

脳細胞傷害マーカーとしてのアクロレインの
有用性に関する研究

溝井 睦美

目次

【序論】	1
第一章 脳卒中患者における尿中アクロレイン代謝と重症度の関連性の検討	
【目的】	8
【対象と方法】	10
【結果】	13
【考察】	18
第二章 軽度認知機能障害およびアルツハイマー病患者における 血漿中バイオマーカーの検討	
【目的】	22
【対象と方法】	24
【結果】	27
【考察】	35
第三章 軽度認知機能障害およびアルツハイマー病患者における 脳脊髄液中バイオマーカーの検討	
【目的】	38
【対象と方法】	40
【結果】	44
【考察】	50
【総括】	52
【参考文献】	55
【論文目録】	66
【謝辞】	67

【序論】

近年、日本において高齢化が進み、それに伴い認知症の患者数も増加している。認知症患者数は 2010 年時点で約 200 万人といわれ、さらに 2020 年には 325 万人に達すると推計されている¹⁾。認知症の原因となる疾患は、脳細胞傷害を引き起こす脳血管障害及びアルツハイマー病が主である。

高齢化社会において、要介護の原因となる認知症を予防、早期発見することは Quality of life (QOL) を維持、向上させることにつながるため重要である。

脳血管障害は、日本の三大生活習慣病の一つであるにもかかわらず信頼性の高いバイオマーカーが存在していなかった。この背景のもと Yoshida らは、生体内で生成されるアルデヒド化合物の一つであるアクロレイン ($\text{CH}_2=\text{CHCHO}$) に着目して、脳血管障害におけるバイオマーカーとしての可能性を検討した。細胞内において産生されたアクロレインは、タンパク質のリジン残基と結合してタンパク質結合型アクロレイン (Protein - conjugated acrolein : PC - Acro) を生成し、有用なバイオマーカーとなり得るとの報告を行った²⁾。

PC - Acro を形成するアクロレインは、細胞内に mM オーダーの濃度で存在するポリアミン (プトレスシン、スペルミジン、スペルミン) より産生される。ポリアミンは生物界に広く存在しており、第一級ならびに第二級アミンを二つ以上含む塩基性の生理活性物質である。現在、同定されている 20 種類以上のポリアミンのうち、細胞内にはプトレスシン (Putrescine : PUT : $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$)、スペルミジン (Spermidine : SPD : $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$)、スペルミン (Spermine : SPM : $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$) の三種類が存在している。これらポリアミンは細胞内において、主として RNA と結合しておりタンパク質ならびに核酸の合成を促進することにより、細胞増殖因子として働いている³⁻⁸⁾。また、3 種のポリアミンは同様な生理活性を示すが、有効濃度が異なるため⁹⁾ PUT、SPD なら

びに SPM が相互変換し、各々の至適濃度を厳密に保ち生理機能を保っている。

一方、ポリアミンは酸化分解により有毒なアクロレインの産生源となる影の部分をもつ。ポリアミン由来のアクロレインの生成経路は、大きく二つに分類される。ひとつは、スペルミンオキシダーゼ (SMO) が SPM を分解し、SPD ならびに 3-アミノプロパナールの生成を介しアクロレインを生じる経路¹⁰⁾、もう一方の生成経路は SPM あるいは SPD が、SPD/SPM - *N*-アセチルトランスフェラーゼ (SSAT) の働きによりアセチル化され、さらに *N*-アセチルポリアミンオキシダーゼ (AcPAO) により酸化分解され、それぞれ SPD と PUT ならびに 3-アセトアミドプロパナールを生じる経路である¹¹⁾。また、二つの代謝経路で生成する副生成物、SSAT と AcPAO により生成する 3-アセトアミドプロパナールからはアクロレインはほとんど産生されないが、SMO による代謝経路で産生される 3-アミノプロパナールは自発的にアクロレインに変換される¹¹⁾。このことから、ポリアミンの酸化分解により生成されるアクロレインは、SPM の SMO による代謝が主要な反応であると考えられている¹²⁾。

また、ポリアミンからウシ血清中のアミンオキシダーゼにより代謝される過程において、先述したアクロレインと過酸化水素 (H_2O_2) が実際に産生されることが証明されている^{13,14)}。

アクロレインと過酸化水素の細胞毒性について、Saiki らが報告している¹⁵⁾。培養細胞を用いた実験において、 H_2O_2 に比べ、アクロレインは約 20 分の 1 の添加量でほぼ同等の細胞毒性を示した。このことから、脳梗塞発症時の細胞傷害は、活性酸素種 ($O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ 、 H_2O_2) に起因するといわれている¹⁶⁾が、アクロレインによる細胞傷害性も関与することが提唱された。

細胞内で生成したアクロレインは、ペルオキシソームに局在している¹⁷⁾が、アルデヒド基を有するため、アルデヒドデヒドロゲナーゼにより分解されることに

より無毒化される¹⁸⁾。もう一つの代謝としては、細胞内に存在しているグルタチオンにより解毒代謝され¹⁹⁾、3-ヒドロキシプロピルメルカプツール酸(3-Hydroxypropyl mercapturic acid : 3-HPMA)に代謝され尿中に排泄される。そのため細胞の機能が正常であればその毒性はあまり問題視されない。しかしながら、脳梗塞等の細胞傷害性の疾患発症時には、細胞外にポリアミンやポリアミン代謝酵素が放出され、アクロレインが産生されると考えられる。これらを踏まえて、筆者はこれまで細胞傷害性の疾患とポリアミンの代謝酵素ならびにアクロレインの産生とその毒性に注目し、これをあらたな臨床指標に広げることをめざして研究を行ってきた。

これまでの研究の中でアクロレインは、尿毒症を進行させる原因物質の一つであることが知られている²⁰⁾ことから、Sakataらにより慢性腎不全患者を対象としアクロレインとポリアミンとの関連性について検討が行われている²¹⁾。慢性腎不全患者の血漿中では、PC-Acro量が健常者群に比べ約6倍も増加しており、同時にPUT量、SMO活性、遊離型アクロレインが上昇していたが、SPM量は減少することが判明し、腎不全の重症度との相関が認められた²¹⁾。さらに、脳虚血モデルラットにおいて、SPMの代謝物である3-アミノプロパナールが細胞傷害に強く関連することが報告^{22,23)}されており、Tomitoriらは脳卒中死亡率の60%を占める脳梗塞に着目した検討を行い、血漿中のPC-Acro量、AcPAO活性、SMO活性が増加していることを明らかにした²⁴⁾。また、これらに加え生体防御因子であるインターロイキン-6(IL-6)ならびに、炎症のバイオマーカーのC反応性タンパク(CRP)を測定することで、自覚症状のない無症候性脳梗塞(Silent brain infarction : SBI)を高い感度、特異度で検出できることをYoshidaらが報告している²⁾。また、脳梗塞の危険因子は、SBIに加え、頸部動脈硬化(Carotid atherosclerosis : CA)や大脳白質病変(White matter hyperintensity : WMH)

が報告され^{25,26)}ているが、CAならびにWMH患者においても血漿中のPC - Acro量の増加が認められ、他の因子とともに脳梗塞を発症する危険度を算出できることがYoshidaらにより報告されている²⁷⁾。

さらには、自己免疫疾患のうち涙腺や唾液腺を標的臓器とする原発性シェーグレン症候群の患者の唾液中においてもPC - Acro量が増加していることをHigashiらが報告²⁸⁾しており、この場合にも細胞の傷害を伴う疾患においてアクロレインが強く関与していると推察される。

日本国内において脳梗塞発症時に脳保護剤として使用されているラジカルスカベンジャーであるエダラボン（ラジカット）は、梗塞作成時での投与では、梗塞巣の広がり有意に抑制したが、梗塞作製6時間後における投与では、その効果は認められなかったとの報告がある¹⁵⁾。一方、アクロレインの除去剤であるN-ベンジルヒドロキシルアミンは梗塞作成時の投与において有効であり、さらに梗塞作成6時間後の投与においても梗塞巣の広がり有意に抑制した。このことからアクロレインは脳梗塞の症状の悪化に関与していること、また、アクロレインの除去が脳梗塞の治療において有効であることが明らかにされている¹⁵⁾。

認知症のもう一方の原因疾患であるアルツハイマー病は、進行性の脳疾患である。進行過程において軽度の認知機能低下から段階を経て重度の認知機能低下が出現すると自力では日常生活を送れなくなり、介護が必要になる。

また、認知機能低下の段階の中で、軽度認知障害（mild cognitive impairment : MCI）のうち、アルツハイマー型認知症に進行する場合と、そうでない場合がある。現在は診断基準として、認知機能検査であるMMSE（Mini - mental state examination）が多く用いられているが、画像による判定も進歩しており、MRI画像を基に、早期アルツハイマー型認知症診断支援システム（VSRAD）を用いて、Z - Scoreを算出することにより海馬の萎縮度の解析が可能である。早期治療のた

めにも、認知機能障害の原因疾患がどのようなタイプなのかを認知機能低下が軽度のうちに識別することが必要である。また、MRI 画像に加え、さらに fluorodeoxyglucose (FDG) - positron emission tomography (PET) ならびに amyloid PET によりアルツハイマー型認知症に進行する可能性、また、認知症の患者においてはアルツハイマー型認知症か否かの診断が可能になった。しかしながら、これらの検査は、国内において導入している医療施設が少なく、高価であるため、より安価で簡便に受けられる検査が必要である。

アルツハイマー病の患者の脳には、老人斑ならびに神経原線維変化がみられることが知られている。老人斑は、アミロイドベータペプチド ($A\beta$) が蓄積したものである。 $A\beta$ は、アミノ酸40個からなる $A\beta_{40}$ と、アミノ酸42個からなる $A\beta_{42}$ が存在する。また、神経原線維変化は微小管のタウタンパク質がリン酸化され遊離し凝集することで形成される。脳脊髄液 (CSF) 中の $A\beta$ ($A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{42}$)、タウタンパク質ならびにリン酸化タウタンパク質量は、アルツハイマー病のバイオマーカーとして注目されている。

そこで本研究においてアルツハイマー病患者群の血漿中の PC - Acro、IL - 6、CRP、 $A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{42}$ 量、ならびに尿中の 3 - HPMA 量を測定し、健常者群、WMH 群および SBI を有する群、MCI 患者群との比較から、これらのバイオマーカーとしての有用性を検討することにより、高価な画像診断よりも安価で簡便な検査を模索した。

また、認知機能低下の段階の中で、MCI のうち、アルツハイマー型認知症に進行する場合と、そうでない場合がある。そこで、MCI ならびにアルツハイマー病の患者の CSF 中の $A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{42}$ 、PC - Acro、総タウタンパク質、リン酸化タウタンパク質を測定した。さらに画像診断の Z - Score ならびに認知機能検査の MMSE の結果との相関を検討した。また、アルツハイマー病患者の脳組織ならび

にコントロール（疾病対照）群の死亡後の剖検検体（脳組織）中の PC - Acro、 $A\beta_{40}$ および $A\beta_{42}$ を測定し、アクロレインが軽度認知症及びアルツハイマー病のバイオマーカーとして有用であるか検討した。

以上の知見から本研究では、脳卒中患者、認知機能障害患者、大脳白質病変患者、ならびにアルツハイマー病患者、健常者など多くのボランティアの方々に協力を得て提供された臨床データや臨床検体を解析し、遂行した。

第一章においては、脳卒中患者に対し健常者群を対照群として、アクロレインの代謝物である 3 - ヒドロキシプロピルメルカプツール酸（3 - Hydroxypropyl mercapturic acid : 3 - HPMA）に着目し、尿中 3 - HPMA 量と脳梗塞ならびに脳出血の有無について検討した。また、あわせて脳卒中患者群において脳梗塞ならびに脳出血の病巣部位の大きさ、ならびに重症度と尿中 3 - HPMA 量の相関性を述べる。

第二章においては、アルツハイマー病との関連が注目されている $A\beta$ とアクロレインに着目し、MCI 患者群ならびにアルツハイマー病患者群における、血漿中の $A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{42}$ ならびに PC - Acro の相関性を評価した。

第三章においては、MCI 患者群ならびにアルツハイマー病患者群における、脳脊髄液中の $A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{42}$ ならびに PC - Acro を測定し、認知機能検査と画像診断による脳の萎縮度との相関性を評価し、これらを組み合わせた感度の高い簡便なバイオマーカーを検討した。

第一章

脳卒中患者における尿中アクロレイン代謝物と 重症度の関連性の検討

【目的】

脳梗塞発症時の細胞傷害は、活性酸素種 ($O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ 、 H_2O_2) に起因するといわれている¹⁶⁾。しかし、Saiki らの研究において培養細胞を用い細胞傷害性を検討した結果、活性酸素に比べアクロレインがより強い細胞毒性を示し細胞傷害を引き起こすことが報告されている²⁹⁾。また、脳梗塞モデルマウスを用いた検討の結果、脳梗塞巣において組織中 PC - Acro 量が、脳組織の正常部位に比べ 26 倍多く生成されることが報告されている²⁹⁾。一方、活性酸素由来のタンパク結合型 4-ヒドロキシノネナールや 8-ヒドロキシデオキシグアノシンは 2~3 倍程度の増加であったことから、脳梗塞部位の細胞障害には活性酸素に比較し、アクロレインがより強く関与していることを明らかにしている²⁹⁾。

また、生体内において産生されたアクロレインは、グルタチオン抱合を受け、3 - HPMA に代謝され尿中に排泄される (Fig.1 - 1)。このことと上記知見から、アクロレインの尿中排泄物である 3 - HPMA が、アクロレインの毒性に対する解毒機能の指標となると推察した。そこで脳梗塞組織中、ならびに血漿中のアクロレイン量が増加することが明らかとなっている脳梗塞患者群ならびに対照群として健常者群の尿中 3 - HPMA 量とクレアチニン量を測定し、アクロレイン代謝能と脳梗塞ならびに脳梗塞巣の大きさならびに重症度と 3 - HPMA の関連性を検討した。

