

認知症髄液マーカーの非侵襲的な採取： 髄液と鼻粘膜下の交通の利用

[1] 組織

代表者：橋本 康弘
(福島県立医科大学医学部生化学講座)
対応者：荒井 啓行
(東北大学加齢医学研究所)
分担者：古川 勝敏
(東北大学加齢医学研究所)
奈良 清光
(福島県立医科大学医学部生化学講座)
荻谷 慶喜 (同上)
伊藤 浩美 (同上)
星 京香 (同上)

研究費：物品費35万円，旅費5万円

[2] 研究経過

【研究目的】

髄液はバイオマーカーの宝庫である。例えば、加齢医学研究所の荒井啓行教授が見出したリン酸化タウの高値 (*Ann. Neurol.*, 2001, 50: 150-6) およびアミロイドペプチドA β 42の低値(さらに両者の比率)は、アルツハイマー病の最も優れた診断マーカーである。また、申請者と荒井教授の共同研究により見いだされたトランスフェリン (Tf) 糖鎖アイソフォームは、認知症を示す特発性常圧水 (iNPH) 頭症の診断マーカーである (*Neurobiol Aging*, 2012, 33: 1807-15)。これらの検査のためには腰椎穿刺による髄液採取を行うが、その侵襲性が問題である。我々は、ヒトおよびラットにおいて、クモ膜下腔と鼻粘膜下が嗅神経束内の“リンパ管”により交通していることを見いだした (図1A, B)。また、鼻汁中にTfが存在することを見いだしている。本共同研究では、鼻汁中のTfが髄液中Tfレベルと相関することを示し、鼻汁による髄液Tfマーカー測定を目的として研究を行った。

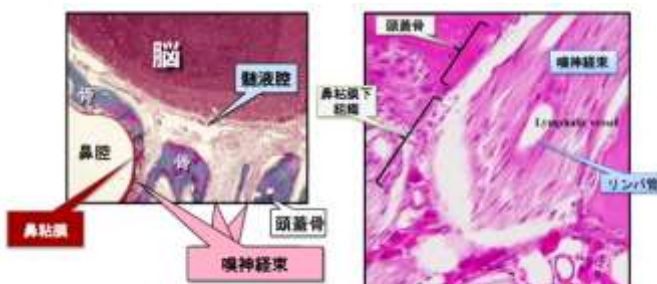


図1A 嗅神経束が青紫色の骨を貫いて赤色の鼻粘膜下に連している。

図1B 嗅神経束中にリンパ管が存在する (強拡大図)

[3] 成果

(3-1) 研究成果
以下、研究活動状況の概要を記す。

【研究概要】

本研究では、鼻汁中のTfマーカー濃度が髄液中のTf濃度を反映し、iNPHの診断マーカーになるか否かを検討した。すなわち、腰椎へ針を刺す(髄液採取)ことなく、鼻汁採取での診断を目指した。

【研究打ち合わせ】

加齢医学研究所の担当教官である荒井啓行教授とは以前より共同研究を行っており、年間4回の研究打ち合わせを行った。また、荒井教授より臨床検体の供与を受けた。今後も緊密な連絡をとる予定である。

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

まず第1に、鼻汁の採取法の検討を行った。

具体的には、耳鼻科用タンポンを鼻腔に挿入し、鼻腔最上部に触れさせ、鼻汁を吸収させた。鼻粘膜に損傷を与えないように、以上のプロセスは耳鼻科用内視鏡の観察下で行った。

第2に、鼻汁中Tfの検出を試みた。

Tfの髄液中濃度と血液中濃度の比は40:1である。すなわち、侵襲的に鼻汁を採取すると、血液の混入により髄液Tfの正確な分析ができない。また、予備実験では鼻汁中のムチンが電気泳動の際のバンドパターンを乱すことが示されていた。そこで鼻汁の採取方法及びムチンの除去方法を検討した後、鼻汁中Tfの分析を行った。

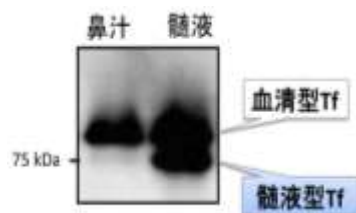
【鼻汁中ムチンの除去】

鼻汁中ムチンは電気泳動を妨げるので、除去方法を検討した。ムチン分子は巨大な糖タンパク質であることから、メンブレン・フィルター (Molecular Cutoff: 300 kDa) を通過しない。一方、Tfは分子量75 kDaであることから、フィルターのフロースルー画分に回収されることが示された。以下にこの画分を用いたウェスタンブロット法の結果を示す。

