

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 25 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500419

研究課題名（和文）血液浄化法を用いたアルツハイマー治療デバイスのモデル動物による前臨床評価

研究課題名（英文）The pre-clinical evaluation of animal models of Alzheimer's treatment devices using blood purification

研究代表者：川口和紀（KAWAGUCHI KAZUNORI）

藤田保健衛生大学 医療科学部 講師

研究者番号：00508468

研究成果の概要（和文）：

アルツハイマー病の病因物質の一つとされるアミロイド蛋白（ $A\beta$ ）を、末梢血中から短時間に急速に除去することで脳内濃度を下げることにより、認知機能を改善する治療システムの構築を目指し、ラットを用いて血中 $A\beta$ の動態と認知機能に与える影響を検討した。

1. 麻酔下ラットの大槽内に投与したヒト $A\beta$ の末梢血中へ移行が確認された。
2. ラットを用いた血液浄化の実験系および認知機能評価系が確立された。

研究成果の概要（英文）：

We intend to develop the extracorporeal system for Alzheimer's disease by removal of whole blood amyloid beta ($A\beta$) which may reduce brain $A\beta$. In this study, we tried to reveal the effect of improving the recognition by extracorporeal system in rats.

1. In rat model, the synthetic $A\beta$ that injected into the cisternal was detected in rat whole blood.
2. The extracorporeal system for removal $A\beta$ in rats and cognitive evaluation system was established.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：アルツハイマー病、血液浄化、アミロイド β 蛋白

1. 研究開始当初の背景

- (1) アルツハイマー病患者の脳には易凝集性の A β (アミロイド β 蛋白) と呼ばれる蛋白による老人斑が多数見られ、このうち A β モノマーが凝集したオリゴマーが強い神経毒性を有することが明らかになってきた。
- (2) 欧米にて A β に対する抗体投与や A β ワクチン投与の臨床試験を実施したところ、認知症の改善がみられたことと、アルツハイマー病患者の剖検例から老人斑の消失や A β 蓄積量が減少していることが報告された。これらの現象の原因として脳内の A β が末梢血中に移行し脳内 A β 濃度が低下するという「引き抜き仮説」(sink 仮説) が提唱されている。
- (3) 抗体やワクチン以外の非免疫性物質 (GM-1-Ganglioside, gelsolin など) の投与でも脳内 A β の減少がみられたことが報告された。
- (4) 我々は透析患者において、血液透析などの血液浄化療法により血中 A β が除去されることを見出した。またその除去材料として既存の医用材料の中から複数 (セルロース・ビーズなど) を見出し in vitro においても除去能を確認した。

2. 研究の目的

本研究の最終目的

アルツハイマー病の病因物質とされるアミロイド蛋白 (A β) を血液浄化により血中 A β 濃度を短時間に急速に除去することにより、脳内 A β の末梢血中への移行を促進させ認知機能を改善させる治療システムの構築を目指している。(図 1)

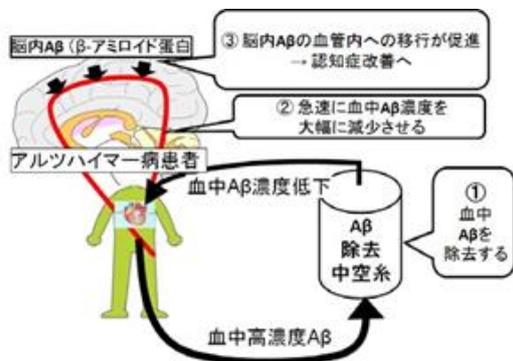


図 1 : 血液浄化によるアルツハイマー病治療システムの概念図

今回の応募では、

- (1) ラットを対象として脳内 A β が血中へ移行する現象を確認する。
- (2) アルツハイマー病モデル動物に対して、

体外循環による血液浄化を施行し血中 A β を除去することによる認知機能の改善を検証する。(図 2)

