

血液検査からアルツハイマー病の 兆候を検出する電気化学 センサの開発

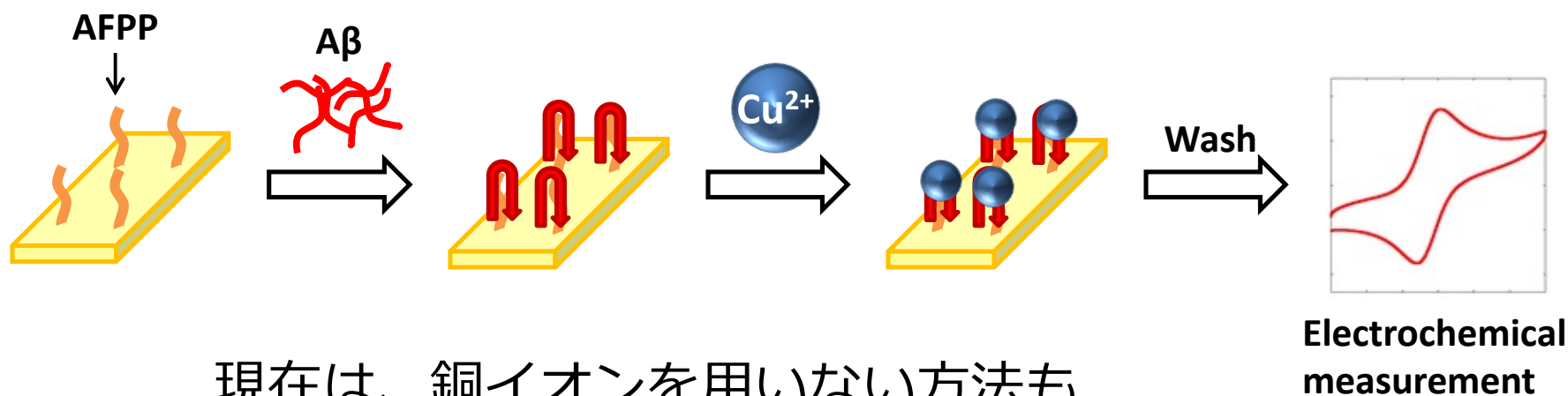


甲南大学フロンティアサイエンス学部 生命化学科

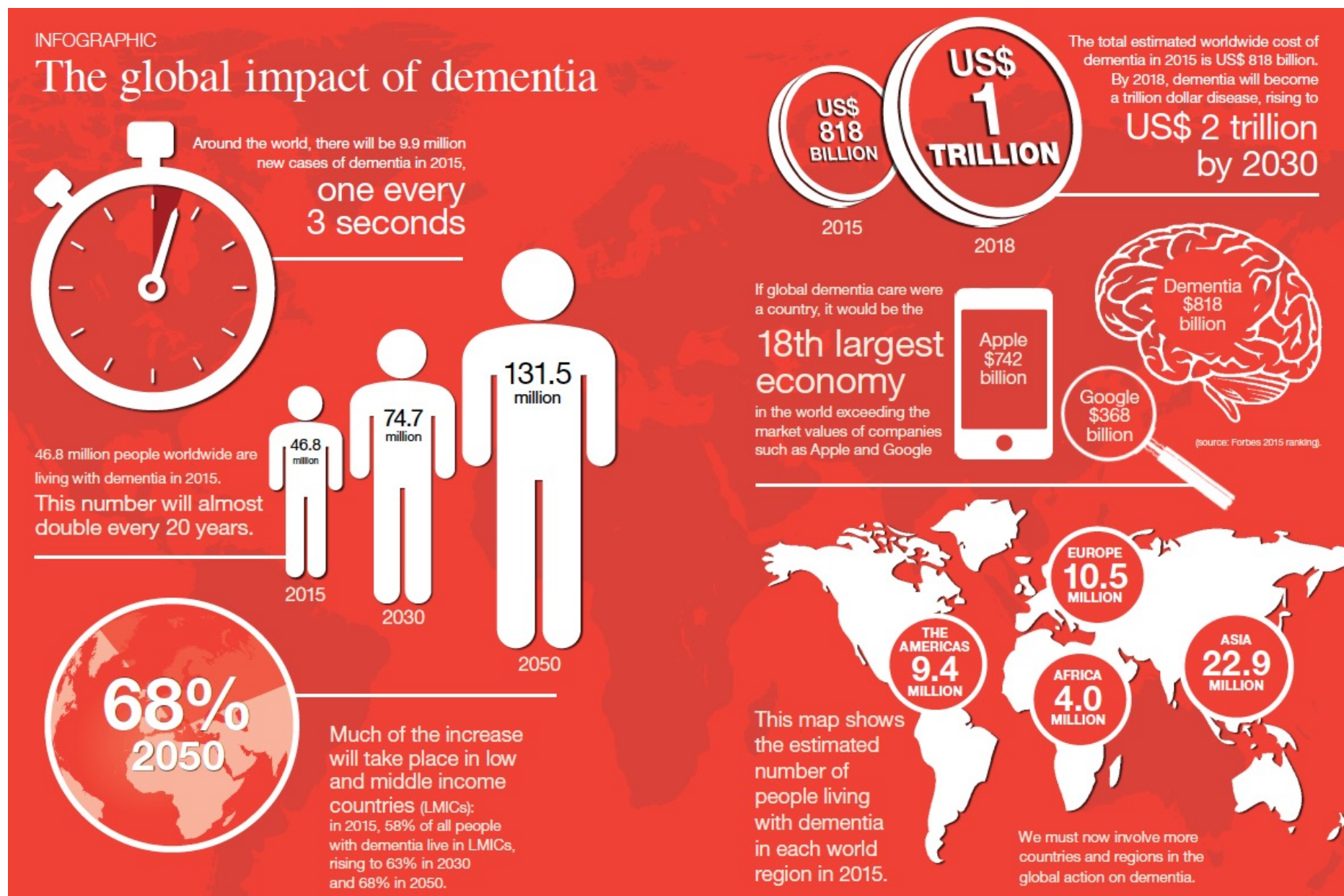
教授 藤井 敏司

2022年3月1日

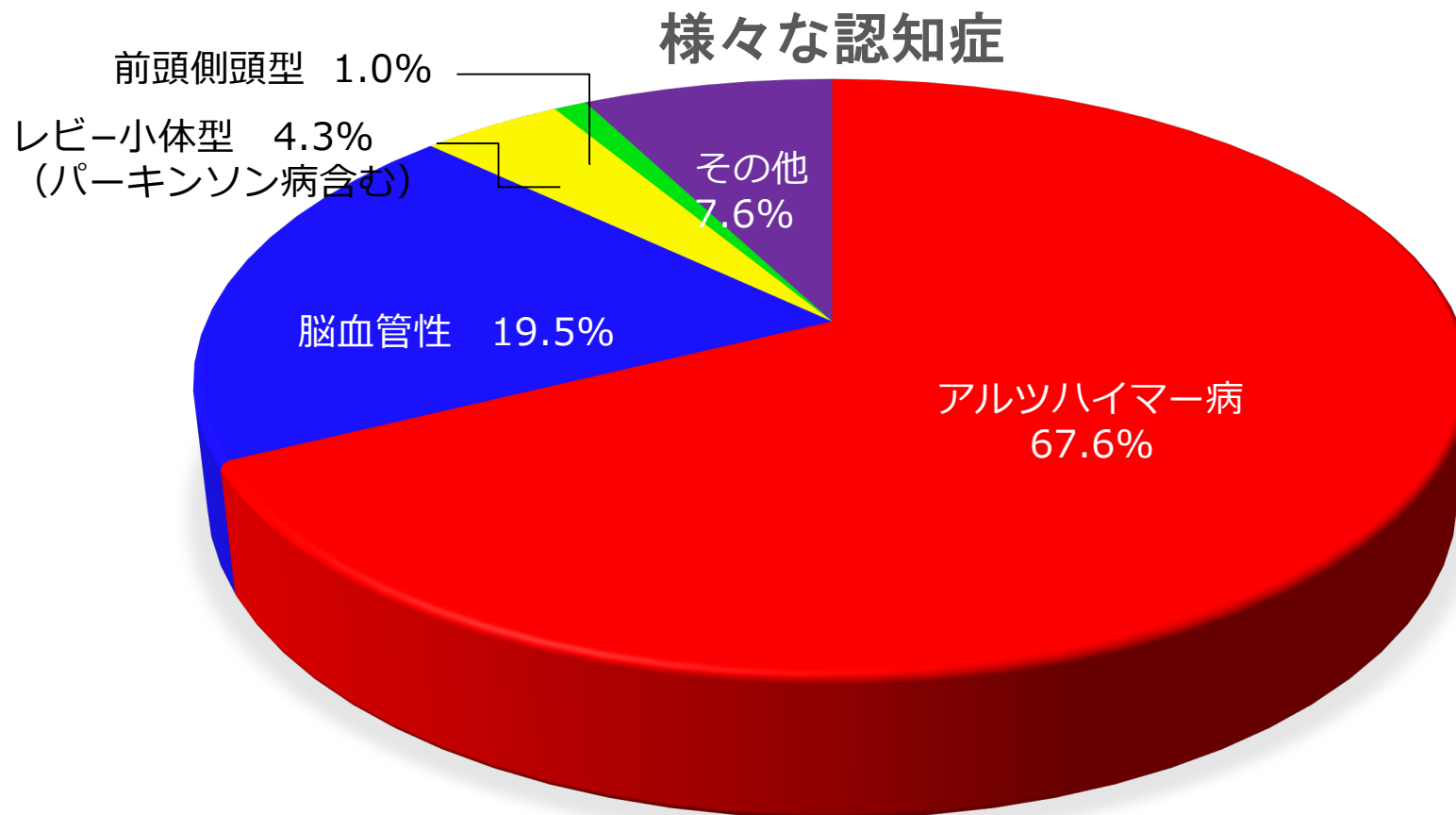
アミロイドβ(Aβ)の凝集を選択的に促進するペプチド(AFPP)を用いたAβの電気化学的検出法の開発



→ 簡便・高感度・迅速・安価に**血液中**のAβを測定することで
発症前からアルツハイマー病のリスク評価を！



- 認知症：後天的な脳の器質的障害により、一旦正常に発達した知能が低下した状態
- 「知能」のほか、「記憶」、「見当識」の障害、人格障害などが現れる
- 認知症の分類
 - ・ 血管性認知症 脳梗塞など血管障害による
 - ・ 変性性認知症 脳内のタンパク質変性による
アルツハイマー病、パーキンソン病、前頭側頭型認知症、
びまん性レビー小体病、ピック病、ハンチントン病 など
 - ・ 感染性認知症 他者からの感染による
