

## 認知症・依存症の診断のための血中物質測定法の開発

大阪精神医療センター こころの科学リサーチセンター  
塩坂 貞夫

大阪精神医療センター こころの科学リサーチセンター  
島田 昌一

### 1. 諸言

こころの科学リサーチセンターは、社会的ストレスや急激な変革による現代人の心の病に対処する橋渡し研究（Translational Research）を行う研究センターとして、大阪精神医療センター内に新設された。塩坂ユニット・島田ユニットは、とりわけ社会要求度の高い認知症・依存症に絞って研究を行っている。

#### 1.1 T1-1 認知症ユニット（塩坂ユニット）

**KLK8** プロテアーゼは、記憶や情動など大脳辺縁系の神経活動に同期して、エンドプロテアーゼ活性が活性化されるとともにその産生も増大する。同定された基質として、神経栄養因子 **NRG1** のほか接着分子、細胞外基質タンパク質がある。**NRG1** は **GABA** ニューロンにある受容体にシグナルを伝え、**GABA** ニューロンの活動を制御する。アルツハイマー病（**AD**）や軽度認知障害（**MCI**）の脳においては、**KLK8** は過剰となり脳脊髄液中および血液（**CSF/Blood**）中に漏出すると同時に、アミロイドの蓄積を促進する。これにより、シナプス伝達障害が起こると考えられる。このため、血中 **KLK8** 量の測定は **MCI** および **AD** の診断法としてきわめて有力である。

#### 1.2 T1-3 依存症ユニット（島田ユニット）

依存症の先行研究において、診断の要件を満たすバイオマーカーは存在しない。依存症の重症度の客観的なマーカーができれば、治療や再発防止の指標としても大いに役立つと考えられる。生体の構成成分は、96.6%は炭素、酸素、水素、窒素の4つの主要な元素から成るが、それに加えてナトリウム、カリウム、カルシウムなどの7つの中間元素が3~4%を占め、この両方で生体内の99%以上を占める。それ以外の元素は微量元素と呼ばれるが、微量元素の中には鉄や亜鉛など生命の機能維持に必要なものから、まだ機能のよくわかっていない元素が多数存在している。しかし、最近の研究で生体内の微量元素の役割や重要

性、疾患との関係も解明されつつある。本研究ではこの点に着目し、薬物依存によって生じる脳機能の変化を、微量元素の測定を通して解析した。覚醒剤のメタンフェタミン依存症モデル動物を用いて、誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP-MS) によって血中微量元素の網羅的測定と多変量解析を行うことにより、メタンフェタミン依存症モデルマウスと正常マウスの血液検体を識別する方法を開発した。

## 2.方法

### 2.1 認知症ユニット

2020年度、血漿 KLK8 の測定法として、KLK8 に対するサンドイッチ法により、高い感度および特異度を有する測定系を構築した。これをもとに、2021年度には全自動免疫測定システムを立ち上げ、計画通り臨床検査および既存バイオマーカーによって診断された患者の脳脊髄液および血漿リソースを用いて、正常、初期 MCI、後期 MCI および AD サンプルについて計測した。

### 2.2 依存症ユニット

日本エスエルシー株式会社より6週齢の雄マウス (C57BL/6JmsSlc) を入手し、7週齢日から5日間連続で、覚醒剤であるメタンフェタミンまたは生理食塩水を腹腔内投与した。メタンフェタミンの腹腔内投与方法は、1日1回、5日間連続投与することで薬物依存症モデルマウスを作製した。メタンフェタミンを5日間連続投与後に採血するマウス群と、連続投与した後で1ヵ月間未投与期間をおいた後に採血するマウス群、コントロールとして生理食塩水を投与して採血したマウス群との間で比較実験を行った。

血清 25  $\mu$ L を測定容器に取り分け、そこへ酸を加えて加熱分解を行った。血清に対し 50 倍希釈になるように超純水で希釈を行い、誘導結合プラズマ質量分析 (ICP-MS、Agilent 社製 Agilent7800、使用ソフト : Mass Hunter 4.3 Workstation Software for 7800 ICP-MS バージョン C.01.03 (ビルド : 505.16)) で各種元素の量を網羅的に測定した。

コントロール群とメタンフェタミン投与群について各種微量元素の実測値を求め、多変量解析による依存症のリスク解析アルゴリズムを作成し、判別式を作った。

## 3.結果

### 3.1 認知症ユニット

リコンビナントヒト KLK8 によりモノクローナル抗体を作製し、ヒト抗体を産生するハイブリドーマ 16 クローンを選択した。そのうち最も高い感度と特異度を有する良好なクローンを選別し、2つのクローンから抗体を精製して、サンドイッチ法による ELISA システムを立ち上げた。2020年度には市販血漿を用いて本システムで測定し、約 300 pg/mL と先行研究 (Teuber-Hanselmann et al.<sup>1)</sup>) による正常コントロールの血中値 48.3-508.4 pg/mL と

ほぼ同等の結果が得られた。

これをもとに **KLK8** 全自動免疫測定システムを確立した。

2021 年度にはこの検査系を用いて、計画通り以下のサンプルについて計測した。

(1) 市販血漿を用いた **KLK8** 定量法の確立。

(2) 全自動免疫測定システムによって予備試験を行った。初期型 **MCI** においてピークを有し、**AD** では正常に比しやや高値となる測定値を得て、先行研究をほぼ追試できた。