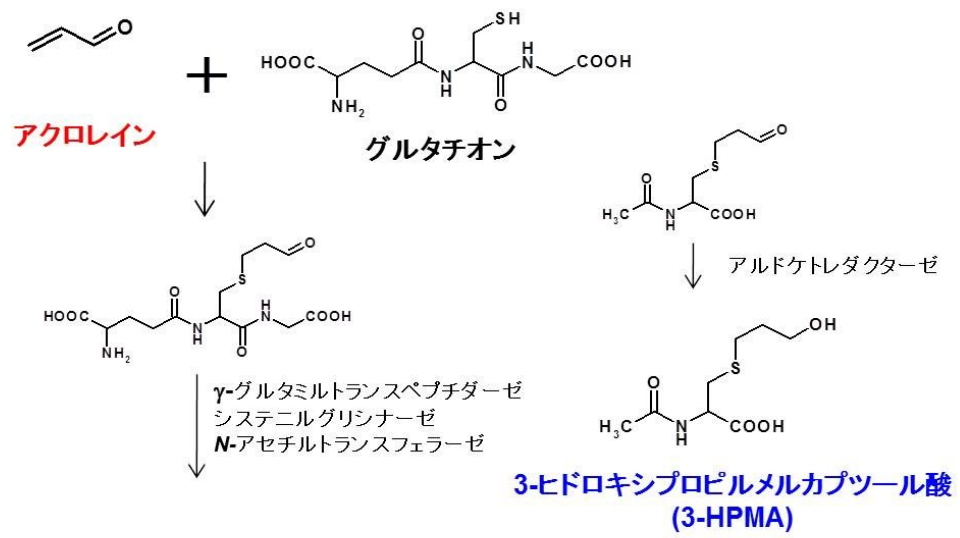


Fig. 1-1 アクロレインとグルタチオンの抱合及び3-ヒドロキシプロピルメルカプツール酸 (3-HPMA) への代謝経路

【対象と方法】

対象

本臨床研究は国立大学法人千葉大学ならびに千葉中央メディカルセンターの倫理委員会に許可を得て、その指針、手順に従って行った。また、この臨床研究はヘルシンキ宣言を基盤原則として行った。また、インフォームドコンセントは患者本人またはその介護者に対し、書面で行った。

健常者（脳梗塞を有しない）群 90 名（男性：47 名、女性：43 名；年齢 57.8 ± 6.8 歳、40～79 歳の範囲）ならびに脳卒中患者群 78 名（男性：50 名、女性：28 名；年齢 70.7 ± 18 歳、42～96 歳の範囲）（脳卒中患者内訳：ラクナ梗塞 17 名、アテローム性梗塞 29 名、心原性梗塞 6 名、脳出血 26 名）の協力を得た。

尿検体

健常者（脳梗塞を有しない）群 90 名（男性：47 名、女性：43 名；年齢 57.8 ± 6.8 歳、40～79 歳の範囲）ならびに脳卒中患者群 78 名（男性：50 名、女性：28 名；年齢 70.7 ± 18 歳、42～96 歳の範囲）（脳卒中患者内訳：ラクナ梗塞 17 名、アテローム性梗塞 29 名、心原性梗塞 6 名、脳出血 26 名）の尿検体を採取した。また、脳卒中患者群については、発作後 1～2 日後に採取した。尿検体は、採取後測定までの期間 -80℃にて凍結保存した。

3 - HPMA の測定

3 - HPMA は Eckert らの方法³⁰⁾に従い LC - MS/MS により測定した。各尿検体 2 ml に 2 ml のギ酸アンモニウム緩衝液（50 mM, pH 2.5）、内部標準として 0.02 ml の 10 mg/ml N - acetyl - d3 - S - (3 - hydroxypropyl) cysteine (d3 - 3 - HPMA)（ジシクロヘキシルアンモニウム）(Tront Chemicals) を加え混合した。

2,000×g で 5 分間遠心分離した後、上清をあらかじめメタノール 6 ml とギ酸 (pH 2.5) 6 ml により平衡化した SPE カラム (ISOLUTE ENV⁺, 100 mg 3 ml) を通過させた。通過させた後のカートリッジをギ酸アンモニウム緩衝液 (50 mM, pH 2.5) で洗浄し、メタノールで溶解した 2%ギ酸 2.5 ml で溶出し、乾燥させた。その後、1 ml 溶媒 A [5 mM 酢酸アンモニウム、pH 6.5 (アセトニトリル/水 (88/12 v/v))] で溶解した。溶解した溶液の遠心分離 (2,000×g、10 分間) の 0.01 ml の上清について LC - MS/MS により分析を行った。

なお、LC 分離は、親水性相互液体クロマトグラフィー (X Bridge HILIC、3.5 μm particle size、2.1 mm×150 mm、Waters、MA, USA) および対応するプレカラム (HILIC, 2.1 mm×10 mm) で行った。3 - HPMA の分離は、均一濃度の pH 6.5 の 5 mM 酢酸アンモニウム (88%アセトニトリル及び 12%水の混合液、流量条件 : 0.3 ml/min) を使用して行った。3 ~9 分間に溶出した 3 - HPMA を含むフラクションを、MS

(model SciexAPI 2000 、 Applied Biosystems 、 Langen , Germany) の検出器に注入した。エレクトロスプレーニードルボルテージは、ネガティブイオンモードで -4,000 V に設定した。ターボヒータは 475 °C に維持した。窒素は、霧化ガス、ヒータガス及びカーテンガスとして使用した。霧化ガス、ヒータガス及びカーテンガスは、それぞれ、45 psi、60 psi 及び 25 psi の圧力に設定した。MS/MS モード用の衝突ガス (窒素) は、スリーインストルメントユニットのフローに設定した。MS は、マルチプルリアクションモニタリングモード (MRM) を使用した。3-HPMA のリテンションタイムは 4.8 分であり、前駆イオン (Q1) 及びプロダクトイオン (Q3) は、それぞれ、220.2 m/z 及び 91.0 m/z であった。

クレアチニンの測定

尿中クレアチニン量の測定は、クレアチニンアッセイキット
(Cayman Chemical Co., USA) を使用し、添付のプロトコールに従い測定した。

検定

統計的計算は、GraphPad Prism®Software (GraphPad Software) により実行した。値は、中央値±四分位偏差で示した。各群のデータは、Wilcoxon の順位和検定または、Kruskal-Wallis 検定を用いて検定した。Spearman 順位相関係数は、年齢及び 3 - HPMA もしくはクレアチニン間の統計的相関関係を評価するために使用した。

頭部断層画像解析

すべての被験者は、T1 及び T2 強調 MRI を受け、一部の被験者は FLAIR (fluid - attenuated inversion recovery) 及び CT (computed tomography) を受けた。すべての MRI 検査は、1.5 T - MRI ユニット (Signa HiSpeed Infinity, GE Medical Systems) の 1 ~2 mm スライスギャップで 5 ~8 mm 厚さで実行した。レシーブ - トランスミットバードケージデザインのスタンダードヘッドコイルを使用した。また、病巣梗塞の最大サイズは、各イメージ装置に付属している 5 mm または 10 mm 長の目盛で測定した。

NIHSS 評価方法

脳卒中の重症度については、医療施設ならびに臨床研究において広く用いられている、Brott らにより報告された³¹⁾脳卒中重症度評価スケール (National Institute of Health Stroke Scale : NIHSS) の基準に従い評価した。NIHSS は、1a.意識水準、1b.意識障害 - 質問、1c.意識障害 - 従命、2.最良の注視、3.視

野、4.顔面麻痺、5.上肢の運動（左右）、6.下肢の運動（左右）、7.運動失調、8.感覚、9.最良の言語、10.構音障害、11.消去現象と注意障害（無視）の項目からなり、重症度が高いほど点数が高くなり、最大は42点となる。

【結果】

脳卒中患者における尿中 3 - HPMA の減少

健常者群ならびに脳卒中患者群の尿検体について、アクロレインの尿中排泄体である 3 - HPMA ならびにクレアチニン量を測定した。尿検体中 3 - HPMA 量をクレアチニン量により補正した値を算出した。また、健常者群 90 名ならびに脳卒中患者群 78 名の対象者の年齢を示した。(Fig. 1 - 2A)

その結果、3 - HPMA 量、クレアチニン量ならびにクレアチニン補正した 3 - HPMA 量で、脳卒中者群において健常者群に比べ有意な減少が認められた。特に、クレアチニン補正した 3 - HPMA 量の中央値は、健常者の $2.83\mu\text{mol/g Cre}$ に比べ、脳卒中患者群では $1.5\mu\text{mol/g Cre}$ と顕著な減少が認められた ($p < 0.0001$)。

(Fig. 1 - 2A)

しかしながら、健常者群と脳卒中患者群の年齢でも有意な差が認められるため (Fig. 1 - 2A)、年齢を考慮した検討も加えた。

健常者群ならびに脳卒中患者群のうち年齢 60 ~79 歳の対象者を抽出し、健常者群の 32 名ならびに脳卒中患者群の 44 名について統計解析した。その結果、全対象者について解析した結果と同様に、3 - HPMA 量、クレアチニン量ならびにクレアチニン補正した 3 - HPMA 量 ($p = 0.0029$) で、脳卒中患者群において健常者群に比べ有意な減少が認められた。(Fig. 1 - 2B)

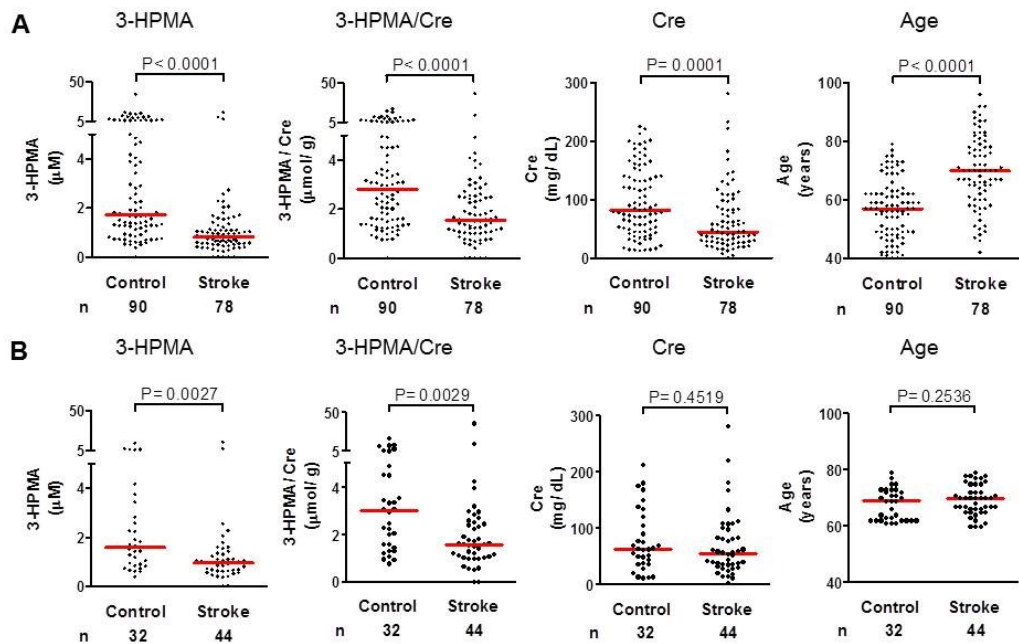


Fig. 1-2 脳卒中患者の尿中3 - HPMAの低下

Aは、健常者群ならびに脳卒中患者群の尿検体について3 - HPMAおよびクレアチニン量を測定した。また健常者群ならびに脳卒中患者群の年齢を示した。BはAのうち60~79歳の結果について示した。 p 値はWilcoxonの順位和検定を用いて算出した。

脳梗塞患者ならびに脳出血患者における尿中 3 - HPMA の減少

健常者群、脳卒中患者群 78 名 のうち、脳疾患のタイプに分け詳細な検討を行った。脳梗塞患者 52 名（ラクナ梗塞 17 名、アテローム性梗塞 29 名、心原性梗塞 6 名）ならびに脳出血患者 26 名の尿組織中 3 - HPMA ならびにクレアチニン量を測定し、クレアチニン補正した尿検体中 3 - HPMA 量を算出し解析した。3 - HPMA 量、ならびにクレアチニン補正した尿中 3 - HPMA 量は、健常者群に比べ、脳梗塞患者群ならびに脳出血患者群において有意な減少が認められた。また、脳梗塞患者群と脳出血患者群の間においては、脳出血患者群においてクレアチニン補正した尿中 3 - HPMA 量が低い傾向がみられた。(Fig. 1 - 3)

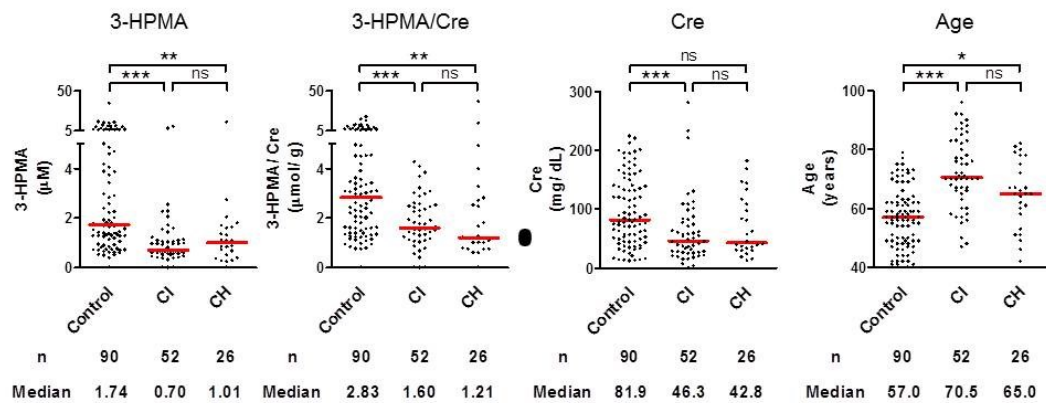


Fig. 1-3 脳梗塞患者および脳出血患者における尿中3 - HPMAの低下

健常者群(Control)ならびに脳梗塞患者群(Cerebral infarction: CI) (ラクナ梗塞17名、アテローム性梗塞29名、心原性梗塞6名)ならびに脳出血患者群(Cerebral hemorrhage: CH) 26名の尿検体について3 - HPMAおよびクレアチニン量を測定した。また年齢を示した。p値はKruskal-Wallis検定を用いて算出した。ns, $p \geq 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

脳梗塞巣または脳出血巣の大きさと尿中 3 - HPMA の減少の相関

脳卒中患者群（78名）のうち、くも膜下出血患者群（2名）を除いた脳梗塞患者群、脳出血患者群を対象に尿中 3 - HPMA 量について検討した。

脳梗塞巣または脳出血巣の病巣部位の大きさが 1cm 未満の患者 20 名（ラクナ梗塞 14 名、アテローム性梗塞 5 名、脳出血 1 名）と、脳梗塞巣ならびに脳出血巣の病巣部位の大きさが 1cm 以上の患者 56 名（ラクナ梗塞 3 名、アテローム性梗塞 24 名、心原性梗塞 6 名、脳出血 23 名）の尿検体について検討を行った。

3 - HPMA 量とクレアチニン量を測定し、クレアチニン補正をした 3 - HPMA 量を算出した。また、各群の年齢ならびに NIHSS を指標に重症度と尿中 3 - HPMA 量についても解析を行った。