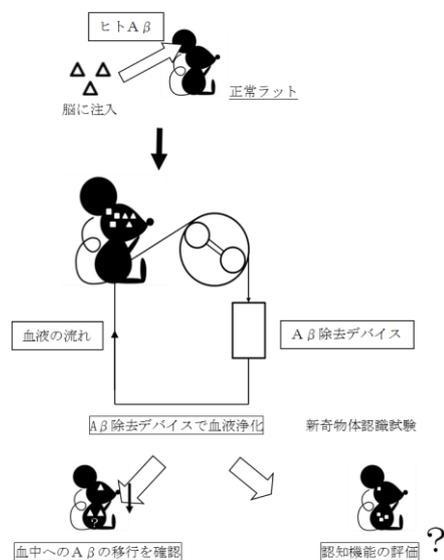


図 2 : 血液浄化による認知機能改善効果に対する実験・概念図

3. 研究の方法

(1) ラットに対する血液浄化技術の確立

① 体外循環回路の設計・製作

7 週齢 Wistar ラット (約 250g) とヒト (60Kg) との体重比から A β 吸着材 (セルロース・ビーズ) 量を約 2ml と設定した。次に、この吸着材を充填するカラム容器を製作した。注射用シリンジ (2.5ml) を用いて後端をあらかじめ切断し、先端部には吸着材が回路内に漏出しないように、シリンジ内径に合わせた不織布を切り取ったものを留置しフィルターとした。その上で吸着材を充填し内筒のゴム部分に I 型パーツを通して封入し、シリコンチューブを接続して A β 吸着材カラムを作成した。

② 血液浄化の条件設定

【麻酔条件】気化式麻酔器を用いてイソフルランを麻酔薬として麻酔を行った。濃度目盛り 3、送気流量 : 0.7L の条件で施行することにより、血液浄化施行中および手術時間全体にわたって安定した吸入麻酔が可能となった。

【ブラッド・アクセス】血液浄化時の脱血側はラット右胸部より縦切開したのち右内頸静脈を選択し、24G カニューラ針で穿刺し外筒を留置した。また返血側として尾静脈にも 26G カニューラ針を同様に穿刺の後、留置した。

③血液浄化施行時の体外循環条件

この血液浄化システムの臨床応用を想定すると、非透析患者のためブラッド・アクセスは静脈(脱血) - 静脈(返血)が妥当であり、その場合の血流速度は50ml/minが上限と考えられた。このためラット対ヒト体重比(1:200)より、ポンプスピードは0.25ml/min(15ml/h)と設定した。抗凝固剤にはヘパリンを用いたがプライミングボリュームを抑えるために、持続投与用回路は設置せずカニューレシオン時に15U/Bodyのbolusでの投与を行うことに加えて、回路内およびカラム内をヘパリン加・生理食塩水にてプライミングしておくことにより血液凝固の少ない安定した血液浄化を行う実験系を確立した。

この条件下で、正常ラットWhistar:♂7週齢(Aβ非投与)に対して血液浄化を施行したところ、セルロース・ビーズは開始後60分の時点でカラム前後では95%以上の除去率を有していた。

(2)ラット脳内へのAβ投与法の確立

(Bolus法)

Aβ溶液投与量は10μlと微量となるため、マイクロシリンジを用いた投与法を検討した。液体クロマトグラフィー用マイクロシリンジ付属の針では針の内径と長さがラットへの穿刺には適さなかったため、専用穿刺針を作成した。24G・注射針をカットダウンした針を加工し、大槽内で穿刺針が止まり脳実質には損傷を与えないように、穿刺針先端より5mmの位置に内径50μmのポリエチレン製チューブを接着・固定した。これをマイクロシリンジ・注入針と接続して専用穿刺針とした。マイクロシリンジ針と穿刺・注射針との間をチューブで接続した構造としたため、穿刺針がある程度フレキシブルに動かせることができ、安定した穿刺が可能となった。投与法は大槽内に穿刺し、髄液の吸引が確認された後にシリンジのみを外し、ヒトAβ溶液の入ったマイクロシリンジに付け替えてAβを注入した。これによりラットへの侵襲を最小限に抑えつつ安定して定量的に大槽内にヒトAβを投与できる方法を確立した。