プリオン病（狂牛病、クロイツフェルトヤコブ病 など）

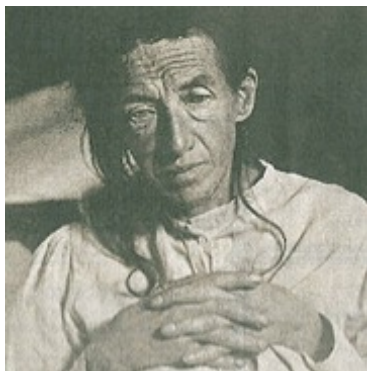


アルツハイマー病、脳血管性、レビー小体型はあわせて
「三大認知症」と呼ばれている

朝田隆ほか「厚生労働省科学研究費補助金 『都市部における認知症有病率と認知症の生活機能障害への対応』
総合研究報告書（H.23～24）のデータより

● Alzheimer's disease (AD)

1906年 ドイツ Aloysius Alzheimerが症例報告



最初の患者 Auguste Deter

46歳で発病、56歳で死亡



写真とともにWikipediaより

認知機能低下、人格変化を主症状とする認知症の1種

- ・ 早発型 (Early-onset AD : EOAD)
家族性アルツハイマー病 (Familial AD)
とも分類され、遺伝子の変異による。
40-65歳くらいで発症。AD全体の5～10%
- ・ 晩期発症型 (Late-onset AD : LOAD)
65歳を超えたあたりから加齢とともに発症率増加

65～69歳 (0.6%), 70～74歳 (1.0%), 75～79歳 (2.0%), 80～84歳 (3.3%)

