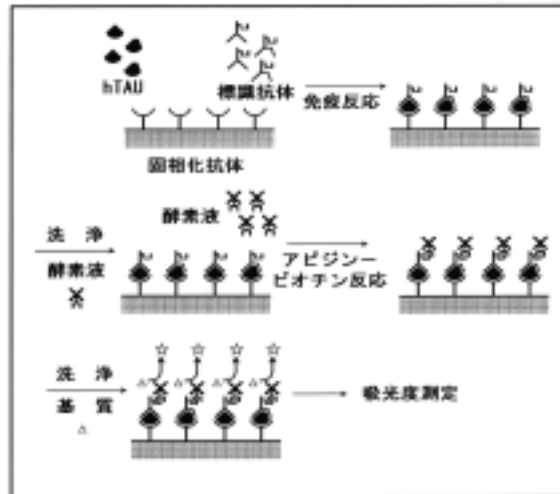


表 1 . タウ蛋白の測定手順

試薬	添加量	方法
コンジュゲート 1	75 $\mu$	各ウェルに添加
検体 / 検体希釈液 / 標準品	各 25 $\mu$	各ウェルに添加 プレートシェーカー (1000rpm) または、ピペッティングにより攪拌する プレートシーラーでカバーをする
20-25、1 晩インキュベート		
洗浄液	0.4ml $\times$ 4	4 回洗浄
コンジュゲート 2	100 $\mu$	各ウェルに添加 新しいプレートシーラーでカバーする
20-25、30 分間インキュベート		
洗浄液	0.4ml $\times$ 4	4 回洗浄
基質液	100 $\mu$	各ウェルに添加
20-25、30 分間インキュベート		
硫酸 (2N)	100 $\mu$	各ウェルに添加 プレートを軽くたたいて攪拌
		450nm で測定

図9 ApoE 遺伝子型の測定原理

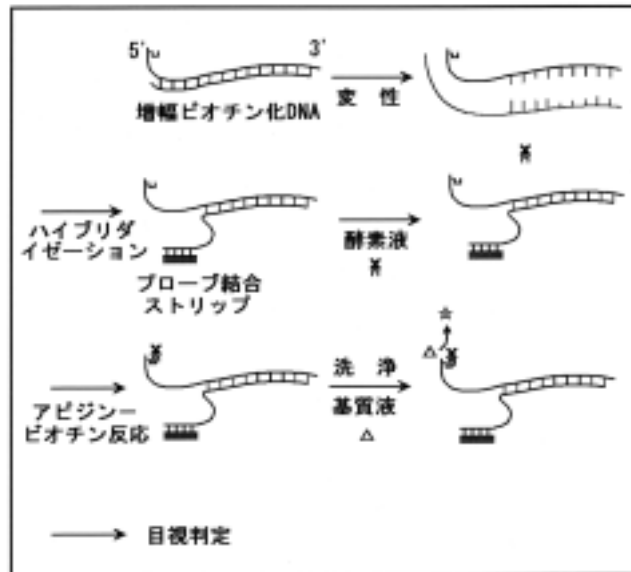


表2 . ApoE 型測定方法

試薬	添加量	方法
変性液(DS)	10 μ	各反応槽に添加
増幅 DNA	10 μ	DS に滴下
20-25 、 5 分間反応		
ハイブリダイズ液(HS)	1 ml	変性させたサンプルに添加 穏やかに混合
LiPA ストリップ	1 枚	各反応槽内に静置
45 、 30 分間反応		
洗浄液(SW)	1 ml × 2	ストリップを洗浄 10-20 秒 × 2 回
洗浄液	1 ml	各反応槽に添加
45 、 10 分間反応		
リンス液	1 ml × 2	各ストリップを洗浄 1 分 × 2 回
コンジュゲート	1 ml	各反応槽に添加
20-25 、 30 分間反応		
リンス液	1 ml × 2	各ストリップを洗浄 1 分 × 2 回
基質希釈液	1 ml	各ストリップを洗浄 1 分 × 2 回
基質液	1 ml	各反応槽に添加
20-25 、 30 分間反応		
蒸留水	1 ml	各反応槽に添加
20-25 、 5 分間反応		