その結果、クレアチニン補正した尿検体中 3 - HPMA 濃度は病巣部位の大きさ 1cm 未満群の中央値：2.16 mmol/g Cre と比べて病巣部位の大きさ 1 cm 以上群では、中央値：1.39 mmol/g Cre と有意な減少が認められた。（Fig. 1 - 4）

また、脳卒中重症度評価スケールの一つである NIHSS についても、病巣部位の大きさ 1cm 未満の患者群に比較し、病巣部位の大きさ 1cm 以上の患者群において NIHSS のスコアが有意に高く、病巣の大きさと NIHSS により評価される脳卒中の重症度に相関があることが示唆された。（Fig. 1 - 4）

また年齢については各群間において、差は認められなかった。（Fig. 1 - 4）このことから、尿中 3 - HPMA 量は、年齢の影響を受けずに脳卒中の重症度の指標になる可能性が示唆された。

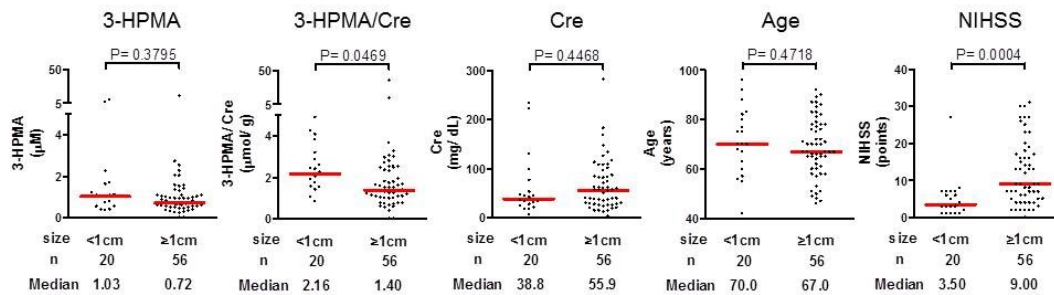


Fig. 1-4 脳梗塞巣および脳出血巣の大きさと尿中3 - HPMAの低下

脳梗塞巣および脳出血巣の大きさが1 cm未満の患者20名、および脳梗塞巣および脳出血巣の大きさが1 cm以上の患者56名の尿検体について3 - HPMAおよびクレアチニン量を測定した。また各群の患者の年齢、ならびにNIHSSを示した。図中の赤い線は、中央値を示している。また、*p*値はWilcoxonの順位和検定を用いて算出した。

【考察】

本研究により、対象者の年齢にかかわらず、脳梗塞ならびに脳出血の有無またその大きさ、ならびに NIHSS を指標とした脳卒中の重症度とアクロレインの尿中排泄体である 3 - HPMA 量の減少に相関があることが明らかとなった。このことから、3 - HPMA が脳卒中の重症度の指標になる可能性が示唆された。

また、虚血性脳卒中（脳梗塞）のみならず脳出血という異なったタイプの脳血管障害に起因する脳細胞傷害においても、3 - HPMA 量が減少することが明らかとなった³²⁾。

これまで脳梗塞患者の血漿中の PC - Acro 量は、健常者に比べ有意に高値を示すことを明らかにしてきた²⁾。その一方で、今回、尿中でのアクロレイン代謝物である 3 - HPMA 量が健常者に比べ、脳卒中患者において減少することが明らかとなった³²⁾。また、その減少傾向は、病巣部位の大きさまた重症度と相関が示唆されたことから、尿中 3 - HPMA 量を測定することは、回復期における治療効果の指標になることが期待される。

これまで、尿中 3 - HPMA 量が減少する機序については、明らかになっていなかったが、今回の結果より、アクロレインに対しての解毒代謝であるグルタチオンが関与する 3 - HPMA への代謝反応が進んでいないことが推察される。

3 - HPMA の生成には、 γ - グルタミルトランスフェラーゼ、システニルグリシナーゼ、*N* - アセチルトランスフェラーゼならびにアルドケトレダクターゼの 4 つの酵素が関与している (Fig. 1 - 1)。今回ご協力いただいた脳卒中患者の、3 - HPMA の生成過程中的律速酵素である γ - グルタミルトランスフェラーゼの活性は、正常の範囲内であった (共同研究者よりの私信)。また、健常者群に比較して、脳梗塞患者群の血漿中のグルタチオン量が減少していることが報告されている³³⁾ことから、尿中 3 - HPMA 量の減少は、グルタチオン量の減少が原因の一

つである可能性が考えられる。さらに、脳梗塞モデルラットを用いた動物実験においても、脳梗塞部位のグルタチオン濃度が有意に低くなることが報告されている³⁴⁾。

細胞が損傷を受けることにより、アクロレインが増加する一方で、その解毒代謝に必要なグルタチオンが不足する状態が脳組織内で継続することにより、アクロレインが代謝されずに生体内に長く存在してしまう。

生成されたアクロレインは、PC - Acro に代表されるように、タンパク質に結合しその機能を失活させることにより、脳梗塞や脳出血のような組織機能障害を引き起こす疾患を悪化させてしまうことが推察される。

また、グルタチオンの組織内濃度は、年齢等の要因でその濃度が変化すると考えられる。このことから、血漿中のアクロレインをさらに減少させ、細胞傷害性を抑制するためには、組織内グルタチオン濃度を増やし、グルタチオンが関与するアクロレイン解毒代謝を促進させること、ならびに SH 基を供給しより効率よくアクロレイン解毒代謝を行わせることが脳梗塞等の脳組織傷害性疾患の重症化を防ぐことになると考えられる。

グルタチオンの供給手段として、グルタチオン製剤の投与をすることにより可能である。これらにより、アクロレインの解毒代謝を促進し、血漿中のアクロレインならびに組織内アクロレイン濃度を減少させ、脳梗塞等の細胞傷害性疾患の予防ならびに治療、改善に効果が期待される。

本研究において、検体の採取に負担の少ない尿検体を対象とした 3 - HPMA 量が、年齢の影響を受けずに、脳卒中の病巣部位の大きさならびに、重症度の指標となり得ることが推察された。

第二章

軽度認知機能障害およびアルツハイマー病患者における

血漿中バイオマーカーの検討

【目的】

細胞傷害の原因として知られている活性酸素種 ($O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ 、 H_2O_2) よりも、アクロレインが強い細胞毒性を示し、細胞傷害を引き起こす可能性が報告されている²⁹⁾。

さらに、脳梗塞時の細胞傷害性についてアクロレインに着目した研究により、血漿中の PC - Acro 量、AcPAO 活性、SMO 活性が増加していることが Tomitori らにより報告されている²⁴⁾。また、PC - Acro、IL - 6、CRP に加えて、年齢を因子としリスク値を算出することで、SBI を検出できることを報告している²¹⁾。また、SBI に加え、脳梗塞の危険因子である CA ならびに WMH 患者においても血漿中の PC - Acro、IL - 6 および CRP 量が増加することを明らかにし、症状との関連性が認められた。

脳梗塞等の脳血管障害は、認知症の原因疾患である。脳血管障害とならび、認知症の原因疾患としてアルツハイマー病が知られている。アルツハイマー病は、認知機能障害ならびに身体機能障害を特徴とする進行性の神経変性疾患であり、高齢者においては認知症の全体の 5 割以上のを占める原因疾患である^{35,36)}。

近年では、軽度認知機能障害 (MCI) ならびにアルツハイマー病の重症度診断において、MRI 画像に加え、fluorodeoxyglucose (FDG) - positron emission tomography (PET) ならびに amyloid PET が使用されている^{37,38)}。しかしながら、これらの検査は、国内において導入している医療施設が少なく、高価であり、さらに高度な技量が必要とされるため普及が進んでいない。そこで、MCI ならびにアルツハイマー病の軽度認知機能低下症の重症度診断において、より簡便に受けられるバイオマーカーが必要とされている。

アルツハイマー病のバイオマーカーとして、患者に必ず検出される老人斑の構成成分である $A\beta$ が注目されている。 $A\beta$ には、アミノ酸40個からなる $A\beta_{40}$ と、ア

ミノ酸42個からなる $A\beta_{42}$ が存在する。アルツハイマー病患者において報告されている $A\beta$ の研究結果は様々である。いくつかの報告では、血漿中の $A\beta_{40}$ と、 $A\beta_{42}$ の値はアルツハイマー病患者群および健常者群間において有意な差はないと報告されている³⁹⁻⁴²⁾。一方、他の報告では $A\beta_{42}$ と、 $A\beta_{40/42}$ 比は、健常者群に比べアルツハイマー病患者群で有意に低下している⁴³⁻⁴⁷⁾。

広く知られている $A\beta$ に加え、アルツハイマー病患者の脳組織中の PC - Acro または遊離型のアクロレインが増加することも報告されている⁴⁸⁻⁵¹⁾。したがって、アクロレインがアルツハイマー病のバイオマーカーとなり得る可能性が考えられる。

本章において、認知機能障害の重症度、MCI およびアルツハイマー病のバイオマーカーとして血漿中の PC - Acro ならびに、 $A\beta_{40}$ および $A\beta_{42}$ の有用性を検討した。

【対象と方法】

対象

本臨床研究はヘルシンキ宣言を基盤原則として、国立大学法人千葉大学大学院薬学研究院、東京都総合医学研究所ならびに松戸市立福祉医療センター東松戸病院の倫理委員会に承認を得て行った。また、インフォームドコンセントは被験者本人またはその介護者に対し行った。

健常者 33名、大脳白質病変を有する非認知症者 (non - demented subjects with white matter hyper intensity:nd - WMH) 68名、MCI患者 50名、アルツハイマー病患者 70名、合計 221名のボランティアの協力を得た。(Table 2 - 1)

MCIならびにアルツハイマー病の診断は、the National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease Related Disorders Association (NINCDS - ADRDA) の診断基準に従って行った^{52,53,54}。

また、PC - Acro は、脳梗塞ならびに慢性腎不全の指標として有用であることが報告されている^{24,55,56}ため、本臨床研究において脳梗塞（アテローム血栓性脳梗塞、脳塞栓症、ラクナ梗塞）、慢性腎不全ならびに心機能障害を有する被験者は除外している。

血漿検体

3 U/ml ヘパリン管で採血し、遠心分離（1,500 × g、10 分間）後、血漿成分を採取し、PC - Acro、Aβ、IL - 6、CRP の測定に用いた。

MRI 検査

1.5 テスラの MR 装置（東芝 Visart 1.5T MRI）を使用し、T1、T2 画像、ならびに FLAIR（fluid attenuated inversion recovery）法により MRI 画像を撮影した。MRI 画像を基に、早期アルツハイマー型認知症診断支援システム（VSRAD）を用いて、Z - Score を算出し、海馬領域を含む脳の萎縮度を評価した。

また、大脳白質病変のグレードは、側脳室周囲病変（PVH）および深部皮質下白質病変（DSWMH）について Shinohara らの方法⁵⁷⁾に従い評価した。

血漿中の PC - Acro、A β オリゴマー、A β ₄₀、A β ₄₂、IL - 6 および CRP の測定

PC - Acro[N^ε - (3 - formyl - 3,4 - dehydropiperidino) - lysine (FDP - Lysine)] は、ACR - Lysine 測定キット（日本油脂）を用い内田らの方法⁵⁸⁾により測定した。

A β オリゴマーは、アミロイド A β オリゴマー測定 ELISA キット（IBL）を用いて測定した。A β ₄₀、A β ₄₂は、ヒト β アミロイド(1 - 40) ELISA キット II (Wako)、高感度ヒト β アミロイド(1 - 42) ELISA キット (Wako) を使用し、添付のマニュアルに従い測定した。

IL - 6 ならびに CRP は、ヒト IL - 6 測定 ELISA キット (Pierce 社) ならびに N - アッセイ LA CRP - T (ニッポー) を用いて測定した。

検定

統計的計算は、GraphPad Prism®Software (GraphPad Software) により実行した。値は、中央値 \pm 四分位偏差で示した。各群は、Wilcoxon の順位和検定、Yates の χ^2 検定 (2 群間) または、Kruskal-Wallis 検定 (3、4 群間) を用いて比較した。

相対リスク値

相対リスク値は、人工ニューラルネットワークを用い NEUROSIM/L ソフト (Fujitsu) により算出した^{27,59)}。健常者群ならびにアルツハイマー病患者群のデータ、PC - Acro、A β _{40/42}、年齢を使用し健常者群を 0、アルツハイマー病患者群を 1 として使用した。その結果を基に、各群の相対リスク値を算出した。また、感度、特異度については、ROC 曲線 (Receiver Operatorating Characteristic curve) を使用し評価した。

Table 2-1 認知症バイオマーカー検索のボランティア内訳

	Control	nd-WMH	MCI	AD
N	33	68	50	70
MMSE	29.5 \pm 1.0	29.0 \pm 2.0	23.0 \pm 2.5***	18.0 \pm 3.0***
Age (years)	64.0 \pm 10.3	75.5 \pm 6.3**	79.5 \pm 5.8***	81.0 \pm 4.5***
Gender (% female)	48.5	58.8	48.0	72.9*
WMH grade (PVH+DSWMH)	0 \pm 0	3.0 \pm 1.0***	3.0 \pm 1.0***	3.0 \pm 2.0***
Hypertension (%)	18.2	48.5**	58.0***	44.3*
Hyperlipidemia (%)	24.2	27.9	20.0	21.4
Hyperglycemia (%)	15.2	11.8	20.0	15.7

Control : 健常者

nd-WMH : 大脳白質病変を有する非認知症患者

MCI : 軽度認知障害者

AD : アルツハイマー病患者

MMSE (Mini-Mental State Examination), 認知機能検査

各群の人数、年齢、性別 (女性の割合)、WMHのグレード、高血圧、高脂血症ならびに高血糖の割合を示している。また、*p*値は、クラスカル・ワリスの検定または χ^2 検定で算出した。**p*<0.05; ***p*<0.01; ****p*<0.001 vs 健常者群である。

【結果】

血漿中の PC - Acro、A β オリゴマー、A β ₄₀、A β ₄₂、IL - 6 および CRP について

健常者群 33 名、nd - WMH 群 68 名、MCI 患者群 50 名およびアルツハイマー病患者群 70 名の血漿検体を用い PC - Acro、A β オリゴマー、A β ₄₀、A β ₄₂、IL - 6 および CRP を測定した。

PC - Acro は、MCI 群およびアルツハイマー病患者群において、健常者群に対し $p < 0.01$ の有意な増加が認められた。nd - WMH 群で健常者群に対し増加傾向が見られたが、有意な差は認められなかった。

しかし、同時に測定した IL - 6、CRP、A β オリゴマー、A β ₄₀、A β ₄₂は、nd - WMH 群、MCI 群およびアルツハイマー病患者群のどの群においても、健常者群に対して有意な変化は認められなかった。