米国ボストン東部での調査による

発見から1世紀経った現在でも、未だ真の原因はわかっていないが．．．
有力なものとして

● アミロイドカスケード仮説

酵素によりアミロイド前駆体タンパク質(APP)が切断され、アミロイド β ペプチド($A\beta$)が生成



通常、分解酵素により分解される



老化、分解酵素能力低下

$A\beta$ が何十年もかけて脳内に蓄積



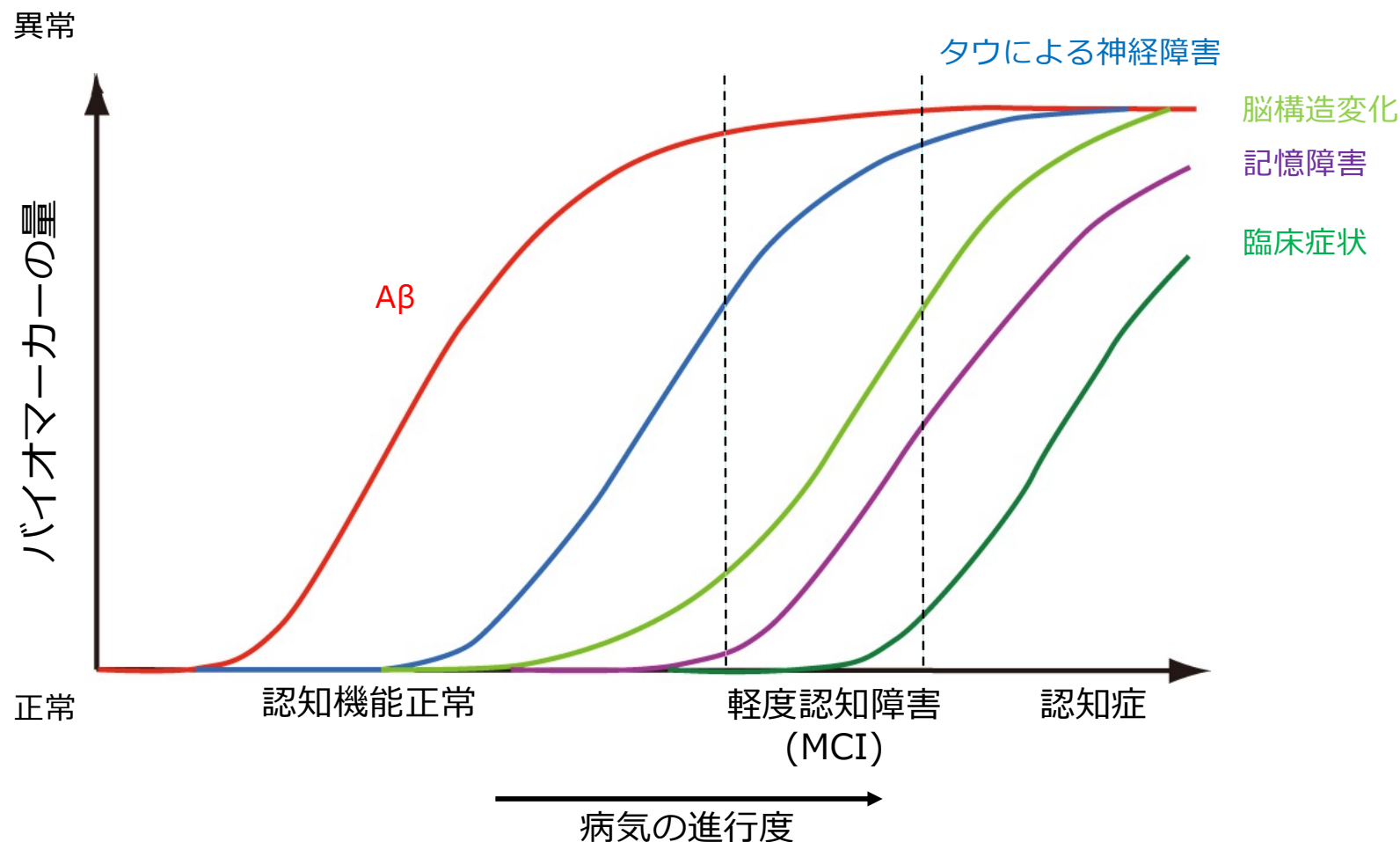
$A\beta$ に数十年遅れて細胞内に高リン酸化タウタンパク質が沈着（神経原線維変化）



蓄積した異常タンパク質を分解するために、ミクログリア（異物を分解）が活性化され、活性酸素を放出。また、 $A\beta$ と脳内の金属イオン（鉄、銅など）が結合し、活性酸素を放出。



神経細胞死



➡ Aβは最も早くから変化しはじめるバイオマーカー

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

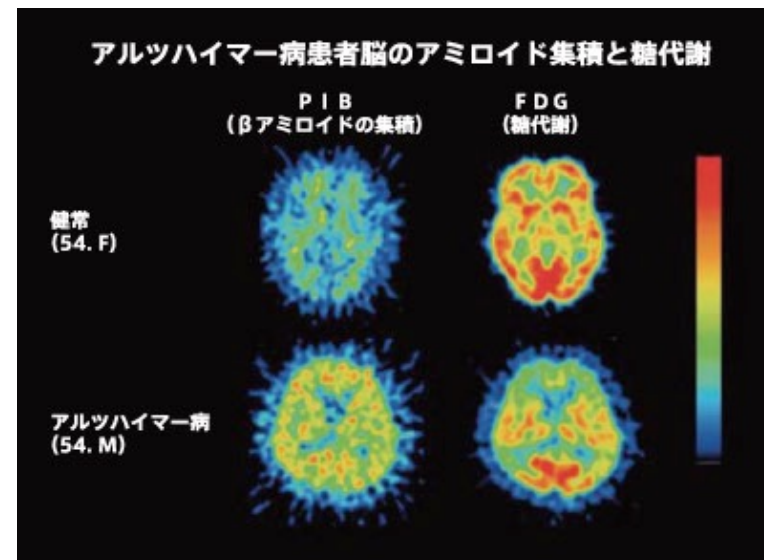
長所：低コスト

短所：判定に時間がかかる (～年)

- PET (Positron Emission Tomography)

長所：判断が容易、早期診断可能

短所：検査費用が高額、施設が限定

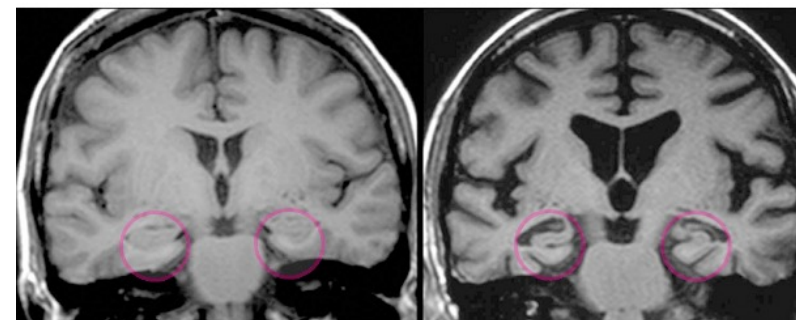


<http://www.hamamatsu.com/jp/ja/technology/innovation/pet/index.html>

● MRI (Magnetic Resonance Imaging)

