

氏 名	南條 俊文
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	博士 甲第741号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成28年 3月 10日
学位論文題目	Development of a method to measure A 42 in nasal cavity samples and its application in normal human volunteers (鼻腔内検体中 A 42 測定方法の開発および健常ヒトボランティアへの適用)
審査委員	主査 教授 扇田 久和 副査 教授 山本 学 副査 教授 小島 秀人

論文内容要旨

※整理番号	741	(ふりがな) 氏名	なん じょう とし ふみ 南 條 俊 文
学位論文題目	Development of a method to measure A β 42 in nasal cavity samples and its application in normal human volunteers (鼻腔内検体中 A β 42 測定方法の開発および健常ヒトボランティアへの適用)		
<p>【目的】</p> <p>アルツハイマー病 (AD) は、認知能力、およびいくつかの脳領域におけるアミロイド沈着、神経原線維のもつれ、およびニューロン損失を含む特徴的な神経病理学的特徴の進行性の喪失によって特徴づけられる神経変性疾患である。アミロイド仮説によると、老人斑のアミロイドβ (Aβ) の蓄積がアルツハイマー病の病理学の初期の病理学的事象であり、Aβ の沈着が臨床症状の現れる 10 年から 20 年前に発生することを示されている。現在、AD のバイオマーカーとして、脳脊髄液 (CSF) や PET を用いた研究が主に試みられている。一方、近年 AD モデルマウスやヒトの嗅上皮に Aβ の沈着が報告されるなど、鼻腔内での AD 診断の可能性が示された。しかしながら、鼻腔領域のタンパク濃度は ELISA 法の検出下限以下であるためヒト鼻腔内 Aβ に関する情報は少ない。本研究で我々はヒト鼻塗抹標本における Aβ42 の量を測定するための高感度測定方法を構築した。また、構築した方法を用いて、臨床研究を行い、ヒト鼻腔内における Aβ42 の蓄積量について検証した。</p> <p>【方法】</p> <p>ヒト鼻腔内の Aβ42 を本研究で開発した方法で検出できるか調べるために 23 歳から 78 歳の健常ボランティア 26 名から鼻塗抹標本を採取した。鼻塗抹標本は綿棒を用いて下鼻甲介と総鼻道の粘膜から採取した。採取した鼻塗抹標本は約 70%濃度のギ酸に溶出し、70°C1 時間インキュベートし、サイズの大きなタンパクや分子を取り除くためろ過を行った。特注の濃縮専用マイクロチューブを用いて減圧濃縮で溶液量を減らした後中和した。その後、ELISA 法にて鼻腔内検体に含まれる Aβ42 を測定した。また、市販の標準物質を用いて、開発した測定法のバリデーションを行った。なお、本研究は滋賀医科大学倫理委員会の審査を受けて承認された (21-149-1)。</p>			

【結果】

測定法のバリデーションにおいて、検量線は、相関係数は0.9984以上であり、逆算値の真度はLLQで-3.7%~13.1%、その他の濃度で-9.5%~13.2%であった。これらの結果はいずれも判定基準を満たすものであり、0.5~10 pMの濃度範囲で直線性があると判定した。Blank試料及びSP-L試料とも判定基準を満たしたため、特異性に問題ないと判定した。同時再現性について、精度及び真度は-8.4%~15.4%及び6.4%~16.5%であった。これらの結果は真度、精度ともに判定基準を満たすものであり同時再現性があると判定した。5名の鼻塗抹標本において、前処理なしの検体ではAβ42濃度は検出下限未満であり、前処理を実施することで検出可能となった。21名の鼻塗抹標本において、下鼻甲介と総鼻道の総たんぱく量当たりのAβ42濃度は、それぞれ 12.37 ± 5.98 , 3.58 ± 1.94 pmol/gであり、下鼻甲介が総鼻道よりも顕著に高かった ($P < 0.001$)。若年ボランティアと老年ボランティアの総たんぱく量当たりのAβ濃度は、下鼻甲介ではそれぞれ 12.26 ± 5.98 と 12.84 ± 6.87 pmol/gであり、総鼻道ではそれぞれ 3.57 ± 2.14 と 3.64 ± 0.87 pmol/gであった。しかしながら、下鼻甲介と総鼻道いずれの場所も若年ボランティアと老年ボランティアで有意な差は見られなかった ($P=0.86$, $P=0.45$)。

