

変異 Cu/Zn SOD の運動ニューロン傷害機構に関する研究

中野 亮一 菊川 公紀 小出 隆司
犬塚 貴 辻 省次

はじめに

家族性 ALS の約 20% は Cu/Zn SOD 遺伝子(SOD1)変異が原因である。この遺伝子変異による運動ニューロンの変性メカニズムについては、変異蛋白が獲得した何らかの細胞障害機能が重要と考えられており、その本態について様々な仮説が提唱されているものの、未だに不明である。

われわれは平成8年度の本学会において、紀伊半島およびその周辺地域の ALS 症例で SOD1 遺伝子変異の解析を行い、独立した2家系において Ile113Thr 変異を見いだして報告した。このうちの1家系1例は剖検例であったが、病理学的に多数の spheroid や argyrophilic inclusion が存在し、残存運動ニューロンにニューロフィラメントの著明な蓄積を認めた。欧米でも Ile113Thr 変異で著明なニューロフィラメントの蓄積を認めた剖検例が報告されていることから、この変異 Cu/Zn SOD タンパクがニューロフィラメントの蓄積を生じるメカニズムが解明されれば、孤発例の ALS の病因解明にも寄与する可能性があり、興味深い変異である。

平成9年度は、以前に報告した Ala4Thr 変異で、残存運動ニューロン内に Lewy body-like inclusion が認められ、この inclusion が抗 Cu/Zn SOD 抗体陽性であること、Ala4Thr 変異以外にも同様の inclusion を認める変異が報告されていることから、変異 Cu/Zn SOD が細胞内で凝集、沈着する可能性を考えて培養細胞系を用いて検討した。Ala4Thr, Gly85Arg, Gly93Ala, d126p(exon5 の2塩基欠失)の各変異タンパクを COS7 細胞中に一過性発現させると、発現ベクターのトランスフェクション後 24-48 時間で、細胞質内に顆粒状構造物(細胞質 aggregate)を多数認めるようになり、細胞は萎縮した。このような変化は野生型の Cu/Zn SOD タンパクを発現させた場合には全く認められなかった。

以上を背景として、変異 Cu/Zn SOD による運動ニューロンの変性メカニズムを解明するには細胞内の異常構造物についての研究が重要と考えられるが、これまでに作製された 4 種類(Gly93Ala¹⁾、Gly86Arg²⁾、Gly85Arg³⁾、

Gly37Arg⁴⁾の変異 Cu/Zn SOD トランスジェニック(TG)マウスはいずれもヒトの家族性 ALS とは必ずしも病理所見が同一でないこと、これらの変異を有する実際の患者の病理所見の報告がなく、マウスとヒトの病理所見の対応が不明であることなどの問題があった。そこで、われわれが経験し、病理所見が判明している上記の2種類の変異(Ile113Thr 変異、Ala4Thr 変異)が神経細胞の変性機構の解析に有用と思われる、現在、TG マウスの作製を試みており、本年度はその途中経過を報告する。

方 法

1) 導入遺伝子をヒト SOD1 cDNA を用いた系

ヒト SOD1 cDNA に PCR を用いて変異を導入した後、プラスミドベクター(PCAGGS)のサイトメガロウイルス IE エンハンサーとチキン β -アクチンプロモーター下にクローニングし(図1)、PstI、SalI でベクター骨格を除いた直鎖状 DNA とし、BDF1 マウスの受精卵雄性前核にマイクロインジェクション法により注入した。受精卵は仮親マウスの卵管に移入した。得られたマウスは、尻尾よりゲノム DNA を抽出し、SOD1 cDNA をプローブとして genomic Southern blot 解析を行った。導入遺伝子の有無を確認後、F1 マウスの脳、肝、腎より RNA を抽出し、RT-PCR により mRNA の発現を確認した。mRNA の発現量を確認