長所：身体への負担が少ない

短所：判断が難しい
(老化による萎縮との区別)



健常者

アルツハイマー病

<http://kikukawa-cl.jp/>

● ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

長所：高感度 (約0.1pM)
安価 (キット 約1000円/試料)

短所：時間がかかる (約1日)
腰椎穿刺による脊髄液の採取



<http://nurse-like.com/>

薬剤名・化合物名 [販売会社]	効能
塩酸ドネペジル（アリセプト） [エーザイ・ファイザー]	アセチルコリン(ACh)エステラーゼ阻害剤。 ACh作動性ニューロンの働きを亢進(1997.1 (米), 1999.11.24 (日))
ガランタミン（レミニール） [ヤンセン・タケダ]	AChエステラーゼ阻害剤とニコチン受容体を調節し、 AChの作用を増強 (2011.3.22)
塩酸メマンチン（メマリー） [ルンドベック・アスビオ ファーマ]	NMDA受容体拮抗剤。神経の過剰興奮を抑えて細胞死を 防ぐ。中等度・高度のADに処方 (2011.6.8)
リバスチグミン（イクセロン パッチ・リバスタッチパッチ） [ノバルティス・小野]	AChエステラーゼ・ブチルコリンエステラーゼ阻害剤。 経皮吸収型。(2011.7.19)



https://www.info.pmda.go.jp/downloadfiles/guide/ph/170033_1190012F3029_1_00G.pdf



https://www.info.pmda.go.jp/downloadfiles/guide/ph/800155_1190019F1028_2_00G.pdf



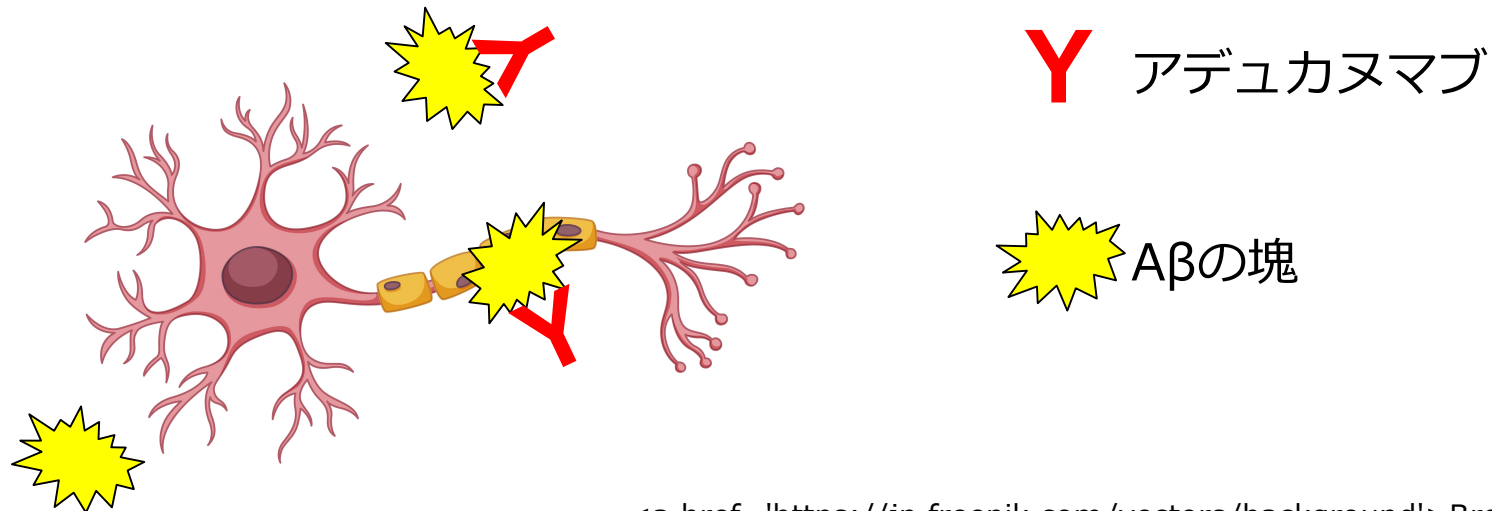
https://www.info.pmda.go.jp/downloadfiles/guide/ph/430574_1190018F1023_1_00G.pdf



https://www.info.pmda.go.jp/downloadfiles/guide/ph/530169_1190700S1118_1_01G.pdf

2021年6月7日 FDA (Food and Drug Administration)が認可
(ただし、条件付き)

抗アミロイドβ抗体を用いた、神経細胞を守る薬



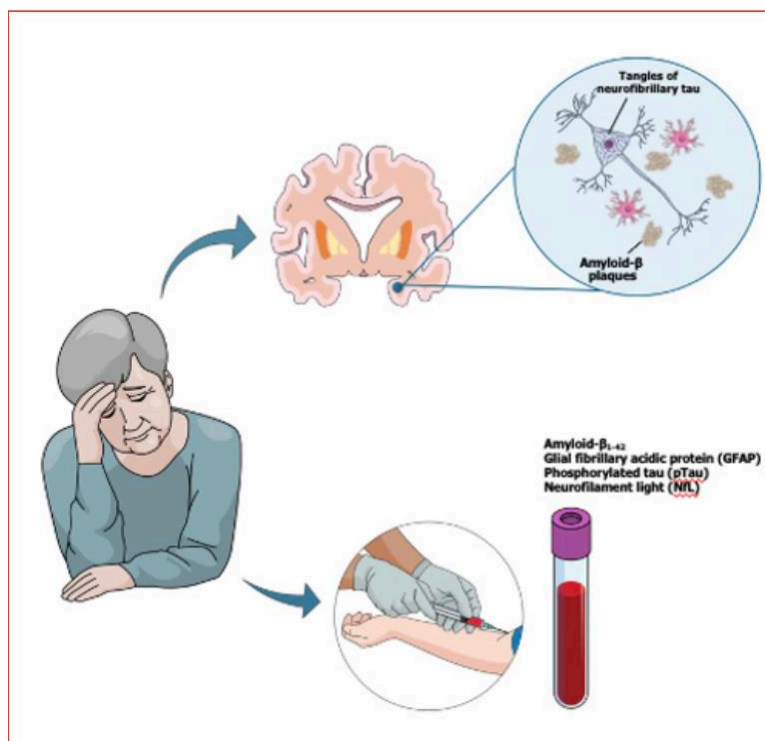
[Brgfx - jp.freepik.com](https://jp.freepik.com/vectors/background) によって作成された background ベクトル

ただし、非常に高価（アメリカで年間\$56,000）

Biomarkers



Blood biomarkers brings the hope of affordable, accessible dementia diagnosis globally, including to low- and middle-income countries.