図3：大槽内投与用穿刺針

(3)認知機能評価法

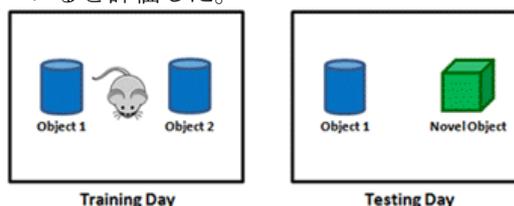
新奇物体認識試験を用いて評価した。

[測定法]数回のハンドリングで評価者に馴化させ、第1日目に測定用フィールドで10分間慣れさせた。(Habitation)

第2日目には、二つのオブジェクトをフィールド内に入れ、それぞれのオブジェクトに対して、直接向かっていき興味を示すなどした接触時間を計測した。(Training)

第3日目には前日のオブジェクトのうち、一方だけを異なるオブジェクトに変更して同様の測定を行った。

[評価法]第2日目でオブジェクトそれぞれに対して興味を示した時間数の比がおおよそ50:50であればTraining成立としRetentionでは、新しいオブジェクトに対して興味を示した時間数比が前日と同じオブジェクトに対して60~70:40~30となればTrainingで用いたオブジェクトを記憶していると評価した。



(4)Aβ測定法

Aβ₁₋₄₀、Aβ₁₋₄₂濃度は、和光純薬製ELISA Kit WAKO IIを用いて測定した。

(5)統計計算

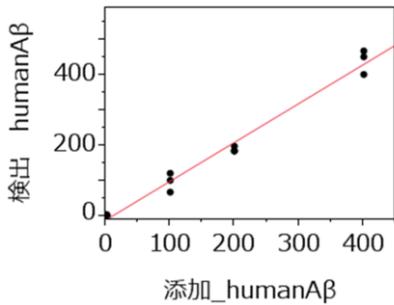
Microsoft Excel 2007、JMP8にて解析を行った。

4. 研究成果

(1).脳から血液中へのヒトAβの移行の確認

①ELISAによるヒトAβの特異的検出

脳内にヒトAβを投与してもラット血中に存在するAβと交差することなく、特異的に高感度ELISA法により定量できることを添加回収試験にて見出した。(図4)

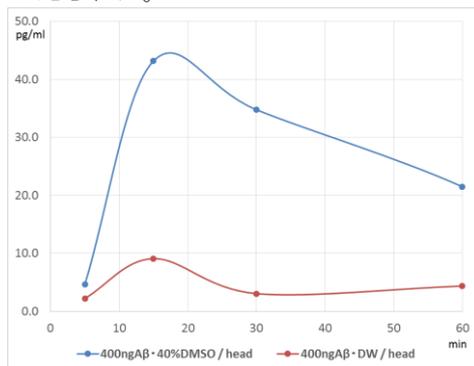


(図4 : Aβ₁₋₄₀添加回収試験(pg/ml))

② 投与Aβ溶液の検討

1. 溶媒の検討

Aβは非常に凝集しやすい性質を持つためにin vitroの実験ではDMSOを溶媒として用いてきたが、DMSOによる脳脊髄関門(blood brain barrier)への影響を懸念し、蒸留水を溶媒とした場合とDMSOを溶媒とした場合とで血中への移行の差を検討した。400ngAβ₁₋₄₂・40%DMSO/PBS/headもしくは400ngAβ₁₋₄₂・DW/headをラット大槽内に投与し、投与後5, 15, 30, 60分後に採血しELISAにてAβ濃度を測定した。(図5) 蒸留水を溶媒とした場合にはほとんど血中濃度の上昇がみられず、脳内で急速にオリゴマー化した可能性なども考えられた。いずれにせよ、血液浄化により血中Aβを急速に除去し、脳内Aβの血中への移行を促進させる実験にはDMSOを溶媒とした方が適すると考えられた。