一方、A β ₄₀、A β ₄₂の値より算出した A β _{40/42}比では、nd - WMH 群では健常者群に対し、有意な差は認められなかったが、認知機能障害を有する MCI 群およびアルツハイマー病患者群では、健常者群に対し有意な増加が認められた。(それぞれ、 $p < 0.05$ および $p < 0.01$; Fig 2 - 1A)

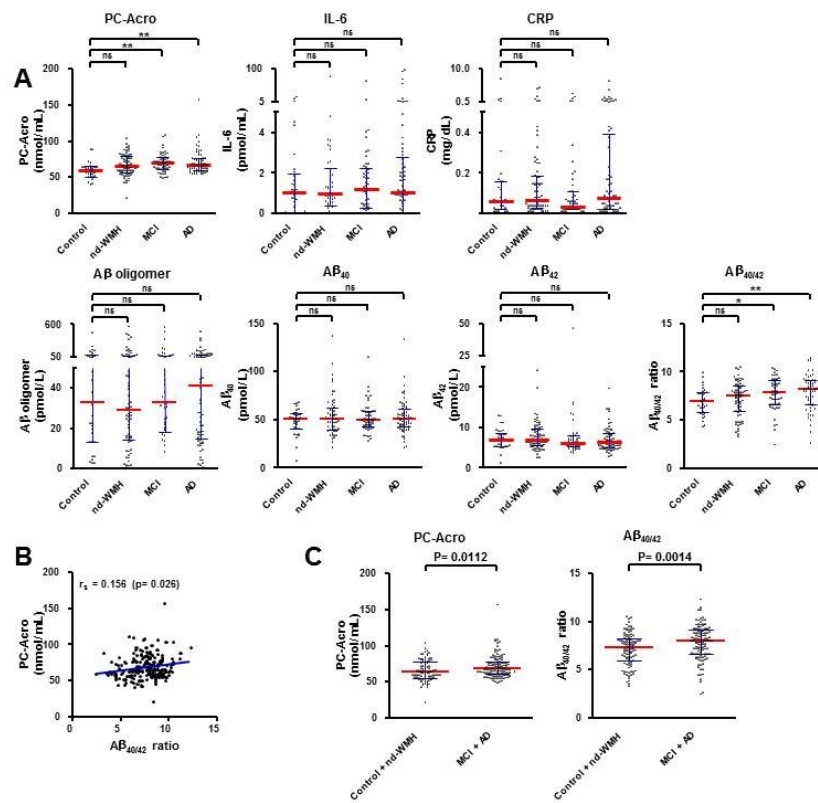
血漿中 PC - Acro と A β _{42/42}比の相関について

次に、MCI 群ならびにアルツハイマー病患者の血漿中 PC - Acro 量ならびに、A β ₄₀、A β ₄₂により求めた A β _{40/42}比が、健常者群に対し有意に増加していたことから、PC - Acro 量と A β _{40/42}比の相関性を検討した。

その結果、A β _{40/42}比と PC - Acro 量には $p = 0.026$ で有意な相関関係が認められた (Fig. 2 - 1B)。

認知機能障害と PC - Acro、A β _{40/42}比の相関をみるために Fig. 2-1 A のデータを基に、認知機能障害のない群 (健常者群+nd - WMH 群)、ならびに認知機

能障害を有する群（MIC 患者群+アルツハイマー病患者群）に分類し、認知機能障害と PC - Acro、 $A\beta_{40/42}$ 比の相関についてあらためて検定した。その結果、PC - Acro は、認知機能障害のない群の中央値 63.4 nmol/mL に対し、認知機能障害を有する群では、中央値 67.9 nmol/mL、 $p=0.0112$ となり、 $A\beta_{40/42}$ 比は、認知機能障害のない群の中央値 7.3 に対し、認知機能障害を有する群では、中央値 8.0、 $p=0.0014$ と共に有意な増加が確認された。（Fig. 2 - 1C）



**Fig. 2-1 各群における血漿中PC-Acro、IL-6、CRP、
Aβ(Aβ oligomer、Aβ₄₀、Aβ₄₂) 量**

Aは、健常者群、nd-WMH群、MCI患者群、アルツハイマー病患者群の血漿中PC-Acro、IL-6、CRP、Aβ(Aβ oligomer、Aβ₄₀、Aβ₄₂)量、ならびにAβ_{40/42}比を示している。
ns, $p \geq 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$;

Bは、血漿中PC-AcroとAβ_{40/42}比の相関を示している。Spearmanの順位相関係数を図中に示した。

Cは、健常者群とnd-WMH群、MCI患者群とアルツハイマー病患者群の血漿中PC-AcroならびにAβ_{40/42}比を示している。

PC - Acro、 $A\beta_{40/42}$ 比への年齢の影響について

PC - Acro、 $A\beta_{40/42}$ 比への年齢の影響を検討するため 60～83 歳までの対象者を抽出しデータ解析を行った。検体数は、60～83 歳の対象者は、健常者群 20 名、nd - WMH 群 57 名、MCI 患者群 33 名、ならびにアルツハイマー病患者群 34 名である。

血漿中 PC - Acro 量は、MCI 患者群、ならびにアルツハイマー病患者群で健常者群および nd - WMH 群に対しても増加傾向がみられたが、統計的に有意でなかった。(Fig2 - 2A)

$A\beta_{40/42}$ 比は、アルツハイマー病患者群では、健常者群ならびに nd - WMH 群に対し増加している傾向がみられたが、統計的に有意ではなかった。また、nd - WMH 群では健常者群に対し低下の傾向が認められた。統計的有意差の消失はサンプル数の低下が原因と考えられた。

PC - Acro、 $A\beta_{40/42}$ 比への認知機能障害の影響について

PC - Acro、 $A\beta_{40/42}$ 比が、認知機能障害の指標となり得るか検討した。認知機能障害を有さない群（健常者群+nd - WMH 群）および、認知機能障害を有する群（MCI 患者群+アルツハイマー病患者群）の両群間で比較を行った。その結果、PC - Acro は $p=0.0379$ 、 $A\beta_{40/42}$ 比は $p=0.0133$ と有意な増加が認められた。(Fig2 - 2 B)

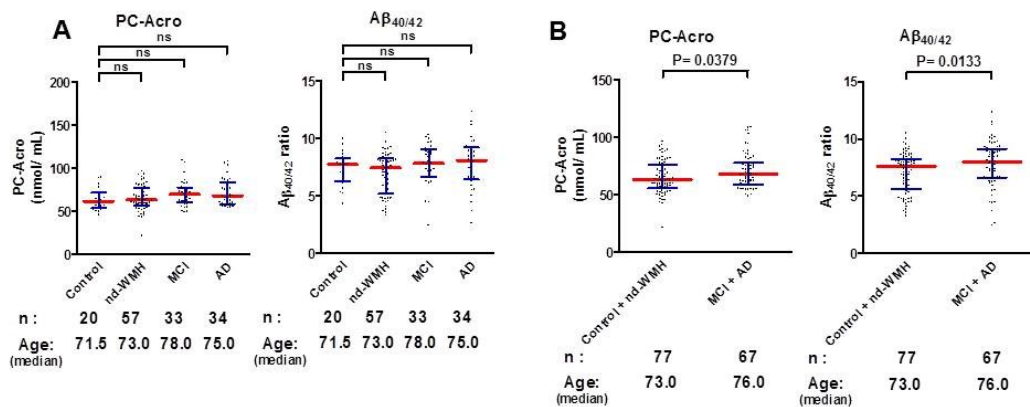


Fig. 2-2 各群における血漿中PC-Acro量ならびに $A\beta_{40/42}$ 比

Aは、健常者群、nd-WMH群、MCI患者群、アルツハイマー病患者群のうち60～83歳の対象者の血漿中PC-Acroならびに $A\beta_{40/42}$ 比を示している。

Bは、健常者群、nd-WMH群、MCI患者群、アルツハイマー病患者群のうち60～83歳の対象者の血漿中PC-Acroならびに $A\beta_{40/42}$ 比を示している。

相対リスク値と脳萎縮度について

PC - Acro、 $A\beta_{40/42}$ 比ならびに年齢をもとに、相対リスク値を算出した。相対リスク値は、健常者群を0、アルツハイマー病患者群を1とし、本臨床研究対象者のPC - Acro量、 $A\beta_{40/42}$ 比、年齢を基に人工ニューラルネットワークを使用し求めた。その結果、nd - WMH群、MCI患者群ならびにアルツハイマー病患者群は健常者群に対し、有意に高値を示した。リスク値は、アルツハイマー病患者群 > MCI患者群 >> nd - WMH群 >> 健常者群の順で高値であった。(Fig. 2 - 3A)

脳の萎縮度を示すZ - Scoreに関しては、MCI患者群ならびにアルツハイマー病患者群で健常者群に対し有意な脳萎縮の増大が認められた。(Fig. 2 - 3B)

また、nd - WMH群は健常者群に対し、脳萎縮度の増加傾向が見られたが有意な差は認められなかった。しかしながら、相対リスク値は、nd - WMH群においても健常者群に対し有意に高値を示した。(Fig. 2 - 3A、B)

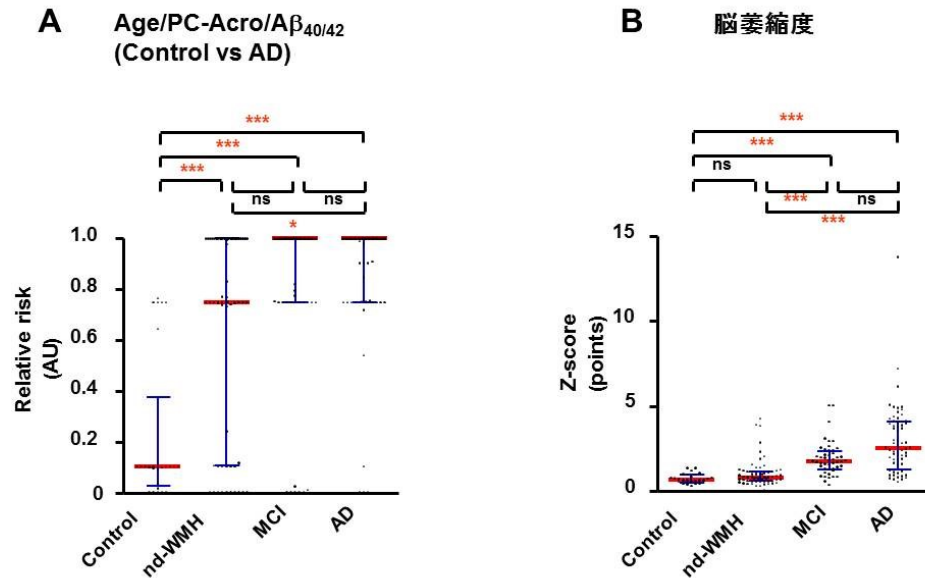


Fig. 2-3 各群における相対リスク値および脳萎縮度の関連
 Aは、各群の血漿中PC-Acro、Aβ_{40/42}比、年齢より算出される相対リスク値を示している。
 Bは、各群の脳萎縮度を示している。ns, $p \geq 0.05$; * $p < 0.05$; *** $p < 0.01$

大脳白質病変グレードと血漿中 PC - Acro、Aβ_{40/42} 比ならびに相対リスク値との相関

本臨床研究対象者 221 名の大脳白質病変グレード (PVH+DSWMH) と血漿中 PC - Acro、Aβ_{40/42}比、Aβ_{40/42}/PC - Acro ならびに年齢/Aβ_{40/42}/PC - Acro より求めた相対リスク値との相関を検討した。また、各群の対象者内訳は、Grade 0 群 38 名、Grade 1 - 4 群 141 名、Grade 5 - 8 群 42 名であった。

血漿中 PC - Acro 量では、Grade 1 - 4 群、Grade 5 - 8 群ともに、Grade 0 群に対し、 $p < 0.05$ と有意な増加が認められた。(Fig. 2 - 4A)

また、Aβ_{40/42}比は、Grade 1 - 4 群、Grade 5 - 8 群ともに Grade 0 群に対し、増加傾向がみられたが統計的に有意ではなかった。(Fig. 2 - 4B)

さらに、PC - Acro と Aβ_{40/42}比より求めた相対リスク値、さらに年齢因子も加えた相対リスク値についても検討した結果、どちらの相対リスク値も Grade 1 - 4

群、Grade 5 - 8 群ともに Grade 0 群に対し有意な高値を示した。さらに、この時の p 値は、 $p < 0.001$ であったことから、PC - Acro と $A\beta_{40/42}$ 比を両方測定することが重要であることが示唆された。(Fig. 2 - 4C、D)

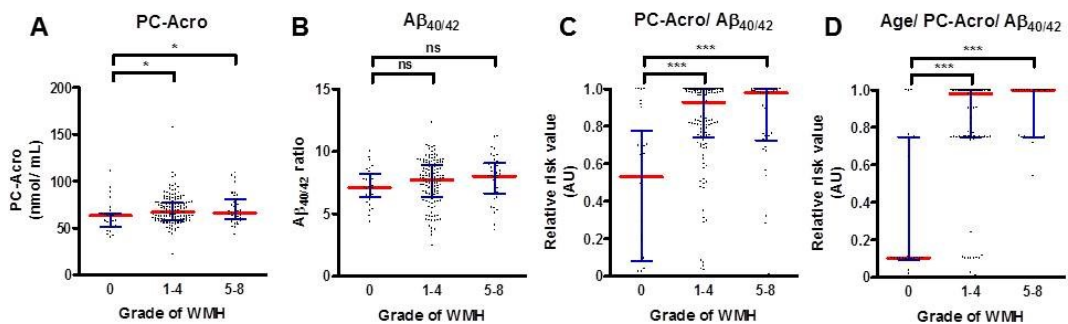


Fig. 2-4 大脳白質病変グレードと血漿中PC - Acro、 $A\beta_{40/42}$ 比ならびに相対リスク値

被験者221名を、大脳白質病変のないグループをGrade 0とし、大脳白質病変グレード(PVH+DSWMH)を、Grade 1-4、Grade 5-8の群に分けた。

Aは、各群の血漿中PC - Acro量、Bは、各群の血漿中 $A\beta_{40/42}$ を示している。

Cは、PC - Acro量、ならびに $A\beta_{40/42}$ より求めた相対リスク値を示している。

Dは、PC - Acro量、 $A\beta_{40/42}$ 、ならびに年齢より求めた相対リスク値を示している。

値は、中央値±四分位偏差を示している。 ns : $p \geq 0.05$ 、* $p < 0.05$ 、*** $p < 0.001$ を示す。

血漿中 PC - Acro、 $A\beta_{40/42}$ 比、 $A\beta_{40/42}$ /PC - Acro ならびに年齢/ $A\beta_{40/42}$ /PC - Acro と