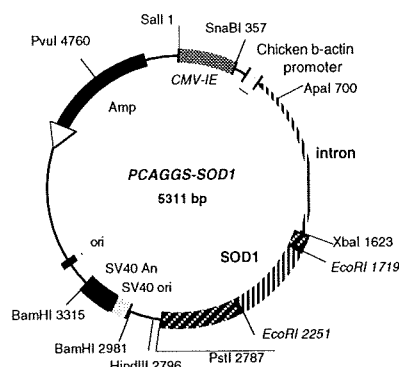


図1 導入 cDNA のクローニングベクターの構造

はNorthern blotと、ABI 7700を用いたRT-PCRにより、導入遺伝子由来のmRNAと内在性マウスmRNA量を特異的に増幅して半定量した。導入遺伝子産物の発現の確認はWestern blotにより行った。

2) 導入遺伝子をヒト SOD1 ゲノム DNA を用いた系

プロモーター領域を含むヒト SOD1 ゲノム遺伝子(全長約12kbp; 図2)にKunkel法で遺伝子変異を導入して、BDF1マウスの受精卵雄性前核にマイクロインジェクション法により注入し、cDNAの系と同様にBDF1マウスの受精卵雄性前核にマイクロインジェクション法により注入した。得られたマウスは、genomic Southern blot、RT-PCR、Western blotにより解析した。

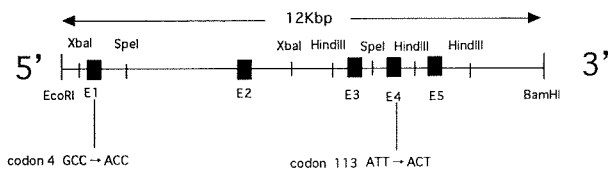


図2 導入SOD1ゲノムDNA構造

結果

1) 導入遺伝子をヒト SOD1 cDNA を用いた系

野生型は191個のマイクロインジェクションで6匹、Ala4Thr変異は155個のインジェクションで13匹、Ile113Thr変異は161個のインジェクションで6匹のfounderが得られた。これらのfounderのgenomic Southern解析では導入遺伝子がsingle copyのものが25匹中12匹、2-10コピー10匹、10-50コピー2匹、50コピー以上1匹とmulti-copyの個体も得られた(図3)。RT-PCRではAla4Thr変異、Ile113Thr変異TGマウスの脳、肝、腎いずれの臓器でも陽性バンドが確認でき、mRNAの発現が確認された(図4)。

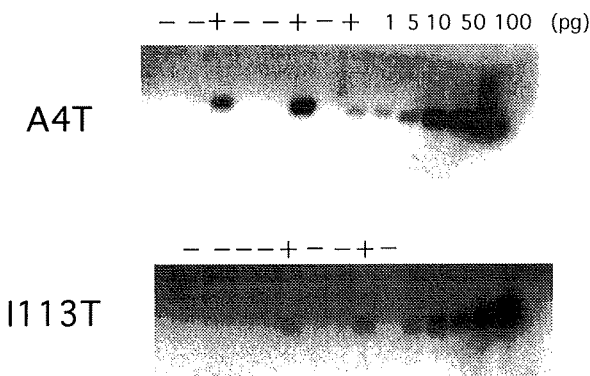


図3 SOD1 cDNA を導入して得られたTGマウスのSouthern blot解析

さらに抗ヒト Cu/Zn SOD に対するポリクロナール抗体(大阪大学医学部生化学教室の藤井先生より御供与)を用いたWestern blotではIle113Thr変異TGマウスの一部のみに肝、腎でコントロールのヒトCu/Zn SODと同じサイズに非常に薄いバンドが得られたものの、神経系での導入遺伝子産物の発現は確認できなかった(図5)。