【考察】

本研究では、バリデーションにおいて開発した方法によるAβ42の測定は、直線性、特異性、真度、精度、再現性すべてで判定基準を満たした。

健常ボランティアの下鼻甲介と総鼻道における総タンパク量当たりのAβ42レベルは、さらなるAD患者の鼻腔内Aβ42レベルの研究のために基準値を作るべきだと考える。興味深いことに、下鼻甲介は総鼻道よりも顕著に高かった。下鼻甲介が総鼻道よりも脳に近いところに位置していることと、脳から鼻への経路があるという過去の報告から、鼻腔内Aβが脳からきている可能性が示唆された。Aβ42量は、ギ酸を用いた前処理によって劇的に上昇した。ギ酸は、ヒトや動物の組織に吸着や凝集したタンパクを解離し、不溶性のAβ凝集体を可溶化し、組織切片上のギ酸による前処理が免疫染色での免疫反応性を向上させることが知られており、鼻塗抹標本のAβ42が凝集しておりギ酸による前処理によって凝集したAβがモノマーAβに分解されたと考えられる。このアイデアは、ギ酸で抽出されたとき、Aβ42は、ADモデルマウスの鼻の領域からのみ検出されたことを示す我々の以前の研究によっても支持される。これまで我々および他者の研究でADモデルマウスとヒトの鼻腔へのAβ42の沈着と、ADモデルマウスにおいて鼻と脳のAβ42量が相関することが報告されており、本法がADを診断する有益なツールになる可能性が示唆された。そのため、現在我々はAD患者とエイジマッチングしたコントロールの鼻腔内Aβ42量について研究を行っている。

【結論】

我々は、ADのスクリーニング診断に有用となる可能性のあるヒト鼻塗抹標本のAβ42を測定するための新規かつ高感度な方法を開発した。

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	741	氏名	南條 俊文
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) (明朝体 11ポイント、600字以内で作成のこと。)</p> <p>アルツハイマー病では、老人斑のアミロイドβ (Aβ) の沈着が初期の病理学的事象である。本研究では、ヒト鼻腔塗抹標本における Aβ42 の高感度測定方法を構築し、この測定方法を利用して健常ボランティアの鼻腔内 Aβ42 量について検討を行い、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 今回構築した測定方法では、選択性、特異性および同時再現性の全てにおいて、ICH ガイドライン判定基準を満たしていた。 2) 5名の鼻腔塗抹標本において、前処理なしでは検出下限未満であったが、ギ酸による前処理を行うことで検出可能となった。 3) ギ酸処理した鼻腔塗抹標本では、下鼻甲介と総鼻道の総タンパク質当たりの Aβ42 濃度はそれぞれ、12.37 ± 5.98 と 3.58 ± 1.94 pmol/g であり、下鼻甲介で有意に高値となった ($p < 0.001$)。 4) 若年者と老年者の下鼻甲介における Aβ42 濃度は 12.26 ± 5.98 と 12.84 ± 6.87 pmol/g、総鼻道では 3.57 ± 2.14 と 3.64 ± 0.87 pmol/g であり、両部位において若年者と老年者で Aβ42 濃度に有意な差はみられなかった。 <p>本論文は、ヒト鼻腔塗抹標本における Aβ42 の新しい高感度測定方法を示すと共に、鼻腔 Aβ42 濃度に関する新たな知見を与えたものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け合格したので、博士(医学)の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 597字)</p> <p style="text-align: right;">(平成27年 8月31日)</p>			