Blood biomarkers for Alzheimer's disease: a fast-growing promise, p 95



World Alzheimer Report 2021 Launch Slidesより

<https://www.alzint.org/u/WAR-Launch-Slides-2021-4.10.pdf>

団体名	方法論	ターゲット	メリット	デメリット
島津製作所 国立長寿遺伝研	質量分析	A β 40/A β 42	比を測定できる (よりAD病理に関 係する)	測定装置が高価
シスメックス エーザイ	PET	A β 40/A β 42	比を測定できる	測定装置が高価
名古屋市立大学 大分大学 福祉村病院	Western blotting	フロチリン	血液1 μ Lで可能	操作が煩雑
筑波大学 MCBI	ELISA 免疫比濁法	ApoA-1 TTR C3	健常者とMCIを約 90%の精度で判 別可能	操作が煩雑 早期MCI期で
京都府立医大	p-tau検出キット	高リン酸化タウ	キット化されてい る	タウの変化はA β に遅れる

高感度・簡便・安価・ハイスループットなA β 測定法の開発
健康診断の1項目として使えるような検査法を！

健康診断では、血糖値・肝機能を調べるために血液を採取



血液から血球成分を遠心分離により取り除き、血漿を分離



数多くの試料を処理できるよう血漿中のA β を短時間で測定。
抗体など高額な試薬を用いることなく安価に測定

A β peptideの配列

Hydrophobic core

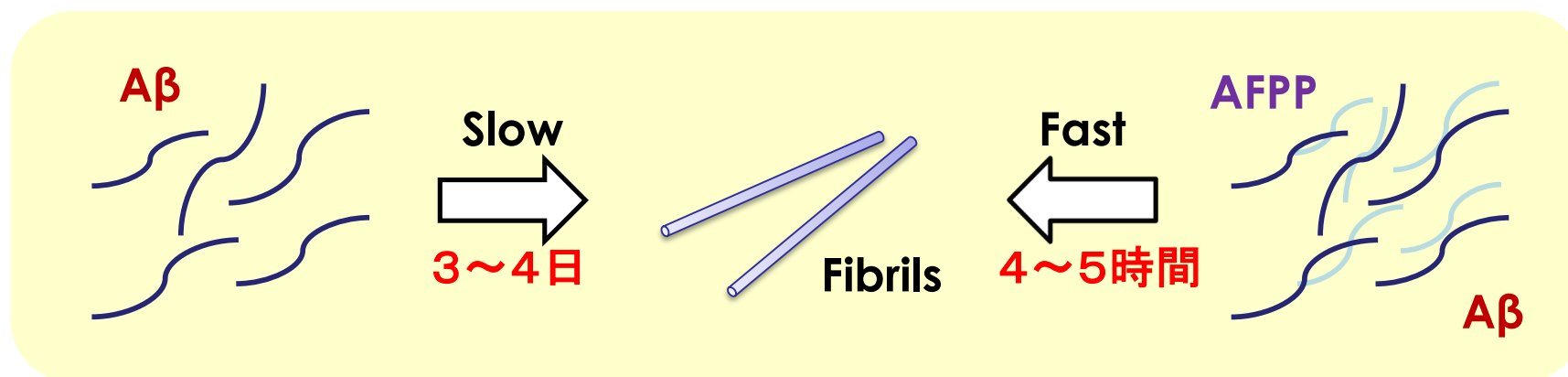
DAEFRHDSGYEVHHQ**KL**V**FF**AEDVGSNKGAIIGLMVGGVV