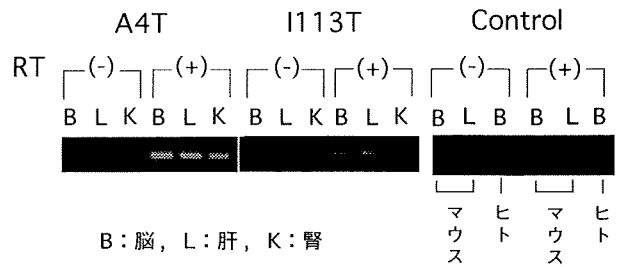


図4 SOD1 cDNA を導入して得られたTGマウスのRT-PCR

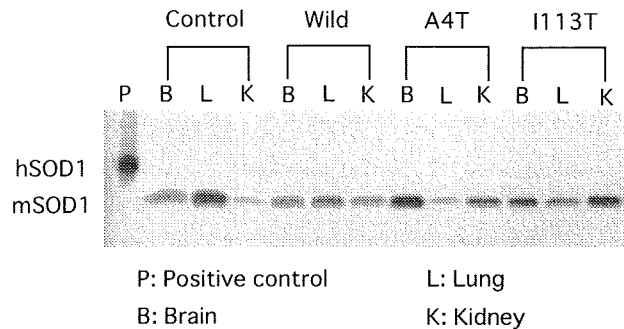


図5 SOD1 cDNA を導入して得られたTGマウスのWestern blot解析

また、すべてのTGマウスについて最長20ヶ月の経過観察でも表現型は得られていない。その原因として、mRNAが低発現である可能性を考えたが、Northern blot及びABI 7700によるRT-PCRから、ヒト SOD1 cDNA を導入遺伝子とした系では脳、肝、腎いずれの臓器でもヒト SOD1 mRNAがマウス内在性SOD1 mRNAと少なくとも同レベル以上に発現していることが確認された。

2) 導入遺伝子をヒト SOD1 ゲノム DNA を用いた系

そこで、より確実な発現が期待できるヒトゲノム SOD1 を導入したTGマウスを作製し、現在、Ile113Thr変異マウスが3ライン得られた。そのF1マウスを用いたRT-PCRでは脳、肝、腎いずれの臓器でもmRNAが発現していた(図6)。

さらに Western blot により内在性マウス Cu/Zn SOD の 1-2 倍の導入遺伝子産物の発現が確認された (図 7)。

考 察

ヒト SOD1 cDNA を導入遺伝子に用いた系で、十分な m-RNA の発現が確認されたにもかかわらず、導入遺伝子産物が得られなかった原因として、導入遺伝子に何らかの変異が生じて、機能しない mRNA ができてしまった可能性、あるいは、イントロン構造を持たない cDNA を用いたために核内で合成された mRNA がタンパク合成の場である核外へうまく移動できないことなどが考えられた。前者については作製されたすべてのラインのマウスで同様の現象が生じていることから極めて考えにくい。一方、後者については、導入遺伝子から転写された mRNA が核外に出るためには、イントロン構造が除去される splicing が重要であると言われており^{5,6)}、実際に導入遺伝子をイントロン構造をもったゲノム遺伝子に変更したところ遺伝子産物の発現が確認できたことなどから、可能性が高いと思われた。今回得られた TG マウスは変異蛋白の発現量がこれまで報告されている TG マウスと比較して生理的なレベルに近く、神経細胞の傷害機構の解析や薬剤の治療効果の判定にはより有用なマウスである可能性があり、現在慎重に経過を観察中である。

文 献

- 1) Gurney ME, et al: Science 264: 1772-1775, 1994.
- 2) Ripps ME et al: Proc Natl Acad Sci USA 92: 689-693, 1995.
- 3) Bruijn LI et al: Neuron 18: 327-338, 1997.
- 4) Wong PC et al: Neuron 14: 1105-1116, 1995.
- 5) Brinster RL, et al: Proc Natl Acad Sci USA 85:836-840, 1988.
- 6) Choi T, et al: Mol. Cell. Biol 11: 3070-3074, 1991.