(図5 : DMSOまたは蒸留水を溶媒としたAβの脳内から血中への移行)

また、DMSOそのものによるBBBへの影響の程度をみるために、ラット内頸静脈へ同濃度のAβ₁₋₄₂・40%DMSO/PBS溶液を投与したところ、投与開始後5分では大槽内投与群に比し約170倍の高濃度を示し、60分後でも4倍程度であったことから、40%DMSOはBBBにある程度影響を及ぼしている可能性は否定できないが、一方で全く機能していないわけではないと考えられた。

(図6)

2. 投与Aβ溶液濃度の検討

脳内投与後の血中Aβ濃度推移

それぞれ0.4, 4, 40, 400ng/headとなるようにそれぞれヒトAβ_{1-40, 1-42}(100μg/ml) DMSO・原液からPBSにて40%に希釈調整し、ラット大槽内にBolusにて10μl注入後、5, 15, 30, 60分後に尾静脈より採血を行い高感度ELISAにより血中Aβ_{1-40, 1-42}濃度を測定した。(図7, 8) 4ng/headのAβ溶液では血中への移行が確認されず、40ng/headで検出されたものの、最大でも3.8pg/ml(投与後30分値)と低かった。それに対して400ng/headでは82.7pg/mlと、脳内投与したAβ₁₋₄₂の血中へのAβ₁₋₄₀と同様に濃度依存性に移行することが確認された。この実験結果より血中に移行してきたAβに対して血液浄化を施行し短時間に急速除去することにより、Aβの脳内から血中への移行を促進させることが目的とした実験に適する条件として、400ng/head程度が必要であることが考察された。また、ラット脳内に投与するAβはより神経毒性の強いとされるAβ₁₋₄₂を選択した。

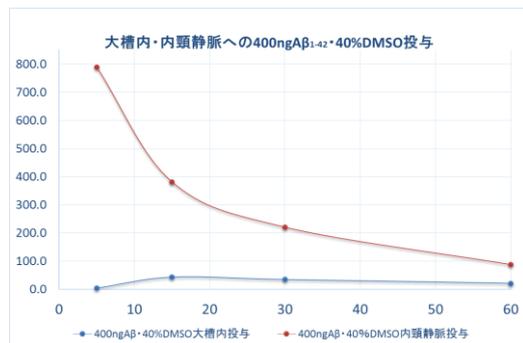


図6 : 大槽内・内頸静脈へのAβ投与による血中濃度の推移

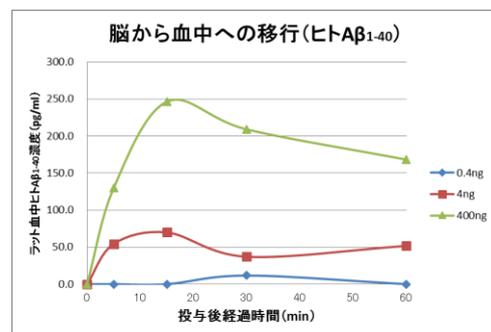


図7 : 脳内から血中への移行 (Aβ₁₋₄₀)

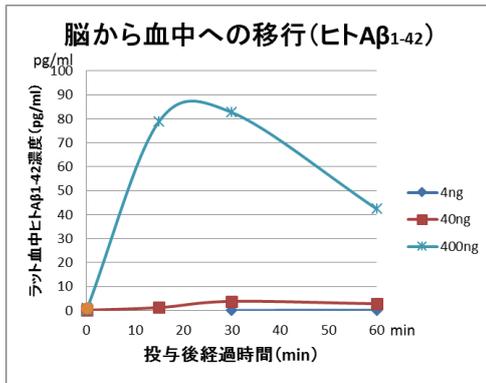


図 8 : 脳内から血中への移行 (Aβ₁₋₄₂)