Metal binding site

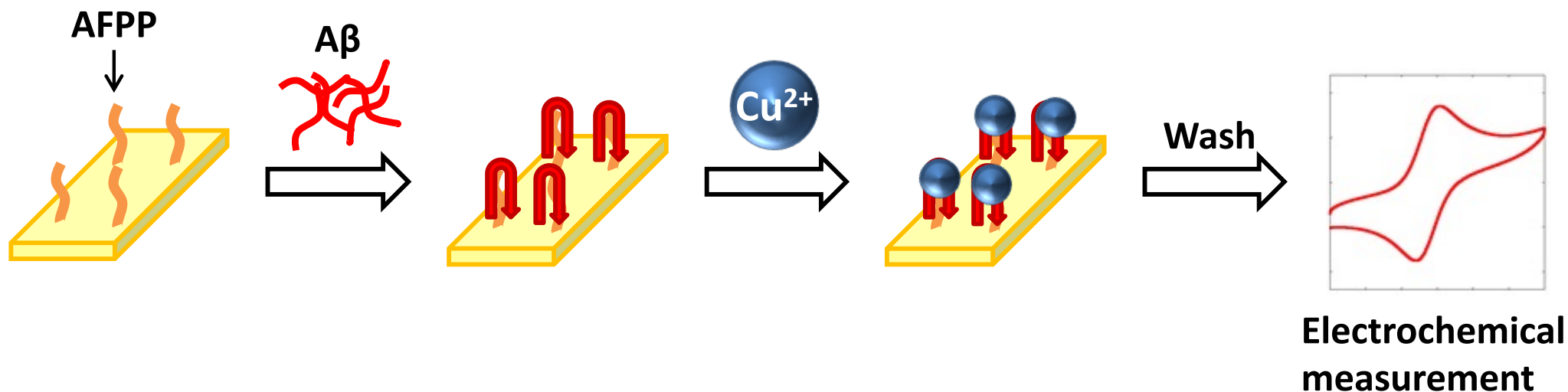


AFPPの配列

DAEFRHD**KL**V**FF**YEVHHQK



AFPPの共存により、A β の線維化が大幅に促進



S. Fujii *et al.*, Sens. Bio-sens. Res., **6** (2015), 7-12

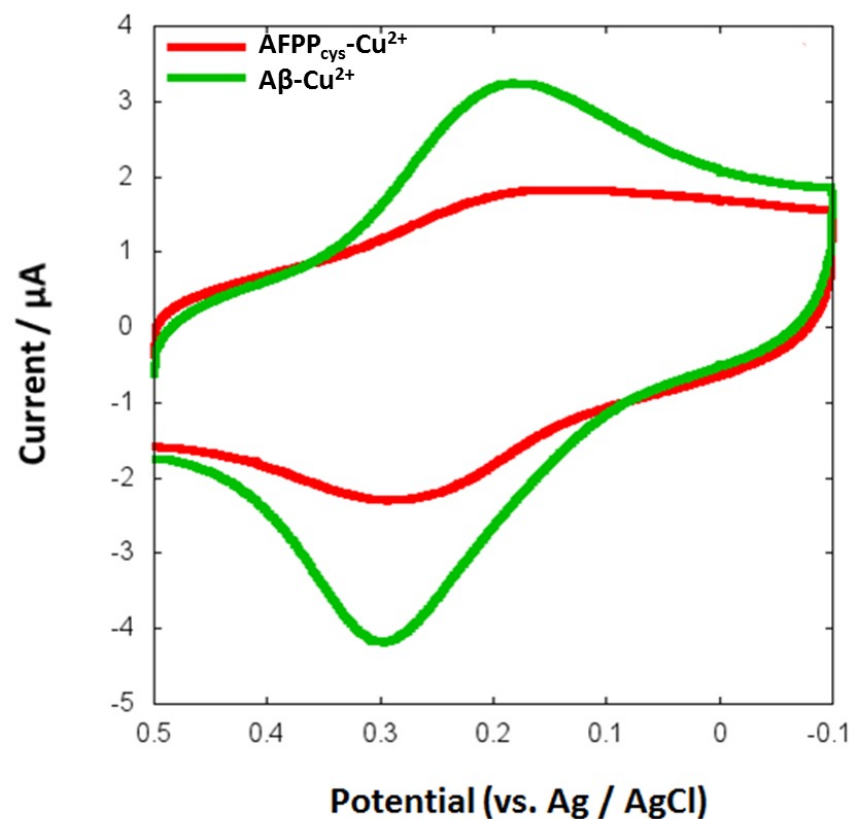
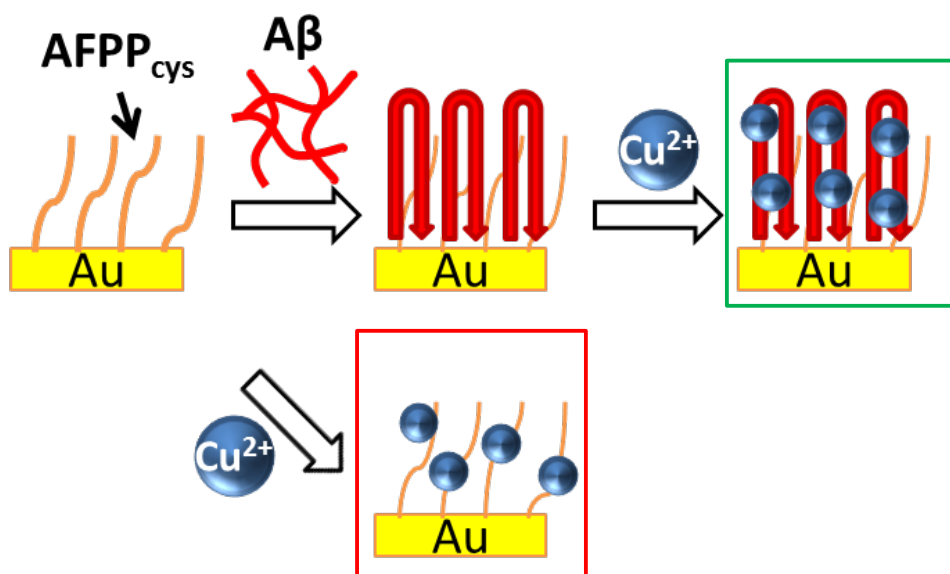
特願2015-60724

特許第6630972号

謝辞

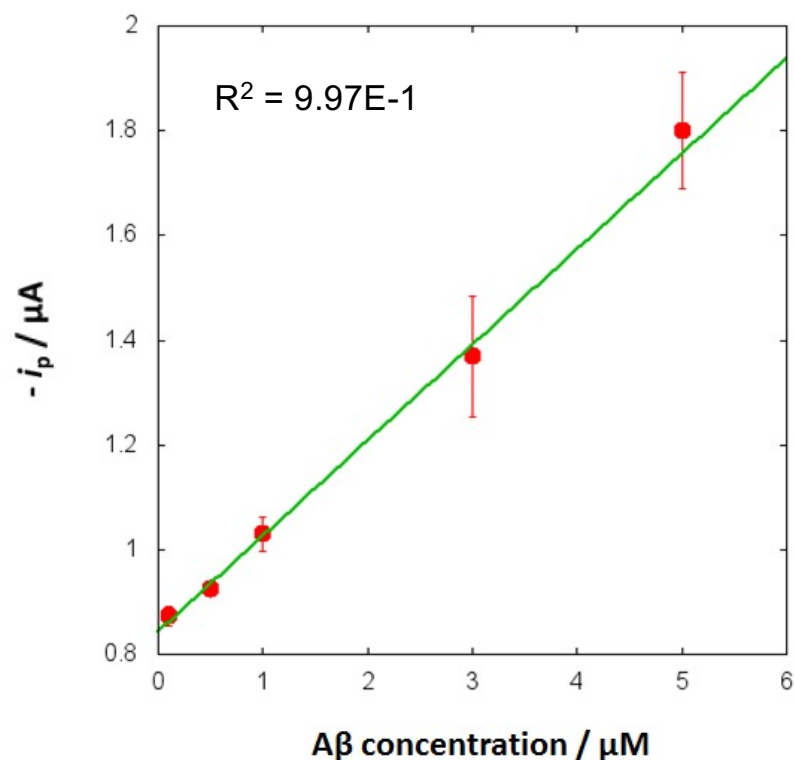
本研究はJSPS科研費（23500571, 26350552, 17K01430, 20K12681）の支援を受けて行われた。

Comparison of $\text{AFPP}_{\text{cys}}\text{-Cu}^{2+}$ with $5\ \mu\text{M A}\beta$