MMSE および Z - Score との相関

本研究対象者の血漿中 PC - Acro、 $A\beta_{40/42}$ 、 $A\beta_{40/42}$ /PC - Acro ならびに年齢/ $A\beta_{40/42}$ /PC - Acro と、臨床データの MMSE および Z - Score との相関を検討した。

その結果、脳萎縮度を示す Z - Score と PC - Acro との間には相関が認められなかったが、Z - Score と $A\beta_{40/42}$ 、 $A\beta_{40/42}/PC - Acro$ ならびに年齢/ $A\beta_{40/42}/PC - Acro$ について、相関が認められた。(Table 2 - 2)

また認知機能障害の指標である MMSE と $A\beta_{40/42}$ 、 $A\beta_{40/42}/PC - Acro$ ならびに年齢/ $A\beta_{40/42}/PC - Acro$ は、いずれの項目でも相関が認められた。(Table 2 - 2)

Table 2-2 血漿中PC-Acro、 $A\beta_{40/42}$ 、 $A\beta_{40/42}/PC-Acro$ ならびにAge/ $A\beta_{40/42}/PC-Acro$ 値とMMSEまたはZ-scoreとの相関

		Parameter			
		PC-Acro	$A\beta_{40/42}$	$A\beta_{40/42}/PC-Acro$	Age/ $A\beta_{40/42}/PC-Acro$
MMSE	r_s	-0.148	-0.249	-0.265	-0.334
	p value	0.034*	< 0.001***	< 0.001***	< 0.001***
Z-score	r_s	0.053	0.159	0.208	0.276
	p value	0.446	0.023*	0.003**	< 0.001***

MMSE (Mini-Mental State Examination), 認知機能検査
Z-score, 脳萎縮度を表すスコア

臨床研究対象者221名のデータについて Spearman 順位相関係数を求めた。
* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ を示す。

【考察】

アルツハイマー病は、有用なバイオマーカーが存在しておらず、簡便に受診可能な検査が必要である。アルツハイマー病のバイオマーカーの有力な候補として $A\beta$ ならびに PC-Acro が挙げられる。

アルツハイマー病ならびに、MCI において $A\beta_{40/42}$ 比、PC - Acro 量がバイオマーカーとして有用であるか否かを、健常者群、大脳白質病変を有する非認知症患者、MCI 患者、ならびにアルツハイマー病患者を対象に検討した。その結果、MCI 患者群およびアルツハイマー病患者群で血漿中 PC - Acro ならびに $A\beta_{40/42}$ が有意に上昇し、さらに、それらの結果を基に算出した相対リスク値は、アルツハイマー病患者群 > MCI 患者群 > nd - WMH 群 > 健常者群であった。

また、MCI 患者群、アルツハイマー病患者群では健常者群に比べ $A\beta_{40/42}$ 比、PC - Acro 量が有意に増加することが明らかとなり、 $A\beta_{40/42}$ 比、PC - Acro 量の増加には相関が認められた。

これらのことから、血漿中 PC - Acro、 $A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{42}$ 量は MCI ならびにアルツハイマー病の有用なバイオマーカーであることが示唆された⁶⁰⁾。

また、大脳白質病変を有する非認知症患者群において、健常者群と Z - Score の差が認められなかった。一方、各バイオマーカーより算出した相対リスク値では、大脳白質病変を有する非認知症患者群の有意な増加が認められた。このことから、これらバイオマーカーは、MCI ならびにアルツハイマー病のみならず、大脳白質病変の検出にも有用であることが示唆された。特に、MCI ならびにアルツハイマー病患者の診断において、MMSE の実施とバイオマーカー (PC - Acro、 $A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{42}$) を測定することが重要であることが示唆された⁶⁰⁾。

また、大脳白質病変のグレードと血漿を対象検体とした PC - Acro、PC - Acro / $A\beta_{40/42}$ ならびに年齢 / PC - Acro / $A\beta_{40/42}$ より求めた相対リスク値は、相関が認めら

れ、このことから大脳白質病変の検出、さらにはその増大の指標になる可能性が示唆された⁶⁰⁾。

第三章

軽度認知症およびアルツハイマー病患者における

脳脊髄液中バイオマーカーの検討

【目的】

認知症の進行過程において軽度の認知機能低下から段階を経て重度の認知機能低下が認められると自力では日常生活を送れなくなり、介護が必要になる。また、認知機能低下の段階の中で、アルツハイマー型認知症に進行する場合と、軽度の認知機能低下で安定している場合がある。

認知機能検査としては MMSE (Mini - mental state examination) が多く用いられている。MMSE は、簡便な検査により 30 点満点で評価する。27～30 点は正常、22～26 点は軽度認知症の疑いあり、21 点以下では認知症の疑いが強いと判定される。また、現在は画像による判定も進歩しており、MRI 画像を基に、早期アルツハイマー型認知症診断支援システム (VSRAD) を用いて、Z - Score を算出することにより海馬の萎縮度の解析が可能である。

認知機能障害のバイオマーカーとして、血漿中の PC - Acro ならびに $A\beta_{40/42}$ 比について検討した結果、MCI 患者群およびアルツハイマー病患者群で健常者群に比べ有意に増加することを明らかにしている²⁶⁾。

また、脳脊髄液 (CSF) 中の $A\beta$ ($A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{42}$) に加え、神経原線維変化の成分であるリン酸化タウタンパク質量ならびに総タウタンパク質が、アルツハイマー病のバイオマーカーとして注目されている。アルツハイマー病患者の CSF については、 $A\beta_{42}$ 量が減少し、総タウタンパク質ならびにリン酸化タウタンパク質量が増加することが報告されている⁶¹⁻⁶⁵⁾。

本論文第二章において非認知症患者 101 名、認知症患者 120 名 (MCI 患者 50 名、アルツハイマー病患者 70 名) の血漿検体について、PC - Acro、 $A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{42}$ 量を測定した結果、認知症患者群では非認知症患者群に比べ PC - Acro、 $A\beta_{40/42}$ 比が有意に増加することを明らかにしてきた。

本章において、アルツハイマー病患者と MCI 患者計 94 例について、CSF 中の

PC - Acro、A β ₄₀、A β ₄₂量を測定し、MMSE ならびに Z - Score との相関性を評価し、バイオマーカーとしての有用性を検討した。

【対象と方法】

対象

本臨床研究はヘルシンキ宣言を基盤原則として、国立大学法人千葉大学大学院薬学研究院ならびに松戸市立福祉医療センター東松戸病院の倫理委員会に承認を得て行った。また、インフォームドコンセントは患者本人またはその介護者に対し行った。

本研究では、MCI 患者 40 名、アルツハイマー病患者 54 名、合計 94 名のボランティアの協力を得た。MCI ならびにアルツハイマー病の診断は、the National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease Related Disorders Association (NINCDS - ADLDA) の診断基準に従って行った^{52,53,54)}。MCI 患者群の被験者は約 3 か月間隔で神経心理学的検査を受け再評価した。アルツハイマー病への診断の変更は、1) 認知機能の悪化が 6 か月継続している、2) 診療時の認知症評価ポイントが過去 2 回の平均値が 0.5 以上低下したときに行われた。

また、PC - Acro は、脳梗塞ならびに慢性腎不全のバイオマーカーとして報告されている^{24,55,56)}ため、本臨床研究からアテローム血栓性脳梗塞、脳塞栓症、ラクナ梗塞患者、慢性腎不全ならびに心機能障害を有する被験者は除外している。

被験者の MMSE の中央値は MCI 患者群で中央値 23.0 ± 2.3 、アルツハイマー病群で 18.0 ± 5.0 であった。また、被験者の女性の割合は報告⁶⁶⁾されているように MCI 患者群 60%、アルツハイマー病患者群 70% と高い割合であった。

CSF 検体

CSF 検体は腰椎穿刺により採取し、測定に使用するまで -80°C にて凍結保存した。

MRI 検査

1.5 テスラの MR 装置（東芝 Visart 1.5T MRI）を使用し、T1、T2 画像、ならびに FLAIR（fluid attenuated inversion recovery）法により MRI 画像を撮影した。MRI 画像を基に、早期アルツハイマー型認知症診断支援システム（VSRAD）を用いて、Z - Score を算出し、海馬領域を含む脳の萎縮度を評価した。

CSF 中の A β ₄₀、A β ₄₂、PC - Acro、総タウタンパク質ならびにリン酸化タウタンパク質の測定

A β ₄₀、A β ₄₂は、ヒト β アミロイド（1 - 40）ELISA キット II（Wako）、高感度ヒト β アミロイド（1 - 42）ELISA キット（Wako）を使用し、添付のマニュアルに従い測定した。

PC - Acro[N^ε - (3 - formyl - 3,4 - dehydropiperidino) - lysine (FDP - Lysine)] は、ACR - Lysine 測定キット（日油株式会社）を用い内田らの方法⁵⁸⁾により測定した。

総タウタンパク質、リン酸化タウタンパク質は、Fino Scholar ヒトタウ ELISA 測定キット（Innogenetics）、Innotest リン酸化タウ ELISA 測定キット（Innogenetics）を使用し、添付のマニュアルに従い測定した。

脳組織中（前頭葉ならびに側頭葉）の A β ₄₀、A β ₄₂、PC - Acro の測定

医療法人さわらび会 福祉村病院 長寿医学研究所の倫理委員会の承認を得て、8 名のアルツハイマー病患者の前頭葉ならびに側頭葉の剖検検体の一部の提供を得た。同じく 7 名の脳卒中患者、1 名の心不全患者の剖検検体から前頭葉ならびに側頭葉の一部を対照（疾患対照）として提供された。

各脳組織 50 mg を、NP - 40 lysis buffer (10 mmol/ Tris - HCl , pH 7.5、10 mmol/l NaCl、3 mmol/l MgCl₂、0.5 % (V/V) NP - 40、50 μmol/l FUT - 175) を加え、穏やかに溶解した。懸濁液を遠心分離 (500×g、5 分間) 後、上清 (タンパク質量 20μg) を用い PC - Acro 抗体 (MoBiTec) を使用し、ウエスタンブロット法⁶⁷⁾により PC - Acro を検出し、発光強度を数値化した。

Aβ₄₀、Aβ₄₂は、遠心分離後の上清液について、ヒトβアミロイド (1 - 40) ELISA キット II (Wako)、高感度ヒトβアミロイド (1 - 42) ELISA キット (Wako) を使用し、添付のマニュアルに従い測定した。

タンパク質量は、Bradford 法⁶⁸⁾により測定した。また、ウエスタンブロット法でのゲル上のタンパク質は、Coomassie Brilliant Blue R - 250 (CBB) で染色した。

脳組織 (海馬) の PC - Acro の免疫染色

医療法人さわらび会 福祉村病院 長寿医学研究所の倫理委員会の承認を得て、8 名のアルツハイマー病患者の剖検検体のうち海馬の一部の提供を得た。同じく 7 名の脳卒中患者、1 名の心不全患者の剖検検体のうち海馬の一部が対照 (疾患対照) として提供された。

ホルマリン固定した剖検検体を、パラフィン包埋し組織切片を作製した。スライドガラスを恒温槽 (56°C、15 分間) に入れ温めた。その後、キシレン槽に 5 分間浸し、キシレンを交換しさらに 5 分間浸した。次に、無水エタノール、90 % エタノール、80 % エタノールに各 3 分間浸し、スライドガラスを流水で 30 秒間流した。次に PBS に 30 分間浸し、脱パラフィンを行った。0.1 % トリプシンの PBS 溶液にスライドガラスを浸し、マイクロウェーブを 5 分間作動させ 1 分間室温に置く操作を 3 回行い、抗原性の賦活化を行った。室温で静置し、冷却後、3 %

H₂O₂を含む PBS (phosphate-buffer saline) で処理後、抗アクロレインモノクローナル抗体 (日油株式会社) を用い加湿した容器中にて 4 °C、1 晩静置し 1 次抗体反応を行った。PBS で洗浄後、加湿した容器中にて室温 60 分静置し、ビオチン標識抗体を用い 2 次抗体反応を行い、アルカリホスファターゼ染色を行った。洗浄後、ヘマトキシリンにより対比染色を行い、封入後、顕微鏡下で観察した。

検定

統計的計算は、GraphPad Prism®Software (GraphPad Software) により実行した。値は、平均値±標準偏差、または中央値±四分位偏差で示した。

各群は、Student の t 検定、または Wilcoxon の順位和検定、または Yates の χ^2 検定を用いて比較した。各因子間の相関係数 (Spearman 順位相関係数) との p 値、または非線形モデルより相関関係を検討した。

【結果】

アルツハイマー病患者の脳組織中 PC - Acro、 $A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{42}$ の増加

アルツハイマー病患者の脳組織中において、PC - Acro、 $A\beta_{40}$ および $A\beta_{42}$ が増加すると考え、アルツハイマー病患者の脳組織中の PC - Acro、 $A\beta_{40}$ および $A\beta_{42}$ をウエスタンブロット法により測定し、疾患対照者の脳組織と比較し検討を行った。その結果、アルツハイマー病患者の脳組織では正常部位の脳組織に比べ PC - Acro が前頭葉で 1.44 倍、側頭葉で 1.37 倍それぞれ有意に増加していた ($p<0.05$)。 $A\beta_{40}$ および $A\beta_{42}$ も予想通り、前頭葉ならびに側頭葉組織中において有意に増加していることが明らかとなった ($p<0.05$)。 (Fig. 3 - 1、Fig. 3 - 2) 組織における増加の度合いは、 $A\beta_{42}>A\beta_{40}>PC - Acro$ であった。このことから、MCI ならびにアルツハイマー病患者の血漿中の $A\beta_{40/42}$ 比の増加は、 $A\beta_{42}$ が脳に蓄積されやすいためであることが確認された。

また、これまで報告されているアルツハイマー病患者の海馬組織への PC - Acro の蓄積⁴⁸⁾は、抗アクロレインモノクローナル抗体を用いた免疫染色により、錐体細胞層ならびに周囲における染色性の増加が見られたことで明瞭に確認できた。

(Fig. 3-3)