### 3.2 依存症ユニット

メタンフェタミン連続投与の覚醒剤依存症モデルマウスにおいて、血中の微量有元素を **ICP-MS** により網羅的に解析した。コントロールグループ間での血中の微量元素の含有量はそれほど大きなばらつきはなく、正常なマウスの生体内での必要な元素量は比較的厳密にコントロールされていることが分かった。その中で、重要と考えられる 19 元素を選別し、コントロールマウス群と依存症マウス群の識別を可能とする、多変量解析による依存症のリスク解析アルゴリズムを作成し、判別式を作った。

このアルゴリズムより算出したスコアで比較すると、5 日間覚醒剤連続投与により作製した依存症マウス群とコントロールマウス群を高い確率で識別することができた。また、覚醒剤連続投与後 1 ヶ月の未投与期間をおいた後に採血したマウスの血液分析においても、同様の方法で依存症群を識別することができた。

## 4. 考察

### 4.1 認知症ユニット

**AD** のバイオマーカーとして、これまで脳脊髄液 (**CSF**) および血漿中でのアミロイド  $\beta$  (**A $\beta$ 42**) やリン酸化タウの定量法あるいは脳画像検査が開発されてきた。しかしこれらは、**MCI** や初期 **AD** 患者の血漿においては正常人との差がつかない。理由として、これらマーカーは神経の病理変性に基いており、**MCI** 患者の **CSF** 中や血液中に漏出するほどには蓄積されていないことが考えられる。また、血漿中の **A $\beta$**  を測定する試みがなされているが、測定に必要な血漿量が多く、装置も大がかりとなり、実用的とはいえない。**A $\beta$**  等、原因物質の軽度な蓄積しかない認知症の初期段階であっても、記憶障害など生理学的な伝達障害、すなわちシナプトパチーは起こる。そこで、脳活動とその異常を鋭敏に反映するバイオマーカーとして、**KLK8** の血漿中濃度を測定することとした。**KLK8** 異常増加は、**MCI** 発症から初期 **AD** への移行期の重要なバイオマーカーとなりうる。

今回、われわれは **MCI** 患者血漿において、**KLK8** の異常増加を観察し、**MCI** において **KLK8** が高値傾向となることを見出した。今後、健常からの移行過程を明らかにすることを目指す。そのため、大阪精神医療センターの「もの忘れ外来」由来の血漿サンプルを用いた前向き研究を行い、血中 **KLK8**、**A $\beta$ 40**、**42**、リン酸化タウを、同時に時間経過を追っ

で分析し、これらと患者の認知機能との相関を検討していく予定である。

#### 4.2 依存症ユニット

メタンフェタミンをマウスに連続投与して覚醒剤依存症モデルを作製した。ICP-MS を用いて血液検体の微量元素を網羅的に測定し、多変量解析により依存症のリスク解析アルゴリズムを作成し、数値化したスコアによる客観的な指標により、覚醒剤依存症モデルマウスと正常マウスの血液検体を識別できることを明らかにした。今回のアルゴリズムに組み込まれた微量元素の中には、脳内で神経伝達物質の代謝や合成に関わる酵素活性に必要な元素や、神経伝達物質の受容体の機能調節などに必要な元素、あるいは神経細胞で遺伝子発現調節をしている蛋白の活性に必要な元素などが含まれており、正常な脳の神経活動を行うために、脳内ではこれらの微量元素は一定のバランスを保つように維持されている。本研究において、変化の認められた微量元素に関して、どのように依存症の形成に関与しているのか、そのメカニズムを研究していく必要がある。ヒトでは覚醒剤を用いた後、尿中では3~6日、血中では2~3日まではメタンフェタミンの痕跡を検出できることが知られているが、今回の実験では覚醒剤依存になったマウスの1ヵ月後でも、血液の微量元素の変化をある程度追跡できた。このことは、メタンフェタミンやその代謝物が体内からなくなった後でも、メタンフェタミン投与によって体内で起こった変化を、長期的に微量元素分析を通して追跡できる可能性を示唆している。

依存症は認知症を誘導もしくは加速するといわれている。たとえば、アルコールや薬物依存は脳を萎縮させ、認知症の発症を早める。しかし、認知症素因がある人が依存症に陥りやすいのかについての研究はない。各バイオマーカーを前向きに検討していくことで、両者の関連が明らかとなる。認知症および依存症の前向き血液サンプルを今後さらに収集していき、バイオバンクとする計画である。

#### 5.結語

認知症ユニットでは、全自動免疫測定システムの確立に成功した。

依存症ユニットでは、誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP-MS) を用いて血中微量元素の網羅的測定と多変量解析を行うことによって、覚醒剤依存症モデルマウスと正常マウスの血液検体を、覚醒剤投与後の比較的長い間にわたって識別できる方法を開発した。

#### 6.文献

1) Teuber-Hanselmann, S. et al. CSF and blood kallikrein-8: A promising early biomarker for Alzheimer's disease. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2020; 91: 40-48.

#### 7.成果発表

1) Shiosaka, S. Kallikrein 8: A key sheddase to strengthen and stabilize neural plasticity. *Neurosci Biobehav Rev.* 140, 104774. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2022.104774>