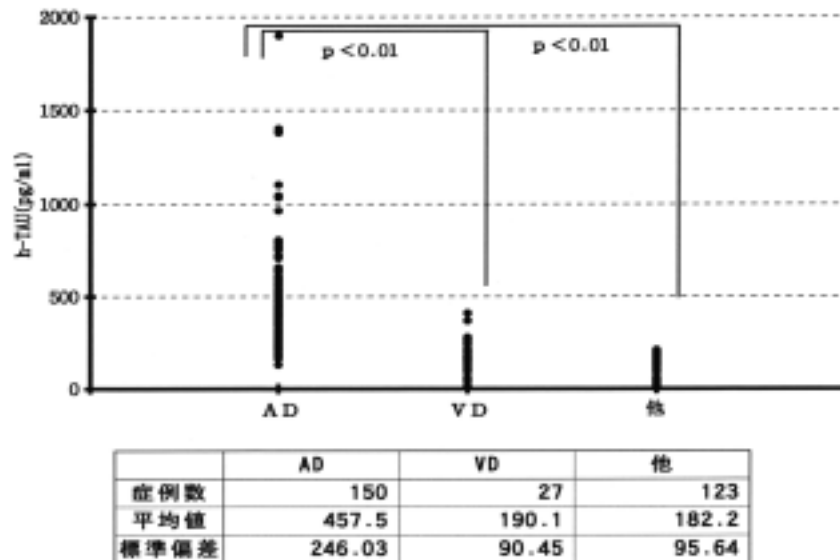
## 結果

### 1) タウ蛋白の測定

臨床例の CFS 中のタウ蛋白濃度は、AD 群では  $458 \pm 246 \text{ pg/ml}$ 、VD 群では  $190 \pm$

90pg/ml、他の疾患群では  $182 \pm 96$ pg/ml であり、AD 群で有意 ( $P < 0.01$ ) に高値を示した (図 10)。

図 10 各種疾患群でのタウ蛋白測定値



一方、剖検時に採取した CFS 中のタウ蛋白濃度は、表 3 に示すように、AD では高値であったがその値は測定限界 1200pg/ml をはるかに越えていた。また AD とは無関係の症例も高値を示した。タウの高値と死亡から剖検までの時間との関係で見ると、死亡 34 分から 11 時 8 分であり、長時間経過した例が必ずしも高いという関連は見られなかった。また CFS の性状でみると、血性あるいはやや血性の例が透明の例よりもいずれも高値であった。CFS が血性を示した例について、臨床的所見から頭蓋内に出血が予想された時間の関係では 2 日から 14 日に渡っていた。

表 3 剖検例での髄液中タウ蛋白濃度

(症例番号)	年齢	病理診	(経過日数)	死亡から剖検 までの時間	随液性状	tau (pg/100 $\mu$ l)
1	(11'96) 71	出血性脳梗塞	(2日)	0:34	血性	4,340
2	(1'96) 64	変性疾患, DIC	(11日)	5:50	やや血性	1,750
3	(2'96) 78	脳出血	(4日)	1:10	血性	1,110
4	(13'96) 64	脳梗塞	(14日)	2:05	透明	578
5	(24'95) 51	クモ膜下出血	(13日)	1:11	血性	438
6	(10'96) 80	アルツハイマー型老年痴呆		1:27	やや血性	349
7	(12'96) 85	直腸癌		1:53	透明	253
8	(7'96) 40	心筋症		2:30	透明	221
9	(5'96) 65	神経膠芽腫		0:42	透明	219
10	(6'96) 87	肺炎		11:08	透明	86
11	(4'96) 65	直腸癌		1:13	透明	78
12	(8'96) 63	脳梗塞	(6日)	1.50	やや血性	1,750