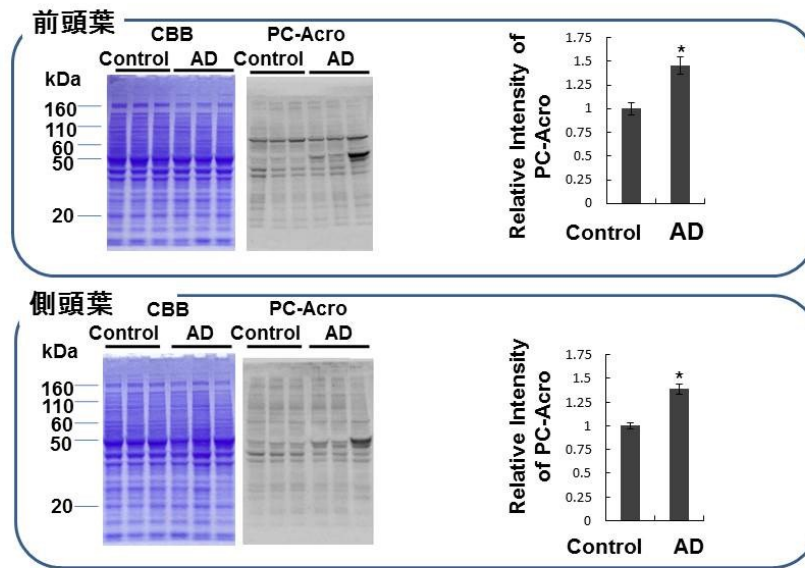


Fig. 3-1 アルツハイマー病患者脳組織中PC-Acro

アルツハイマー病患者脳組織および疾患対照者(脳卒中患者、心不全患者)の脳組織中PC-Acro量を測定した。ウエスタンブロット法を用い、LAS-3000を使用し蛍光強度を数値化し評価した。*p*値は、Studentの*t*検定を行った。**p*<0.05

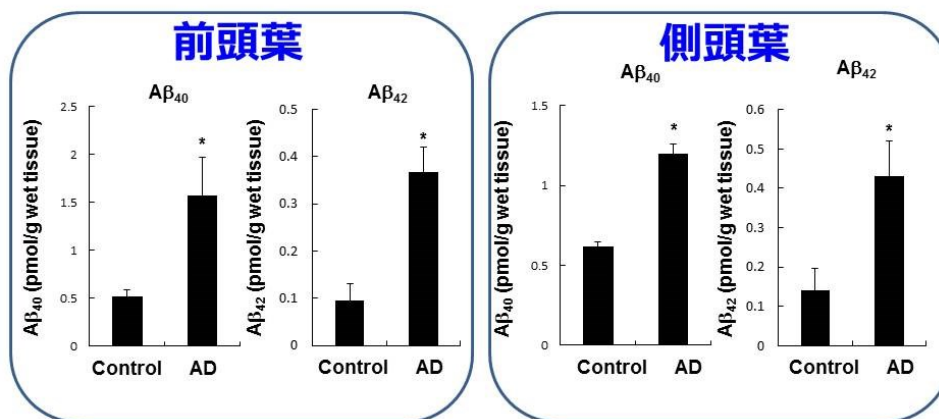
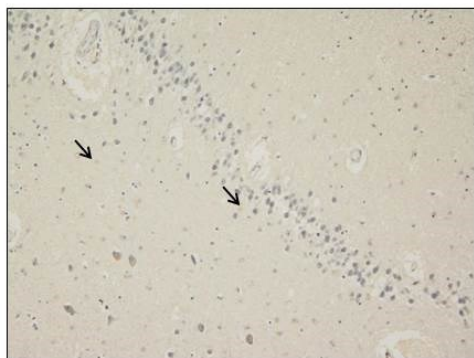


Fig. 3-2 アルツハイマー病患者脳組織中のAβ₄₀およびAβ₄₂

アルツハイマー病患者脳組織および疾患対照者(脳梗塞患者、心不全患者)脳組織中Aβ₄₀およびAβ₄₂量をELISA法により測定した。*p*値は、Studentの*t*検定を行った。**p*<0.05

疾患対照者(×20)



アルツハイマー病患者(×20)

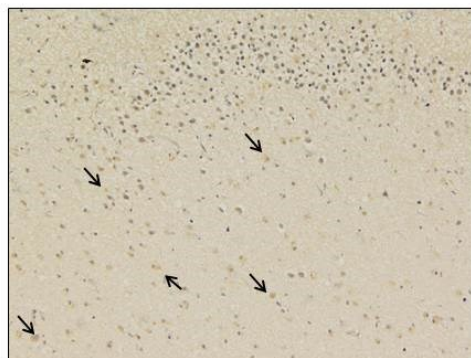


Fig. 3-3 アルツハイマー病患者脳組織 (海馬) 中PC - Acroの蓄積

アルツハイマー病患者ならびに年齢を合わせた疾患対照者の脳組織(海馬)について、抗アクロレインモノクローナル抗体(日油株式会社)を用いて免疫染色を行い、PC - Acroの蓄積を確認した。

アルツハイマー病患者群における CSF 中 $A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{40/42}$ 、 $A\beta_{40}/PC - Acro$ の減少

第二章において述べた血漿中の $A\beta$ ならびに PC-Acro ではアルツハイマー病患者と MCI 間の区別ができなかった。そこで CSF 中の $A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{40}/PC - Acro$ 、 $A\beta_{40/42}$ について測定した。この結果、アルツハイマー病患者群では MCI 患者群に比べ有意な減少が認められた。各々の p 値は $A\beta_{40}$ ($p=0.0026$)、 $A\beta_{40/42}$ ($p=0.0210$)、 $A\beta_{40}/PC - Acro$ ($p=0.0115$) において有意な減少が認められた。一方、 $A\beta_{40}/PC - Acro$ 比では有意な差が認められなかった ($p=0.2861$)。 (Fig.3 - 4)

また、 $A\beta_{42}$ 、PC - Acro および $A\beta_{42}/PC - Acro$ については MCI 患者群ならびにアルツハイマー病患者群間の差は認められなかった。(Fig.3 - 4) このことから、MCI 患者群とアルツハイマー病患者群の識別を行うためには、CSF 中の $A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{40/42}$ 、 $A\beta_{40}/PC - Acro$ の測定が重要であることが明らかとなった。

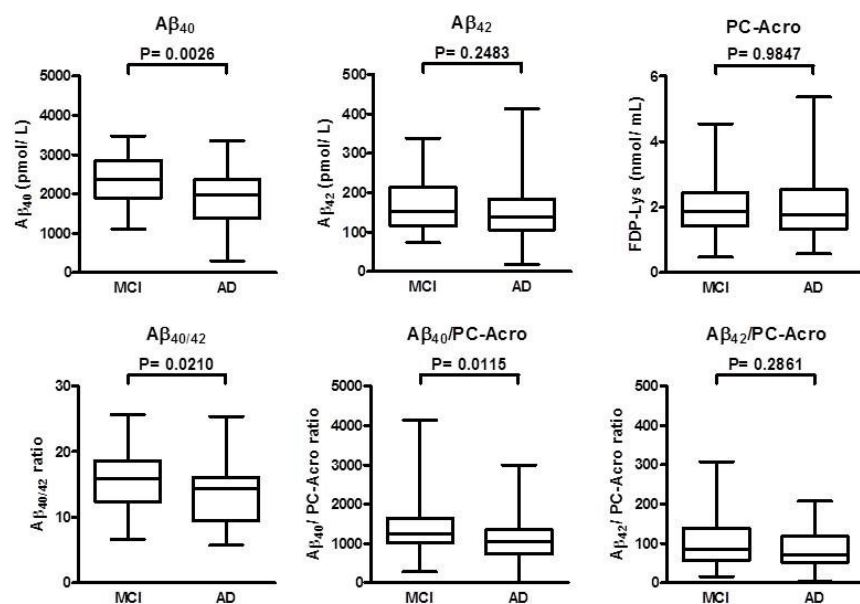


Fig. 3-4 MCI患者群ならびにアルツハイマー病患者群のCSF中バイオマーカー
MCI患者群ならびにアルツハイマー病患者群のCSF中のAβ₄₀、Aβ₄₂、ならびにPC-Acro量を測定し、Aβ_{40/42}比、Aβ₄₀/PC-Acro、Aβ₄₂/PC-Acroを算出した。
*p*値は、Wilcoxonの順位和検定を行い算出した。

MCI 患者群ならびにアルツハイマー病患者群の CSF 検体中タウタンパク質につ
いて

CSF 検体中におけるタウタンパク質ならびにリン酸化タウタンパク質量は、
MCI 患者群ならびにアルツハイマー患者群間の有意な差は認められなかった。

(Table. 3 - 1)

Table. 3-1 MCI患者群ならびにアルツハイマー病患者群のCSF中タウタンパク質

	MCI	AD
n	40	54
Tau (pg/mL)	290.5 ± 115.0	275.1 ± 148.4^{ns}
Phosphorylated Tau (pg/mL)	66.4 ± 22.0	60.5 ± 24.8^{ns}
Phosphorylated Tau/Tau ratio	0.23 ± 0.05	0.22 ± 0.06^{ns}

MCI患者群ならびにアルツハイマー病患者群のCSF検体中の総タウタンパク質量、リン酸化タウタンパク質量、リン酸化タウタンパク質/総タウタンパク質の比を示している。
p値は、Wilcoxonの順位和検定を用いて算出した。

ns : $p \geq 0.05$

CSF 中 $A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{42}$ 、PC - Acro、 $A\beta_{40/42}$ 、 $A\beta_{40}/PC - Acro$ ならびに $A\beta_{42}/PC - Acro$ と萎縮度ならびに認知機能の相関

CSF 中の $A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{42}$ 、PC - Acro、 $A\beta_{40/42}$ 、 $A\beta_{40}/PC - Acro$ ならびに $A\beta_{42}/PC - Acro$ と脳萎縮度を示す Z - Score と認知機能検査の MMSE との相関性を検討した。

Z - Score と CSF 中の $A\beta_{42}$ 、PC - Acro、ならびに $A\beta_{40/42}$ 比との間には、相関が認められなかったが、 $A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{40}/PC - Acro$ 、 $A\beta_{42}/PC - Acro$ は、Z - Score の増加に伴い低下することが認められた。各々の P 値は $A\beta_{40}$ ($p=0.018$)、 $A\beta_{40}/PC - Acro$ ($p=0.011$)、 $A\beta_{42}/PC - Acro$ ($p=0.027$) であった。(Fig.3 - 5)

また、MMSE と CSF 中の PC - Acro、 $A\beta_{40/42}$ については相関が認められなかったが、 $A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{42}$ 、 $A\beta_{40}/PC - Acro$ 、 $A\beta_{42}/PC - Acro$ は、MMSE の低下に伴い、低下することが明らかとなり、相関が認められた。

各々の p 値は $A\beta_{40}$ ($p < 0.001$)、 $A\beta_{42}$ ($p < 0.001$)、 $A\beta_{40}/PC - Acro$ ($p = 0.013$)、 $A\beta_{42}/PC - Acro$ ($p = 0.001$) であった。(Fig.3 - 5)

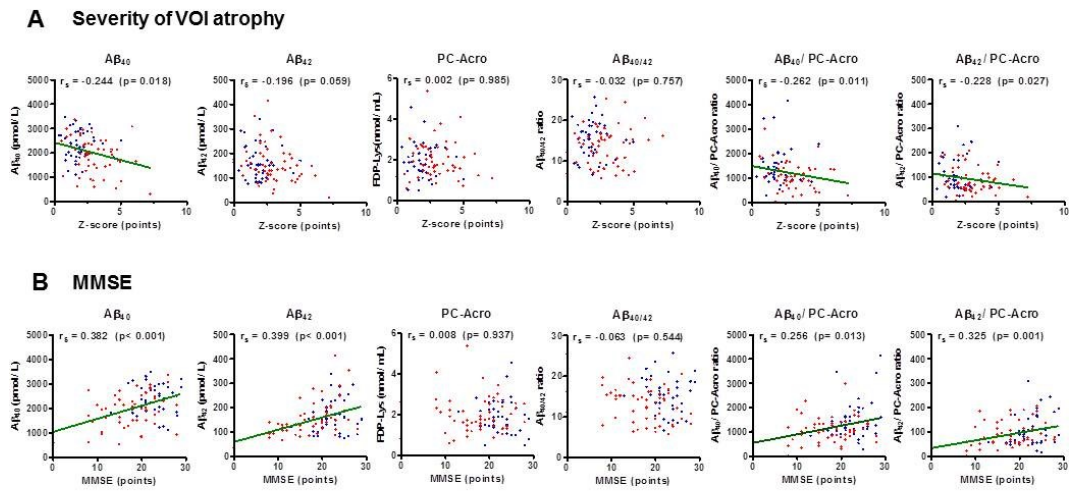


Fig. 3-5 CSF中バイオマーカーと脳萎縮度および認知機能障害の相関

MCI患者群ならびにアルツハイマー病患者群のCSF中 $A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{42}$ 、ならびにPC-Acro量を測定し、 $A\beta_{40/42}$ 比、 $A\beta_{40}/PC-Acro$ 、 $A\beta_{42}/PC-Acro$ を算出し、脳萎縮度および認知機能障害との相関を評価した。

図中の青い点は(●) MCI患者を示し、赤い点(●)は、アルツハイマー病患者を示している。 p 値は、Wilcoxonの順位和検定を行い算出した。

これらのことから、認知機能障害の患者のCSF中の $A\beta_{42}/PC - Acro$ 、 $A\beta_{40}/PC - Acro$ 値は、脳萎縮度ならびに認知機能障害のバイオマーカーとなり得ることが明らかとなった。

【考察】

認知機能障害において血漿中の $A\beta_{40/42}$ 比ならびに PC - Acro が有用な指標となり得る可能性を本論文第二章で述べた。また、アルツハイマー病においては、CSF 中の $A\beta_{42}$ の低下ならびに、総タウタンパク質、リン酸化タウタンパク質が増加することが知られ、これらはアルツハイマー病のバイオマーカーとし注目されている⁶¹⁻⁶⁵⁾。

しかしながら、認知機能障害のうち MCI ならびにアルツハイマー病の CSF 中の $A\beta_{42}$ の低下ならびに、総タウタンパク質、リン酸化タウタンパク質の増加から両者が識別できるかについては検討されていなかった。

第二章で述べた、血漿中の PC - Acro、 $A\beta_{40/42}$ 比 では MCI 患者群ならびにアルツハイマー病患者群の識別ができなかった。本章では、MCI 患者群ならびにアルツハイマー病患者群の識別をするため、CSF 検体を対象検体とし、MCI 患者ならびにアルツハイマー病患者の方々、ご家族の協力を得て、有用なバイオマーカーを検討した。

CSF 中の $A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{40}/PC - Acro$ 、 $A\beta_{40/42}$ について、54名の MCI 患者群では 40名のアルツハイマー病患者群に比べ有意に高値であった。 $A\beta_{40}$ は $A\beta_{42}$ に比較し、脳組織中また CSF 中においても存在量が多い。