【ウェスタンブロット法の結果】

髄液中には2種類の Tf アイソフォームが存在する。一つは電気泳動上移動度が小さい“血清型” Tf であり、他の一つは移動度が大きい“髄液型” Tf である。鼻汁中の Tf は、血清型 Tf と同じ移動度を示すシングルバンドとして検出された(図2)。血清型 Tf よりやや移動度の大きな位置に微弱なバンドが検出されたが、これはレクチン・ブロット法の結果、髄液型 Tf ではないと結論された。すなわち、鼻汁中の髄液型 Tf のバンドは検出限界以下であった。

図2 鼻汁中 Tf のウェスタンブロット法による解析



脳周囲の髄液腔(クモ膜下腔)と粘膜下組織は解剖に交通しているが、鼻汁中の髄液型 Tf は検出限界以下であった。本実験系には二つの欠点がある。一つは測定感度が低いことである。また、鼻汁中には図2に示される血液由来と考えられる Tf が存在し、測定感度を上げたとしても、髄液型 Tf の検出が妨害される。そこで、髄液中濃度が高く、高感度測定が可能なプロスタグランジン D2 合成酵素(PGD2S)の測定を行った。因に、PGD2S の血中濃度は著しく低いため、血液成分の混入による妨害はない。

第3に、鼻汁中 PGD2S の検出を試みた。

Tf の分析に用いた試料を用いてウェスタンブロット法およびサンドイッチ ELISA による PGD2S の検出を試みた。ウェスタンブロット法では、PGD2S は髄液で検出されたが、鼻汁では検出されなかった。

高感度のサンドイッチ ELISA システムを用いて鼻汁中 PGD2S の検出を試みた。本システムでは 1~40 ng/mL の高感度測定が可能であったが、鼻汁中のシグナルは検出されなかった。

【考察】

髄液中の PGD2S 濃度は 15~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と高濃度であり、鼻汁中に 0.01~0.02% の髄液が含まれれば、サンドイッチ ELISA にて検出が可能であると計算された。しかし、鼻汁中の PGD2S が検出されなかったことから、髄液成分の鼻汁中への移行はないか、あるとしても極めて微量であると結論された。

(3-2) 波及効果と発展性など

本研究では、髄液成分の鼻汁中への移行は実証できなかった。しかし、髄液腔と鼻粘膜下が交通しているのは事実であるため、測定感度を上げることによって髄液成分が検出される可能性は残っている。あるいは、ごく細い針により粘膜下間質液を採取する可能性も考えられる。今後、これらの可能性を検討する予定である。

【4】 成果資料

【主要論文リスト】

- (1) Kyoka Hoshi, Hiromi Ito, Yuka Matsumoto, Kiyoshi Saito, Yoshinobu Kariya, Yoshiaki Yamaguchi, Katsutoshi Furukawa, Hiroyuki Arai, Masakazu Miyajima, Hajime Arai, Hisashi Narimatsu, Takashi Honda and Yasuhiro Hashimoto, “A Glycan Marker for Idiopathic Normal Pressure Hydrocephalus”, in *Glycoscience Biology and Medicine*, Naoyuki Taniguchi, Tamao Endo, Gerald Hart, Peter Seeberger, Chi-Huey Wong (Eds.), in press
- (2) Kyoka Hoshi, Yoshinobu Kariya, Kiyomitsu Nara, Hiromi Ito, Kana Matsumoto, Masamichi Nagae, Yoshiaki Yamaguchi, Madoka Nakajima, Masakazu Miyajima, Hajime Arai, Atsushi Kuno, Hisashi Narimatsu, Keiro Shirohara and Yasuhiro Hashimoto, “Lectin-dependent inhibition of antigen-antibody reaction: Application for measuring ano2,6-sialylated glycoform of transferrin”, *JBiochem.* 2013 Sep;154(3): 229-32
- (3) 星 京香、橋本康弘：“糖鎖バイオマーカーの新しいハイスループット測定法”、「医学の歩み」、印刷中
- (4) 橋本康弘、本多たかし、古川勝敏、荒井啓行、宮嶋雅一、新井一：“髄液中トランスフェリンと特発性正常圧水頭症”、「Clinical Neuroscience」、(株)中外医学社、東京 Vol.31 No.5 p.618-619, 2013
- (5) 本多たかし、北爪しのぶ、松本由香、齋藤 清、宮嶋雅一、新井 一、古川勝敏、荒井啓行、橋本康弘：“第10章 脳脊髄液バイオマーカー”、「臨床認知症」特集：アルツハイマー病の早期診断、富本秀和監修、(株)医学出版、Vol.2 No.2 p.35-40, 2013
- (6) 松本由香、齋藤 清、本多たかし、中島 円、宮嶋雅一、新井 一、橋本康弘：“iNPH マーカーとしての髄液トランスフェリン”、「iNPH Now」、ジョンソン・エンド・ジョンソン(株)デピュレーション・ジャパン コッドマン&CMF 事業部、東京 Vol.10 p.2 2013