## 2) ApoE 遺伝子型の測定結果

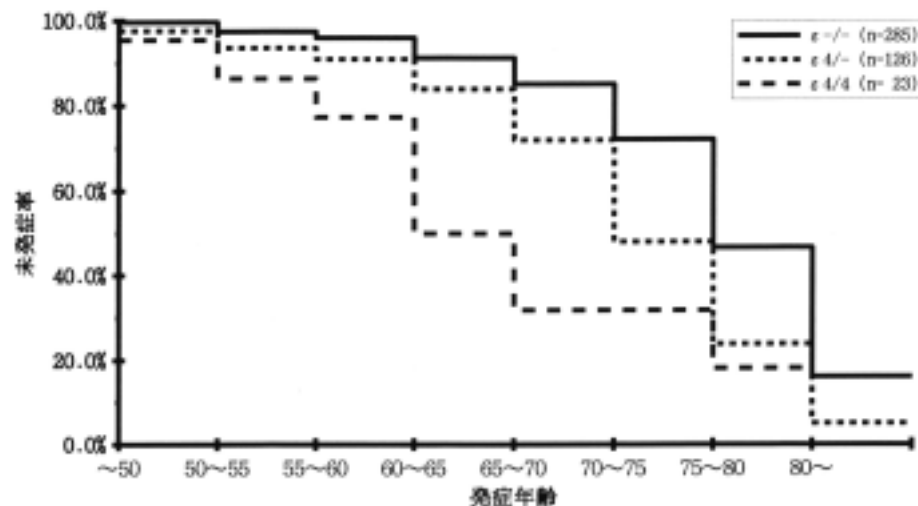
AD 発症頻度との関係：AD を A 群、VD を B 群、他疾患を C 群として、各群での AD 発症率をみたところ、A 群では 4 を保有している人の割合が 31% と有意 ( $P < 0.001$ ) に高頻度であった (表 4)。

表 4 各疾患群での ApoE 遺伝子型

	A 群 (N=189)	B 群 (N=41)	C 群 (N=204)
2/2	0 (0.0%)	0 (0.0%)	3 (1.5%)
2/3	6 (3.2%)	0 (0.0%)	13 (6.4%)
2/4	1 (0.5%)	1 (2.4%)	4 (2.0%)
3/3	86 (45.5%)	28 (68.3%)	149 (73.0%)
3/4	76 (40.2%)	12 (29.3%)	32 (15.7%)
4/4	20 (10.6%)	0 (0.0%)	3 (1.5%)
$\epsilon 2$	1.9%	1.2%	5.6%
$\epsilon 3$	67.2%	82.9%	84.1%
$\epsilon 4$	31.0%	15.9%	10.3%

AD 発症年齢との関係：実際に AD を発症した症例についてみたところ、対立遺伝子として 4 を 2 個持つ者では、65 歳以前に 50% が発症していた。一方 4 を 1 個または 0 個の者では 75 歳で 50% が発症していた。4 を 2 個持つ者は発症年齢が約 10 年早くなることを示していた (図 11)。

図 11 ApoE 遺伝子型と AD 発症年齢



## 考 察

臨床例の CFS 中のタウ濃度の測定から AD 症例が有意に高値を示した。しかし、その値が病態重症度と対応しているか、あるいはその値が経時的にどの程度変化するかについては、検討時間が短く、複数の検査ができないこと、剖検所見との対応ができていないことなど、今後継続したデータの蓄積が必要と考えられた。

剖検例の検討では、予想に反し、いずれの症例でも異常高値を示した。この原因について、今回の測定結果から CFS 中に血液が長時間混在していた例に無色透明であっ

た例よりも高値であったことは、CFS でタウ蛋白の遊離が起こっている可能性を示している。また一方では、今回の測定方法がタウ蛋白のエピトープのうち、燐酸化のみならず、非燐酸化タウも確認する抗体(AT120)であることから、遊離タウを測定した可能性を否定することはできない。今後燐酸化タウのみを認識する抗体によっても検討を加える必要がある。工藤ら(1993)<sup>(8)</sup>は剖検例の燐酸化タウ値を測定し、少数例であるが、高値を示す例があるがその原因は不明とされている。死亡後、CSF 中のタウ濃度が変化するという実験動物によるデータはまだみられない。今回われわれはラットにおいて死後のタウ濃度の経時的变化の観察を目的にCSFの採取を試みたが、時間が経過するに伴い、CSFの採取が困難であった。今後実験動物を変えて検討する必要があると思われる。