(2) 血液浄化による認知機能改善効果に対する検討

①浸透圧ポンプによるヒトAβ脳内投与モデルに対する血液浄化と認知機能評価
名城大学にて外科的手術により浸透圧ポンプとカニューレを留置し、ヒトAβ₁₋₄₂・30%アセトニトリル水溶300pmol/L(1.35 μg/day)が持続注入されるように設定した。投与開始後5日目に1時間の血液浄化を行い、翌日にTraining、翌々日にRetentionを行った。対照群についてはAβ₁₋₄₂₋₁(リバース・ペプチド)を用いて同様な実験を行った。また、麻酔と手術侵襲による影響をみるために、浸透圧ポンプの植え込みとAβ注入は同様に施行し、その後の血液浄化開始時の内頸静脈穿刺と皮膚切開(穿刺採血も含む)も行うがAβ除去は行わないSham群についても検討した。この結果、Aβ₁₋₄₂投与群とAβ₁₋₄₂₋₁投与群、Aβ₁₋₄₂投与+血液浄化群とAβ₁₋₄₂投与+Sham群間では差がみられなかった。また、血中Aβ₁₋₄₂濃度は血液浄化開始後30分のピーク値で5pg/ml程度と検出限界に近い低濃度であった。このためAβ₁₋₄₂濃度を1500pmol/L(6.75 μg/day)に増量したが血中濃度はほとんど上昇せず、300pmol/Lを投与した場合よりも低値であった。浸透圧ポンプにより緩徐に脳から血液にAβが移行する場合には、Aβがラット体内の代謝系で速やかに代謝されるために血中濃度は上がりにくいと考えられたため、脳内へのAβの投与法をラット大槽内へのBolus投与に変更した。

②ヒトAβBolus投与モデルに対する血液浄化と認知機能に対する影響

1. 認知機能評価系の移行と確立

浸透圧ポンプによるヒトAβ₁₋₄₂の脳内投与からBolus投与による大槽内投与への、投与方法の変更に伴い、ラットに対する血液浄化および新奇物体認識試験を藤田保

健衛生大学で施行するため、評価系の条件設定のうち馴化期間、ハンドリング回数、試験室の照度などを変更した。この後、正常ラットにて行った新奇物体認識試験の結果、新奇物体に対して興味をもった接触時間が有意に増加していたため、適切な条件設定が確立されたと考えられた。また、脳内に投与されたAβは血中へ移行すると極めて急速に代謝され血中濃度が低下していくことから、habitation施行直後に大槽内へAβ₁₋₄₂を投与し、約15分後に血液浄化を開始し血中Aβの除去を1時間施行するプロトコルに変更した。

2. Aβ・Bolus投与モデルの認知機能障害Aβ₁₋₄₂・40%DMSO/PBS(400ng/head)を大槽内投与した群とPBS投与群とについて新奇物体認識試験を行ったところPBS群に対して有意な認知機能低下を認めた。(p<0.05) また、Bolusによる大槽内投与群に対しては、血液浄化を行った後の認知機能評価まで至らなかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

- ① Masao Katoh, Kazunori Kawaguchi, Sigeru Nakai, Nobuya Kitaguchi, 他12名. Potential therapeutic system for Alzheimer's disease: removal of blood Aβs by hemodialyzers and its effect on the cognitive functions of renal-failure patients. J Neural Transm 査読有、2012;119:1533-1544
- ② Kitaguchi N., Kawaguchi K., Nakai S., 他10名. Reduction of Alzheimer's Disease Amyloid β in plasma by hemodialysis and its relation to cognitive functions. Blood Purification. 査読有、2011;32:57-62
- ③ Kazunori Kawaguchi, Nobuya Kitaguchi, 他6名. Novel therapeutic approach for Alzheimer's Disease by removing amyloid β protein from the brain with Extracorporeal Removal System. J Artifi Organs. 査読有、2010;13:31-37