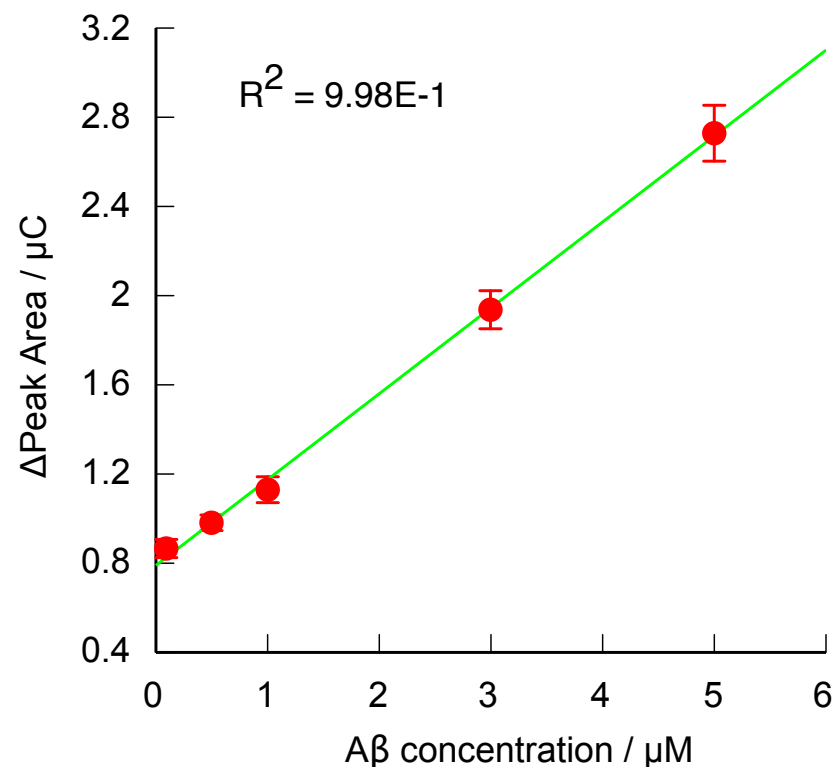


AFPP上に凝集した $\text{Cu}^{2+}\text{-A}\beta 40$ からの電流を観測できた
(データは試料混合後1時間後に測定したもの)

ピーク強度のグラフ化



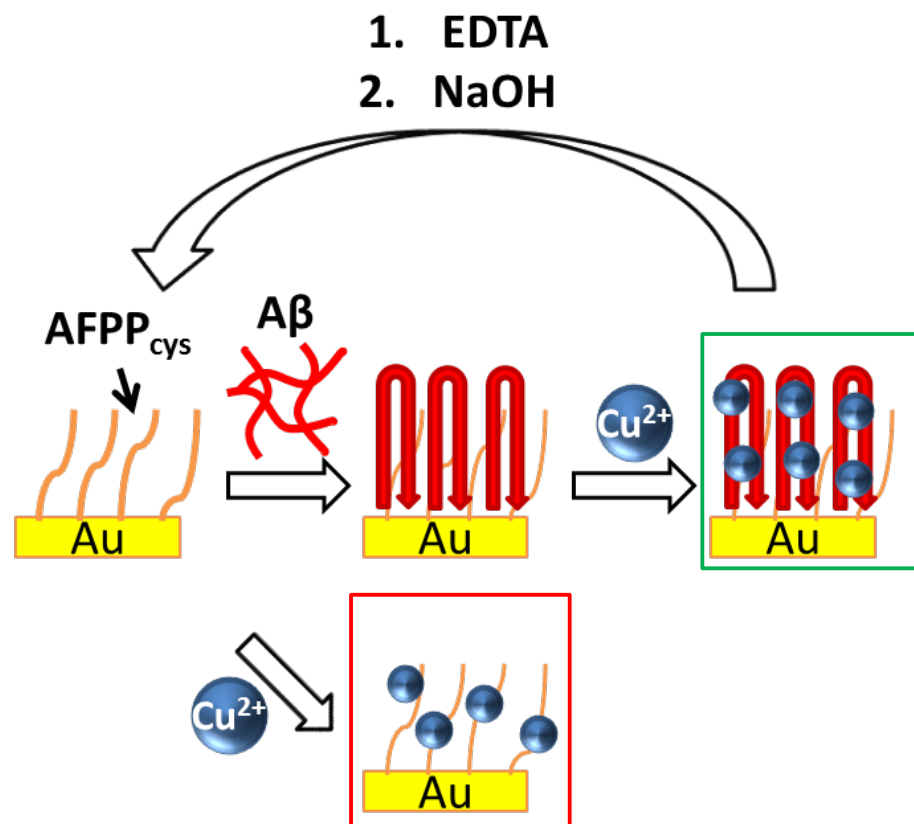
ピーク面積のグラフ化



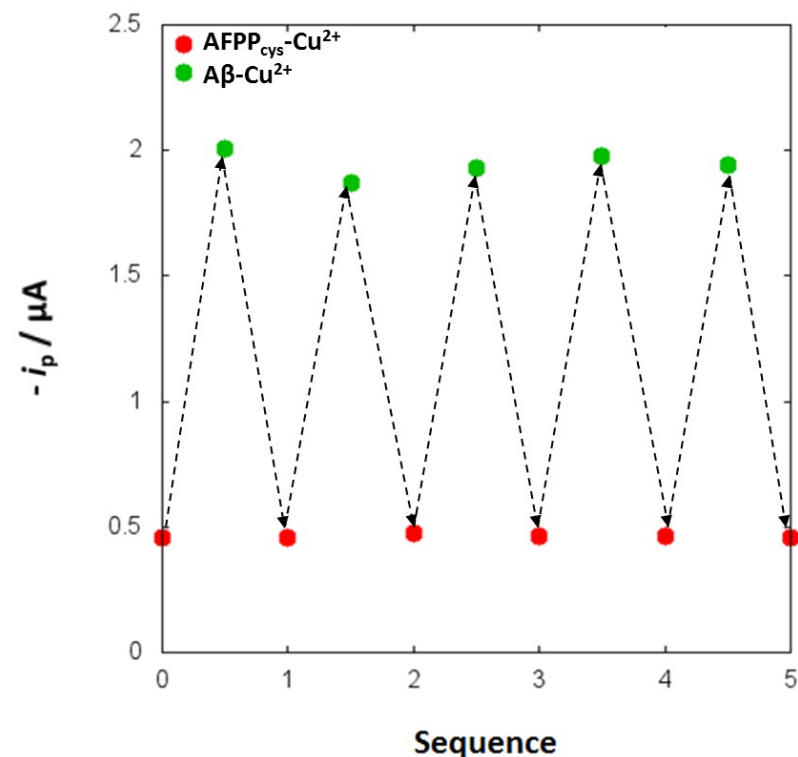
データは平均値 $\pm$ 標準誤差 (3回)

0.1 ~ 5 μM の範囲で良い直線性が得られた。
(検出限界 18 nM, 定量限界 180 nM)