また、CSF 中の $A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{40}/PC - Acro$ 、 $A\beta_{40/42}$ と脳萎縮度を示す Z - Score と認知機能検査の MMSE との相関性を検討した。その結果、Z - Score の増加に伴い、 $A\beta_{40}/PC - Acro$ 、 $A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{42}/PC - Acro$ が低下する結果が得られ、相関も認められた。さらに MMSE の低下に伴い $A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{42}$ 、 $A\beta_{40}/PC - Acro$ 、 $A\beta_{42}/PC - Acro$ の値も低下することが明らかとなり、脳機能障害においてもこれらバイオマーカーは、相関性があることが確認された。また、特に $A\beta_{42}$ は、MMSE との相関が認められ、認知機能障害の指標となることが推察された⁶⁸⁾。

また、前章で示した血漿検体において、認知機能障害との相関が明らかとなっている PC - Acro と $A\beta_{42}$ の値より、 $A\beta_{42}/PC - Acro$ を算出することで、MMSE のみならず Z - Score とも相関することが明らかとなった。

一方、CSF 中のタウタンパク質、ならびにリン酸化タウタンパク質量は、MCI 患者群ならびアルツハイマー病患者群の CSF 中の両タンパク質量は、健常者群に比べ高値を示していた。一方、アルツハイマー患者群では MCI 患者に比較し、減少傾向がみられた。

また、 $A\beta_{42}$ は $A\beta_{40}$ よりも強い毒性を示すことから^{70,71)}、アルツハイマー患者の CSF 中において $A\beta_{42}$ の低下が注目されている⁶¹⁻⁶⁵⁾。しかしながら、本研究の結果より、認知機能障害の指標として、CSF 中の $A\beta_{40}$ 、PC - Acro を測定することが重要であり、特に MCI およびアルツハイマー病を識別する指標として CSF 中の $A\beta_{40}$ 測定の重要性が明らかとなった⁶⁹⁾。

MCI 患者群ならびアルツハイマー病患者群の CSF 中の $A\beta_{42}$ 、PC - Acro は、各々単独では、両群の差は認められなかったが、 $A\beta_{42}/PC - Acro$ は、認知機能障害と脳の萎縮度との相関が認められた。このことから、認知機能障害を経過観察してゆく中で、 $A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{40}/PC - Acro$ ならびに $A\beta_{42}/PC - Acro$ を定期的に測定し注視することが重要であると示唆された⁶⁹⁾。

これらのことから、アルツハイマー病診断に使用される fluorodeoxyglucose (FDG) - positron emission tomography (PET) ならびに amyloid PET^{33,34)} などの高価な画像診断に比べ、PC - Acro と $A\beta_{40}$ ならびに $A\beta_{42}/PC - Acro$ を合わせて測定することが、画像診断よりも安価に、画像装置の導入を待たずに多くの医療施設で受けることが可能な検査となる可能性が示唆された。

【総括】

本研究において、ポリアミンより生成されるアクロレインならびにその代謝物が、脳疾患における脳細胞傷害のバイオマーカーとなり得るかどうかについて、脳卒中患者、大脳白質病変患者、軽度認知機能障害患者、アルツハイマー病患者、健常者を対象とした臨床研究を行い検討した。また、アルツハイマー病との関連が注目されているアミロイドベータ 40、アミロイドベータ 42 についても合わせて検討した。

第一章においては、アクロレインがグルタチオン抱合を受けることにより代謝される 3 - ヒドロキシメルカプツール酸の尿中排泄量について、脳卒中の患者 78 名ならびに健常者 90 名を対象とした臨床研究を行った。その結果、脳梗塞時に血漿中で増加することが知られているタンパク質結合型アクロレイン量の動向とは異なり、脳卒中患者群の尿中 3 - ヒドロキシメルカプツール酸量は、健常者群と比較し有意に低下することが明らかとなった。脳卒中患者群の脳梗塞患者群ならびに脳出血患者群の両群ともに観察された。また、尿中 3 - ヒドロキシメルカプツール酸量は、脳梗塞単ならびに脳出血の病巣のサイズの大きさならびに、脳卒中重症度スケールの重症度が高い方がより低下することが明らかとなり、病巣の大きさならびに脳卒中重症度との相関性が明らかとなり指標となりうる可能性が示唆された。

第二章においては、認知機能障害と血漿中タンパク質結合型アクロレイン量、アミロイドベータ 40 ならびにアミロイドベータ 42 の相関を評価した。臨床研究は認知機能障害を有する群 120 名（アルツハイマー病患者 70 名＋軽度認知症患者 50 名）、認知機能障害のない群 101 名（健常者 33 名＋大脳白質病を有する患者 68 名）の協力を得て行った。血漿中タンパク質結合型アクロレイン量とアミロイドベータ 40/42 比は、認知機能障害を有する群では認知機能障害のない群に

比較し、有意に高値を示すことが明らかとなった。このことから、血漿中タンパク質結合型アクロレイン量とアミロイドベータ 40/42 比が認知機能障害の指標となる可能性が示唆された。さらに、脳卒中の危険因子である大脳白質病変について血漿中タンパク質結合型アクロレイン量とアミロイドベータ 40、アミロイドベータ 42 の脳卒中の危険因子である大脳白質病変の Grade と血漿中タンパク質結合型アクロレイン量、ならびにタンパク質結合型アクロレイン/アミロイドベータ 40/42 比またはタンパク質結合型アクロレイン/アミロイドベータ 40/42 比と年齢より求めた相対リスク値が相関を示したことから、大脳白質病変を早期に発見できる可能性が示唆された。

第三章においては、認知機能障害と脳脊髄液中タンパク質結合型アクロレイン量、アミロイドベータ 40 ならびにアミロイドベータ 42 の相関を評価した。本臨床研究は、軽度認知症患者 40 名、アルツハイマー病患者 54 名の協力を得て遂行した。また、アクロレインのアルツハイマー病との関与を検討するため、アルツハイマー病患者の脳組織内を用い検討した。アルツハイマー病患者の脳組織において、疾患対照患者（脳卒中患者、心不全患者）の脳組織に比べアクロレインの蓄積が多いことが確認されたことから、アルツハイマー病へのアクロレインの関与が示唆された。

また、脳脊髄液を対象検体とし、タンパク質結合型アクロレイン量、アミロイドベータ 40 ならびにアミロイドベータ 42 の測定により軽度認知症患者とアルツハイマー病患者の識別をめざして検討を行った。その結果脳脊髄液中のアミロイドベータ 40、アミロイドベータ 40/アミロイドベータ 42 比、アミロイドベータ 40/PC - Acro 比の値が、アルツハイマー病患者群において軽度認知症患者群に比較して有意に低下していた。さらに、画像診断による脳萎縮度を示す Z-score とアミロイドベータ 40、アミロイドベータ 40/PC - Acro 比、アミロイドベータ

42/PC - Acro 比に有意な相関が認められた。また、認知機能の指標である MMSE とアミロイドベータ 40、アミロイドベータ 42、アミロイドベータ 40/PC - Acro 比、アミロイドベータ 42/PC - Acro 比は有意な相関を示した。

以上の結果から、ポリアミンに由来するアクロレインおよびその代謝物である 3 - ヒドロキシメルカプトツール酸が、脳卒中、大脳白質病変、認知機能障害における脳細胞傷害のバイオマーカーとなりうることが示唆された。さらに、認知機能障害においては脳脊髄液中アミロイドベータ 40、アミロイドベータ 42 とタンパク結合型アクロレインを合わせて測定することにより、認知機能低下の原因疾患診断の一助になる可能性が示唆された。

【参考文献】

- 1) 下方 浩史、我が国の疫学統計. 日本臨床 増刊号 痴呆症学 3. 2004; **62**: 121-125
- 2) Yoshida M, Tomitori H, Machi Y, Katagiri D, Ueda S, Horiguchi K, Kobayashi E, Saeki N, Nishimura K, Ishii I, Kashiwagi K, Igarashi K. "Acrolein, IL-6 and CRP as markers of silent brain infarction." *Atherosclerosis*. 2009 Apr; **203**(2):557-62.
- 3) Cohen S.S., "A Guide to the Polyamines," *Oxford University Press*, 1998.
- 4) Tabor CW, Tabor H. "Polyamines." *Annu Rev Biochem*. 1984; **53**:749-90.
- 5) Igarashi K., Kashiwagi K. "Polyamines: mysterious modulators of cellular functions." *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 May 19; **271**(3):559-64.
- 6) Igarashi K., Kashiwagi K. "Polyamine Modulon in Escherichia coli: genes involved in the stimulation of cell growth by polyamines." *J Biochem*. 2006 Jan; **139**(1):11-6.
- 7) Igarashi K., "Polyamines: Mysterious Modulators of Cellular Functions" (in Japanese), 1993.Kyoritsu Syuppan, Tokyo.
- 8) Igarashi K., Kashiwagi K., Kagakuto Seibutsu, 1997, **35**, 442-450.
- 9) Williams K., Zappia AM., Pritchett DB., Shen YM., Molinoff PB. "Sensitivity of the N-methyl-D-aspartate receptor to polyamines is controlled by NR2 subunits." *Mol Pharmacol*. 1994. May; **45**(5):803-9.
- 10) Wang Y., Devereux W, Woster PM, Stewart TM, Hacker A, Casero RA Jr. "Cloning and characterization of a human polyamine oxidase that is inducible by polyamine analogue exposure." *Cancer Res*. 2001 Jul 15; **61**(14):5370-3.
- 11) Wu T., Yankovskaya V., McIntire WS. "Cloning, sequencing, and heterologous

- expression of the murine peroxisomal flavoprotein, N1-acetylated polyamine oxidase." *J Biol Chem.* 2003 Jun 6; **278**(23):20514-25.
- 12) Sharmin S., Sakata K., Kashiwagi K., Ueda S., Iwasaki S., Shirahata A., Igarashi K. "Polyamine cytotoxicity in the presence of bovine serum amine oxidase." *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Mar **23**; 282(1):228-35.
 - 13) Tabor CW, Tabor H., Bachrach U. "Identification of the aminoaldehydes produced by the oxidation of spermine and spermidine with purified plasma amine oxidase." *J Biol Chem.* 1964 Jul; **239**:2194-203.
 - 14) Kimes BW., Morris DR. "Preparation and stability of oxidized polyamines." *Biochim Biophys Acta.* 1971 Jan 1; **228**(1):223-34.
 - 15) Saiki R., Park H., Ishii I., Yoshida M., Nishimura K., Toida T., Tatsukawa H., Kojima S., Ikeguchi Y., Pegg AE., Kashiwagi K., Igarashi K. "Brain infarction correlates more closely with acrolein than with reactive oxygen species." *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Jan **28**; 404(4):1044-9.
 - 16) Fridovich I. "The biology of oxygen radicals." *Science.* 1978 Sep 8; **201**(4359):875-80.
 - 17) Beard ME., Baker R., Conomos P., Pugatch D., Holtzman E. "Oxidation of oxalate and polyamines by rat peroxisomes." *J Histochem Cytochem.* 1985 May; **33**(5):460-4.
 - 18) Averill-Bates DA., Agostinelli E., Przybytkowski E., Mondovi B., "Aldehyde dehydrogenase and cytotoxicity of purified bovine serum amine oxidase and spermine in Chinese hamster ovary cells." *Biochem Cell Biol.* 1994 Jan-Feb; **72**(1-2):36-42.
 - 19) Pompella A., Visvikis A., Paolicchi A., De Tata V., Casini AF. "The changing

- faces of glutathione, a cellular protagonist." *Biochem Pharmacol.* 2003 Oct **15**; 66(8):1499-503.
- 20) Campbell RA., Talwalkar Y., Bartos D., Bartos F., Musgrave J., Harner M., Puri H., Grettie D., Dolney AM., Loggan B., "Polyamines, uremia and hemodialysis, in : Campbell, R.A., Morris D.R., Bartos, D., Daves G.D. Jr.(Eds.), *Advances in Polyamine Research*, vol.2, " Raven Press, New York, 1978; pp319-343.
- 21) Sakata K., Kashiwagi K., Sharmin S., Ueda S., Irie Y., Murotani N., Igarashi K. "Increase in putrescine, amine oxidase, and acrolein in plasma of renal failure patients." *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 May 23; **305**(1):143-9.
- 22) Ivanova S., Botchkina GI., Al-Abed Y., Meistrell M. 3rd, Batliwalla F., Dubinsky JM., Iadecola C., Wang H., Gregersen PK., Eaton JW., Tracey KJ. "Cerebral ischemia enhances polyamine oxidation: identification of enzymatically formed 3-aminopropanal as an endogenous mediator of neuronal and glial cell death. " *J Exp Med.* 1998 Jul 20; **188**(2):327-40.
- 23) Ivanova S., Batliwalla F., Mocco J., Kiss S., Huang J., Mack W., Coon A., Eaton JW., Al-Abed Y., Gregersen PK., Shohami E., Connolly ES Jr, Tracey KJ. "Neuroprotection in cerebral ischemia by neutralization of 3-aminopropanal." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Apr 16; **99**(8):5579-84.
- 24) Tomitori H., Usui T., Saeki N., Ueda S., Kase H., Nishimura K., Kashiwagi K., Igarashi K., "Polyamine oxidase and acrolein as novel biochemical markers for diagnosis of cerebral stroke." *Stroke.* 2005 Dec; **36**(12):2609-13.
- 25) O'Leary DH., Polak JF., Kronmal RA., Manolio TA., Burke GL., Wolfson SK Jr. "Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial

- infarction and stroke in older adults. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group." *N Engl J Med*. 1999 Jan 7; **340**(1):14-22.
- 26) Inoue K., Matsumoto M., Shono T., Toyokawa S., Moriki A. "Increased intima media thickness and atherosclerotic plaques in the carotid artery as risk factors for silent brain infarcts." *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2007 Jan-Feb; **16**(1):14-20.
- 27) Yoshida M., Higashi K., Kobayashi E., Saeki N., Wakui K., Kusaka T., Takizawa H., Kashiwado K., Suzuki N., Fukuda K., Nakamura T., Watanabe S., Tada K., Machi Y., Mizoi M., Toida T., Kanzaki T., Tomitori H., Kashiwagi K., Igarashi K. "Correlation between images of silent brain infarction, carotid atherosclerosis and white matter hyperintensity, and plasma levels of acrolein, IL-6 and CRP." *Atherosclerosis*. 2010 Aug; **211**(2):475-9.
- 28) Higashi K., Yoshida M., Igarashi A., Ito K., Wada Y., Murakami S., Kobayashi D., Nakano M., Sohda M., Nakajima T., Narita I., Toida T., Kashiwagi K., Igarashi K. "Intense correlation between protein-conjugated acrolein and primary Sjögren's syndrome." *Clin Chim Acta*. 2010 Mar; **411**(5-6):359-63.
- 29) Saiki R., Nishimura K., Ishii I., Omura T., Okuyama S., Kashiwagi K., Igarashi K. "Intense correlation between brain infarction and protein-conjugated acrolein." *Stroke*. 2009 Oct; **40**(10):3356-61.
- 30) Eckert E, Drexler H, Göen T. "Determination of six hydroxyalkyl mercapturic acids in human urine using hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry (HILIC-ESI-MS/MS)." *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2010 Oct 1; **878**(27):2506-14.
- 31) Brott T., Adams HP Jr, Olinger CP., Marler JR., Barsan WG., Biller J.,