[学会発表] (計7件)

- ① 川口和紀、中井 滋、北口 暢哉、他7名
中空系による血中アミロイドβ蛋白(Aβ)除去性能の検討 日本医工学治療学会
2012年3月23日 北海道(札幌)
- ② Nobuya Kitaguchi, Sigeru Nakai, Kazunori Kawaguchi, 他7名. Extracorporeal Aβ Removal System (EARS) for Alzheimer's

Disease therapy: Novel Devices with fragments of hollow fibers removed A β effectively both in vitro and in vivo. Alzheimer's Association International Conference (AAIC) 2012年7月14日 Canada

③川口和紀、中井 滋、北口 暢哉、他8名
18ヶ月間の維持血液透析による血中 Amyloid Beta-Protein (A β)、MMSE スコアの経時変化
日本認知症学会 2011年11月11日 東京

④ Nobuya Kitaguchi, Sigeru Nakai, Kazunori Kawaguchi. 他11名. Toward therapeutic system for Alzheimer's Disease by removal of blood A β : Hemodialysis improved the impaired cognitive states of renal failure patients. Alzheimer's Disease(ICAD)2011, 2011年7月15日, Paris

⑤川口和紀、中井 滋、北口 暢哉、他9名
血中アミロイド β 蛋白 (A β) 除去によるアルツハイマー病治療システムの構築に向けて～A β 吸着材の吸着特性 日本医工学治療学会、2011年4月22日 岡山

⑥Nobuya Kitaguchi, Kazunori Kawaguchi. 他9名. Therapeutic system for Alzheimer's Disease by blood purification with Extra-Corporeal A β Removal System(EARS): Reduction of plasma A β by hemodialysis, International conference on Alzheimer's Disease(ICAD)2010, 2010年7月13日, Hawaii

⑦川口和紀、北口暢哉、他8名、血液浄化によるアルツハイマー病治療システムの構築に向けて～吸着剤による Amyloid Beta 蛋白 (A β) 除去の検討、日本医工学治療学会、2010年4月3日 東京

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

①名称：中空糸材料を用いた血中 A β 除去システム
発明者：北口暢哉 川口和紀
権利者：学校法人藤田学園、旭化成株式会社
種類：特許
番号：US provisional Application No61/344,376;
出願年月日：2011年7月8日
国内外の別：国外

○取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川口 和紀 (KAZUNORI KAWAGUCHI)
藤田保健衛生大学・医療科学部・講師
研究者番号：00508468

(2) 研究分担者

北口 暢哉 (NOBUYA KITAGUCHI)
藤田保健衛生大学・医療科学部・教授
研究者番号：70508077

中井 滋 (SIGERU NAKAI)

藤田保健衛生大学・医療科学部・教授
研究者番号：20345896

(3) 連携研究者

宮川 剛 (TSUYOSHI MIYAKAWA)
藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・教授
研究者番号：10301780

大橋 篤 (ATSUSHI OHASHI)

藤田保健衛生大学・医療科学部・准教授
研究者番号：30310585

堀 秀生 (HIDEO HORI)

藤田保健衛生大学・医療科学部・助教
研究者番号：00342113

(4) 主な研究協力者 FD

長尾 静子 (SHIZUKO NAGAO)
藤田保健衛生大学・疾患モデル教育センター
准教授
研究者番号：20183527

間宮 隆吉 (TAKAYOSHI MAMIYA)

名城大学・薬学部・薬品作用学教室
講師
研究者番号：70340297

伊東 亜紀雄 (AKIO ITOH)

名城大学・薬学部・医薬品情報学研究室・准教授

鍋島 俊隆 (TOSHITAKA NABESHIMA)

名城大学・薬学部 地域医療薬局学講座・教授
研究者番号：70076751