また ApoE 遺伝子型は AD の発症危険因子の一つであり、早期発症に関与していると考えられた。しかしながら、AD は ApoE の 4 がなくても発症すること、ApoE の 4 を持つ人の多くが発症を免れていることから、今後更に AD 発症のメカニズムの研究を進めていく必要があると思われる。

## 文 献

1. Arai H, Terajima M, Miura M, Higuchi S, Muramatsu T, Machida N, Seki H, Takase S, Clark CM, Lee VM-Y, Trojanowsky JQ, Sasaki H: Tau in cerebrospinal fluid: a potential diagnostic marker in Alzheimer's Disease. *Ann Neurol* 38: 649-652, 1995
2. Benzing WC, Mufson EJ: Apolipoprotein E immunoreactivity within neurofibrillary tangles: relationship to tau and PHF in Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 132: 162-171, 1995
3. Feany MB, Dickson DW: Neurodegenerative disorders with extensive tau pathology: a comparative study and review. *Ann Neurol* 40: 139-148, 1996
4. Fleming LM, Weisgraber KH, Strittmatter WJ, Troncoso JC, Johnson GVW: Differential binding of Apolipoprotein E isoforms to tau and other cytoskeletal proteins. *Exp Neurol* 138: 252-260, 1996
5. Giaccone G, Pedrotti B, Migheli A, Verga L, Perez J, Racagni G, Smith MA, Perry G, De Gioia L, Selvaggini C, Salmona M, Ghiso J, Frangione B, Islam K, Bugiani O, Tagliavini F: ApoE and tau interaction: a possible link between amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 148: 79-87, 1996
6. Hock C, Golombowski S, Naser W, Mullwe-Spahn F: Increased levels of ApoE protein in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease - correlation with degree of cognitive impairment. *Ann Neurol* 37: 414-415, 1995
7. 石井一弘, 森 啓: 髄液タウ蛋白測定-Alzheimer 病診断への試み。医学の歩み 26: 52-53, 1996
8. 工藤 喬, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, 武田雅俊, 以倉康光, 播口之朗, 西村 健: アルツハイマー病における脳組織および脳脊髄液中の異常リン酸化タウの量について。神経科学 32: 502-503, 1993

9. Mercken M, Vandermeeren M, Lubke U, Six J, Boons J, Vanmechelen E, Van de Voorde A, Gheuens J: Affinity purification of human  $\beta$  protein and the construction of a sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for human detection. *J Neurochem* 58: 548-553, 1992
10. Vandermeeren M, Mercken M, Vanmechelen E, Six J, Van de Voorde AV, Martin AA, Cras P: Detection of  $\beta$  proteins in normal and Alzheimer's disease cerebrospinal fluid with a sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J Neurochem* 61: 1828-1834, 1993
11. Wahlund L-O: Biological markers and diagnostic investigation in Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand (suppl)* 165: 85-91, 1996
12. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA: Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261: 921-923, 1993
13. Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD: Apolipoprotein E: High-avidity binding to  $\beta$ -amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 1997-1981, 1993
14. Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, St George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, Rosi BL, Gusella JF, Craper-macLachlan DR, Alberts MJ, Hulette C, Crain B, Goldgaber D, Roses AD: Association of apolipoprotein E allele 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 43: 1467-1472, 1993
15. Ueki A, Kawano M, Namda Y, Kawakami M, Ikeda K: A high frequency of apolipoprotein E4 isoprotein in Japanese patients with late-onset nonfamilial Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 163: 166-168, 1993
16. Poirier J, Davignon J, Bouthillier D, Kogan S, Bertrand P, Gauthier S: Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet* 342: 697-699, 1993
17. Rebeck GW, Reiter JS, Strickland DK, Yaman BT: Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease; Allelic variation and receptor interactions. *Neuron* 11: 575-580, 1993