- Spilker J., Holleran R., Eberle R., Hertzberg V., et al. "Measurements of acute cerebral infarction: a clinical examination scale." *Stroke*. 1989 Jul; **20**(7):864-70.
- 32) Yoshida M, Mikami T, Higashi K, Saiki R, Mizoi M, Fukuda K, Nakamura T, Ishii I, Nishimura K, Toida T, Tomitori H, Kashiwagi K, Igarashi K. "Inverse correlation between stroke and urinary 3-hydroxypropyl mercapturic acid, an acrolein-glutathione metabolite." *Clin Chim Acta*. 2012 **413**:753-759
- 33) Shimizu H, Kiyohara Y, Kato I, Kitazono T, Tanizaki Y, Kubo M, Ueno H, Ibayashi S, Fujishima M, Iida M. "Relationship between plasma glutathione levels and cardiovascular disease in a defined population: the Hisayama study." *Stroke*. 2004 Sep; **35**(9):2072-7.
- 34) Khan M, Sekhon B, Jatana M, Giri S, Gilg AG, Sekhon C, Singh I, Singh AK. "Administration of N-acetylcysteine after focal cerebral ischemia protects brain and reduces inflammation in a rat model of experimental stroke." *J Neurosci Res*. 2004 May 15; **76**(4):519-27.
- 35) Blennow K., de Leon MJ, Zetterberg H. "Alzheimer's disease." *Lancet*. 2006 Jul 29; **368**(9533):387-403.
- 36) Drachman DA. "Aging of the brain, entropy, and Alzheimer disease." *Neurology*. 2006 Oct 24; **67**(8):1340-52.
- 37) Nordberg A., Rinne JO, Kadir A., Långström B. "The use of PET in Alzheimer disease." *Nat Rev Neurol*. 2010 Feb; **6**(2):78-87.
- 38) Risacher SL, Shen L., West JD, Kim S., McDonald BC, Beckett LA, Harvey DJ, Jack CR Jr, Weiner MW, Saykin AJ; Alzheimer's Disease Neuroimaging

- Initiative (ADNI). “Longitudinal MRI atrophy biomarkers: relationship to conversion in the ADNI cohort.” *Neurobiol Aging*. 2010 Aug; **31**(8):1401-18.
- 39) Fukumoto H., Tennis M., Locascio JJ, Hyman BT, Growdon JH, Irizarry MC. “Age but not diagnosis is the main predictor of plasma amyloid beta-protein levels.” *Arch Neurol*. 2003 Jul; **60**(7):958-64.
- 40) Sobów T., Flirski M., Kłoszewska I., Liberski PP. “Plasma levels of Ab peptides are altered in amnesic mild cognitive impairment but not in sporadic Alzheimer's disease.” *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2005; **65**(2):117-24.
- 41) Roher AE, Esh CL, Kokjohn TA, Castaño EM, Van Vickle GD, Kalback WM, Patton RL, Luehrs DC, Dausg ID, Kuo YM, Emmerling MR, Soares H, Quinn JF, Kaye J, Connor DJ, Silverberg NB, Adler CH, Seward JD, Beach TG, Sabbagh MN. “Amyloid beta peptides in human plasma and tissues and their significance for Alzheimer's disease.” *Alzheimers Dement*. 2009 Jan; **5**(1):18-29.
- 42) Le Bastard N., Leurs J., Blomme W., De Deyn PP, Engelborghs S. “Plasma amyloid-beta forms in Alzheimer's disease and non-Alzheimer's disease patients.” *J Alzheimers Dis*. 2010; **21**(1):291-301.
- 43) Mehta PD., Pirttilä T., Mehta SP, Sersen EA, Aisen PS, Wisniewski HM. “Plasma and cerebrospinal fluid levels of amyloid beta proteins 1-40 and 1-42 in Alzheimer disease.” *Arch Neurol*. 2000 Jan; **57**(1):100-5.
- 44) Graff-Radford NR, Crook JE, Lucas J., Boeve BF, Knopman DS, Ivnik RJ, Smith GE, Younkin LH, Petersen RC, Younkin SG. “Association of low plasma Abeta42/Abeta40 ratios with increased imminent risk for mild cognitive impairment and Alzheimer disease.” *Arch Neurol*. 2007 Mar; **64**(3):354-62.

Erratum in: *Arch Neurol.* 2007 Sep; **64**(9):1246.

- 45) Lui JK, Laws SM, Li QX, Villemagne VL, Ames D., Brown B., Bush AI, De Ruyck K., Dromei J., Ellis KA, Faux NG, Foster J., Fowler C., Gupta V., Hudson P., Laughton K., Masters CL, Pertile K., Rembach A., Rimajova M., Rodrigues M., Rowe CC, Rumble R., Szoeki C., Taddei K., Taddei T., Trounson B., Ward V., Martins RN, AIBL Research Group. "Plasma amyloid-beta as a biomarker in Alzheimer's disease: the AIBL study of aging." *J Alzheimers Dis.* 2010; **20**(4):1233-42.
- 46) Yaffe K., Weston A., Graff-Radford NR, Satterfield S., Simonsick EM, Younkin SG, Younkin LH, Kuller L., Ayonayon HN, Ding J., Harris TB. "Association of plasma beta-amyloid level and cognitive reserve with subsequent cognitive decline." *JAMA.* 2011 Jan 19; **305**(3):261-6.
- 47) Devanand DP, Schupf N., Stern Y., Parsey R., Pelton GH, Mehta P., Mayeux R. "Plasma A β and PET PiB binding are inversely related in mild cognitive impairment." *Neurology.* 2011 Jul 12; **77**(2):125-31.
- 48) Calingasan NY, Uchida K., Gibson GE. "Protein-bound acrolein: a novel marker of oxidative stress in Alzheimer's disease." *J Neurochem.* 1999 Feb; **72**(2):751-6.
- 49) Bradley MA, Markesbery WR, Lovell MA. "Increased levels of 4-hydroxynonenal and acrolein in the brain in preclinical Alzheimer disease." *Free Radic Biol Med.* 2010 Jun 15; **48**(12):1570-6.
- 50) Singh M., Dang TN, Arseneault M., Ramassamy C. "Role of by-products of lipid oxidation in Alzheimer's disease brain: a focus on acrolein." *J Alzheimers Dis.* 2010; **21**(3):741-56.

- 51) Dang TN, Arseneault M., Murthy V., Ramassamy C. "Potential role of acrolein in neurodegeneration and in Alzheimer's disease." *Curr Mol Pharmacol.* 2010 Jun; **3**(2):66-78.
- 52) Waragai M, Okamura N, Furukawa K, Tashiro M, Furumoto S, Funaki Y, Kato M, Iwata R, Yanai K, Kudo Y, Arai H. "Comparison study of amyloid PET and voxel-based morphometry analysis in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease." *J Neurol Sci.* 2009 Oct 15; **285**(1-2):100-8.
- 53) McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. "Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease." *Neurology.* 1984 Jul; **34**(7):939-44.
- 54) Petersen RC1, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E. "Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome." *Arch Neurol.* 1999 Mar; **56**(3):303-8.
- 55) Igarashi K, Ueda S, Yoshida K, Kashiwagi K. "Polyamines in renal failure." *Amino Acids.* 2006 Nov; **31**(4):477-83.
- 56) Igarashi K, Kashiwagi K. "Protein-conjugated acrolein as a biochemical marker of brain infarction." *Mol Nutr Food Res.* 2011 Sep; **55**(9):1332-41.
- 57) Shinohara Y, Tohgi H, Hirai S, Terashi A, Fukuuchi Y, Yamaguchi T, Okudera T. "Effect of the Ca antagonist nilvadipine on stroke occurrence or recurrence and extension of asymptomatic cerebral infarction in hypertensive patients with or without history of stroke (PICA Study)." 1. Design and results at enrollment. *Cerebrovasc Dis.* 2007; **24**(2-3):202-9.

- 58) Uchida K, Kanematsu M, Morimitsu Y, Osawa T, Noguchi N, Niki E. "Acrolein is a product of lipid peroxidation reaction. Formation of free acrolein and its conjugate with lysine residues in oxidized low density lipoproteins." *J Biol Chem*. 1998 Jun 26; **273**(26):16058-66.
- 59) Ellenius J, Groth T, Lindahl B, Wallentin L. "Early assessment of patients with suspected acute myocardial infarction by biochemical monitoring and neural network analysis." *Clin Chem*. 1997 Oct; **43**(10):1919-25.
- 60) Waragai M, Yoshida M, Mizoi M, Saiki R, Kashiwagi K, Takagi K, Arai H, Tashiro J, Hashimoto M, Iwai N, Uemura K, Igarashi K. "Increase protein-conjugated acrolein and amyloid- $\beta_{40/42}$ ratio in plasma of patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease." *J Alzheimer's Dis*. 2012 **32**:33-41
- 61) Schoonenboom NS, van der Flier WM, Blankenstein MA, Bouwman FH, Van Kamp GJ, Barkhof F, Scheltens P. "CSF and MRI markers independently contribute to the diagnosis of Alzheimer's disease." *Neurobiol Aging*. 2008 May; **29**(5):669-75.
- 62) Fagan AM, Head D, Shah AR, Marcus D, Mintun M, Morris JC, Holtzman DM. "Decreased cerebrospinal fluid A β_{42} correlates with brain atrophy in cognitively normal elderly." *Ann Neurol*. 2009 Feb; **65**(2):176-83.
- 63) Tapiola T, Alafuzoff I, Herukka SK, Parkkinen L, Hartikainen P, Soininen H, Pirttilä T. "Cerebrospinal fluid {beta}-amyloid 42 and tau proteins as biomarkers of Alzheimer-type pathologic changes in the brain." *Arch Neurol*. 2009 Mar; **66**(3):382-9.
- 64) de Souza LC, Chupin M, Lamari F, Jardel C, Leclercq D, Colliot O,

- Lehéricy S, Dubois B, Sarazin M. "CSF tau markers are correlated with hippocampal volume in Alzheimer's disease." *Neurobiol Aging*. 2012 Jul; **33**(7):1253-7.
- 65) Kang JH, Korecka M, Toledo JB, Trojanowski JQ, Shaw LM. "Clinical utility and analytical challenges in measurement of cerebrospinal fluid amyloid- β (1-42) and τ proteins as Alzheimer disease biomarkers." *Clin Chem*. 2013 Jun; **59**(6):903-16.
- 66) Gao S, Hendrie HC, Hall KS, Hui S. "The relationships between age, sex, and the incidence of dementia and Alzheimer disease: a meta-analysis." *Arch Gen Psychiatry*. 1998 Sep; **55**(9):809-15.
- 67) Tomitori H, Nakamura M, Sakamoto A, Terui Y, Yoshida M, Igarashi K, Kashiwagi K. "Augmented glutathione synthesis decreases acrolein toxicity." *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Feb 3; **418**(1):110-5.
- 68) Bradford MM. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem*. 1976 May 7; **72**:248-54.
- 69) Mizoi M, Yoshida M, Saiki R, Waragai M, Uemura K, Akatsu H, Kashiwagi K, Igarashi K. "Distinction between mild cognitive impairment and Alzheimer's disease by CSF amyloid β 40 and β 42, and protein-conjugated acrolein.", *Clin Chim Acta*. 2014 **430**:150-155
- 70) Wu B, Kitagawa K, Zhang NY, Liu B, Inagaki C. "Pathophysiological concentrations of amyloid beta proteins directly inhibit rat brain and recombinant human type II phosphatidylinositol 4-kinase activity." *J Neurochem*. 2004 Dec; **91**(5):1164-70.

- 71) Yagyu K, Kitagawa K, Irie T, Wu B, Zeng XT, Hattori N, Inagaki C.
“Amyloid beta proteins inhibit Cl(-)-ATPase activity in cultured rat
hippocampal neurons.” *J Neurochem.* 2001 Aug; **78**(3):569-76.

【論文目録】

本学位論文は下記の発表論文による。

- 1) Yoshida M, Mikami T, Higashi K, Saiki R, Mizoi M, Fukuda K, Nakamura T, Ishii I, Nishimura K, Toida T, Tomitori H, Kashiwagi K, Igarashi K. “Inverse correlation between stroke and urinary 3-hydroxypropyl mercapturic acid, an acrolein-glutathione metabolite.” *Clin Chim Acta*. 413:753-759(2012)
- 2) Waragai M, Yoshida M, Mizoi M, Saiki R, Kashiwagi K, Takagi K, Arai H, Tashiro J, Hashimoto M, Iwai N, Uemura K, Igarashi K. “Increase protein-conjugated acrolein and amyloid- $\beta_{40/42}$ ratio in plasma of patients with mild cognitive impairment and Alzheimer’s disease.” *J Alzheimer’s Dis*. 32:33-41(2012)
- 3) Mizoi M, Yoshida M, Saiki R, Waragai M, Uemura K, Akatsu H, Kashiwagi K, Igarashi K. “Distinction between mild cognitive impairment and Alzheimer’s disease by CSF amyloid β_{40} and β_{42} , and protein-conjugated acrolein.”, *Clin Chim Acta*. 430:150-155(2014)

【謝辞】

本研究を遂行し、学位論文作成にあたりご指導、ご鞭撻いただきました国立大学法人千葉大学大学院薬学研究院 五十嵐名誉教授、日本大学大学院薬学研究院 草間國子教授に心より感謝いたします。

日々、指導、ご助言をいただきました株式会社アミンファーマ研究所 吉田円博士、齋木遼太郎博士、中村瑞穂博士、植村武史博士に深く感謝いたします。

多くのご指導、ご鞭撻をいただきました千葉科学大学薬学部 柏木敬子教授、富取秀行准教授に深謝致します。

本研究遂行にあたり、共同研究していただきました国立大学法人千葉大学大学院薬学研究院 戸井田敏彦教授、東恭平助教、千葉大学病院薬剤部 石井伊都子教授、松戸市立福祉医療センター東松戸病院 藁谷正明医師、植村研一医師、岩井直路医師、松戸市立病院 田代淳医師、長寿医学研究所 赤津裕康医師、柏たなか病院 高木清医師、東北大学加齢医学研究所 荒井啓行医師、千葉中央メディカルセンター 福田和正医師、中村孝雄医師、東京都医学総合研究所 橋本款医師に深く感謝いたします。

最後に私を支えてくださる大きな存在である、大切な多くの皆様へ、心より感謝いたします。