AFPP修飾電極は洗浄により用意に初期化可能



電流値 i_p と初期化回数の再現性

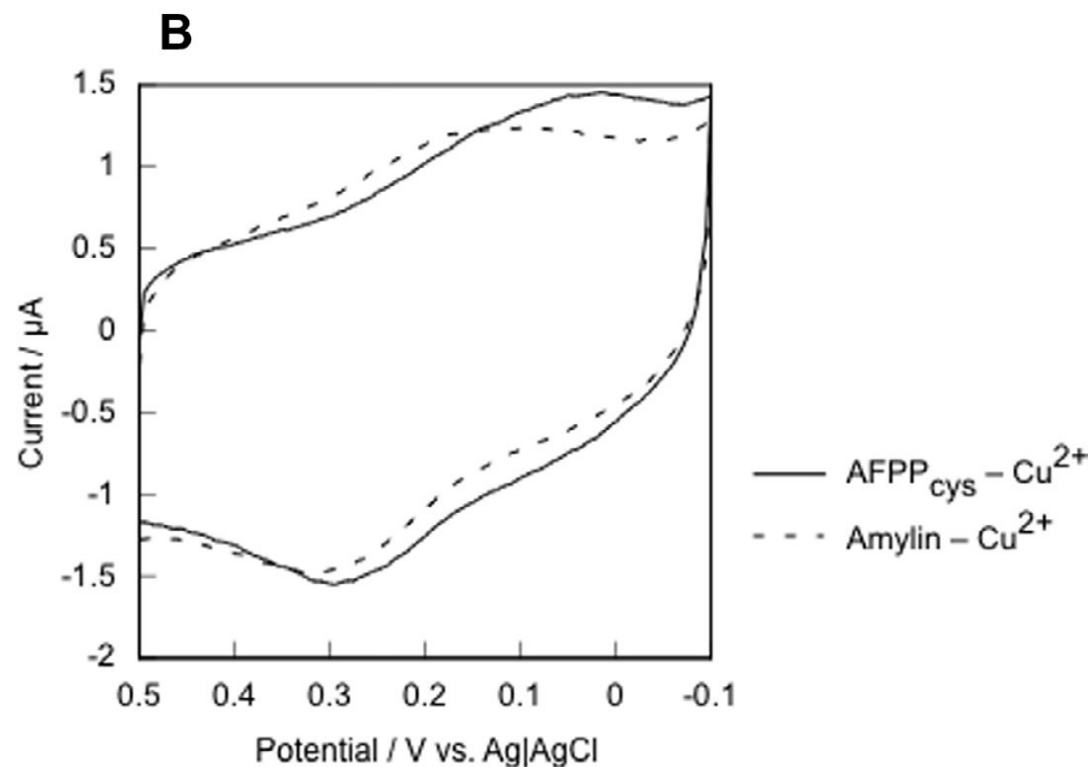
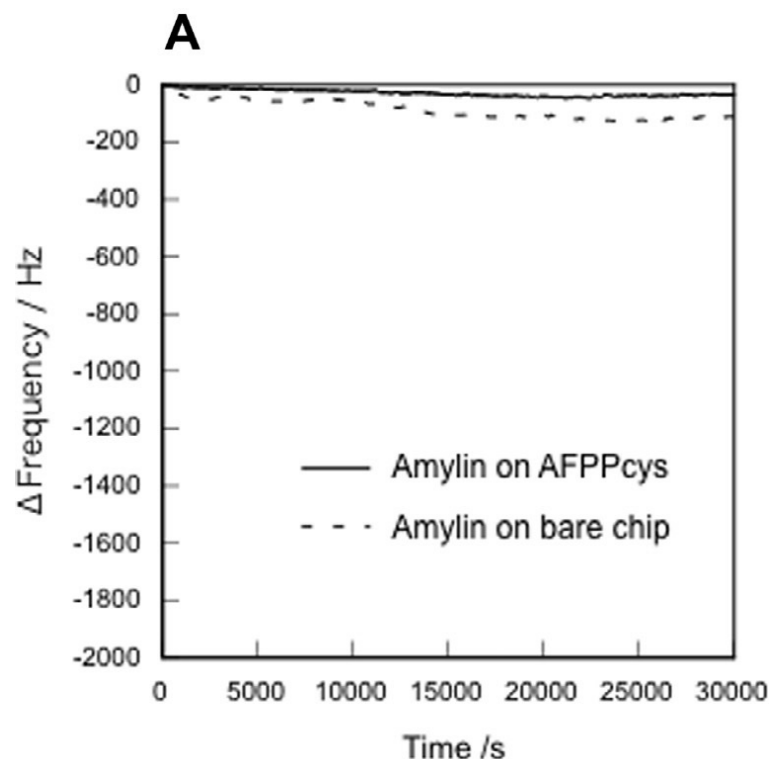


相対標準偏差 1.95 % (n=5)

NaOH : Sodium Hydroxide (水酸化ナトリウム)
EDTA : ethylenediamine-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid

AFPPは選択的にA β を凝集させる

アミロイド生成性でCu²⁺とも結合するAmylinを試料としても凝集および電流は観測されなかった



- ・ 短時間（1時間以内）に簡単にA β 40(42も)を定量可能
- ・ 電極の作成が非常に容易
- ・ 電極は洗浄により、繰り返し利用可能なので、1回あたりのコストを低下させることができる
- ・ 電気化学測定装置は質量分析計などに比べて安価であるので検査費用を下げることも可能
- ・ 現在は、改良が進み、血中A β を測定できる感度に達している

1. 健康診断の1項目として、血漿中A β 量の経時変化記録

- ・多くの対象者に対して、アルツハイマー病発症リスクのスクリーニングに

2. 家庭用アミロイド測定器

- ・将来的には血糖値センサのように小型化することで、個人が家庭で測定できるように

- ・ 血漿中の夾雑物の影響の排除
- ・ 電気化学測定の実定性
- ・ 測定の自動化

● 下記に関連する技術をもつ企業との共同研究を希望

- ・ 血液処理

ある特定の成分のみを取り出す、または除去する技術

- ・ 電気化学センサ

電極の安定、ノイズの低減など

- ・ 自動送液システム

複数の液を検出用セルに送液、排出する技術

- ・ 発明の名称 : アミロイド β ペプチドを電気化学的に測定するためのバイオセンサ
- ・ 出願番号 : 特願2015-60724
特許第6630972号
- ・ 出願人 : 学校法人甲南学園
- ・ 発明者 : 藤井敏司

甲南大学 フロンティア研究推進機構

TEL : 078-441-4547
FAX : 078-435-2324
e-mail : sangaku@ml.konan-u.ac.jp