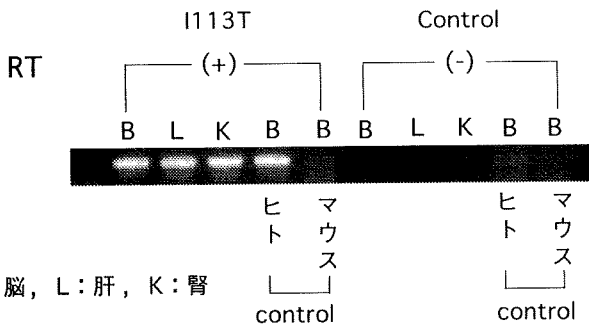


図 6 SOD1 ゲノム遺伝子を導入して得られた TG マウスの RT-PCR 解析

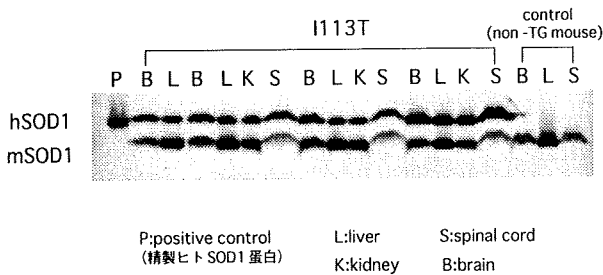


図 7 SOD1 ゲノム遺伝子を導入して得られた TG マウスの Western blot 解析

分子インデックス法による筋萎縮性側索硬化症病態関連分子の探索

道勇 学 丹羽 淳一 澤田 浩一
石垣 診祐 加藤 菊也* 祖父 江元

はじめに

神経変性疾患は神経細胞の系統選択的な細胞死をきたす疾患群である。その中でも家族性筋萎縮性側索硬化症、家族性アルツハイマー病などの単一遺伝子病の原因遺伝子あるいは多因子遺伝病の関連遺伝子が分子遺伝学的手法の進歩により同定されてきている。これらの遺伝子と各疾患の神経細胞変性、神経細胞死の分子機構との関わりについては、既知の分子を手がかりに縦断的な研究が精力的に行われているが未だ明らかとなっておらず、また孤発性の病態との関連についても不明である。一方、癌研究の分野をはじめとして疾患特異的に発現している遺伝子の同定が盛んに行われており、最近では発現遺伝子のプロファイリング技術の開発がめざましい進歩を遂げている。そこで我々はその中の有力な方法のひとつである分子インデックス法¹⁾を用いて、代表的神経変性疾患である筋萎縮性側索硬化症(ALS)およびアルツハイマー病(AD)の病変組織における遺伝子発現プロファイルを作成し、遺伝子発現の変化を横断的、且つ包括的に把握することによって両疾患の分子病態をとらえ、神経細胞変性死に関わる遺伝子を探索することを目的とした。

対象および方法

本研究の対象は、ALSおよび対照として非神経疾患患者の剖検脊髄前角組織、そしてAD剖検脳と非神経疾患患者剖検脳の側頭葉

名古屋大学医学部神経内科

* 奈良先端科学技術大学院大学ゲノム解析

皮質とした。方法は、これらの組織より抽出した total RNAをもとに二重鎖cDNAを合成し、分子インデックス法による遺伝子発現プロファイルを作成した^{1,2)}。分子インデックス法の原理は、サンプル組織における全ての発現遺伝子由来cDNAを3種類のクラスIIIS制限酵素、64種類のアダプターおよび3種類のオリゴdTプライマーを用いることによって合計576グループに重複することなくインデックス化し、その各々についてpolymerase chain reaction法(PCR)で得られた発現プロファイルをポリアクリルアミドゲル上で展開するというものである。得られた全576プロファイルは、各々疾患と正常対照との間で比較し、疾患特異的にみられるあるいは疾患で発現が著減しているフラグメントピークを選択し、クローン化した後塩基配列を決定した。得られた各フラグメントの塩基配列はデータベースをもとにその分子情報を検索するとともに、ノーザンブロット分析、ATAC-PCR³⁾、あるいは定量RT-PCRを用いてAD脳と対照脳の各5例およびALS6例と対照4例の脊髄前角について定量的スクリーニングをおこなった。また未知の遺伝子については、ノーザンブロット分析によりmRNAのサイズを決定するとともに、神経系組織および一般臓器における発現分布を検討した。さらに脊髄前角組織由来のmRNAから作成したcDNAおよび胎児脳由来のcDNAを基にRACE法、あるいはライブラリースクリーニングによって完全長cDNAの取得を試みた。

結果および考察

ADについては、分子インデックス法により既知、未知を含め合計94個のcDNAを選択した。その中、現在までに40個について多数例での定量スクリーニングが終了しており、正常対照脳での発現量に対するAD脳での発現比は0.1-14であった。この中には既知のESTが9個、全く未知のcDNAが11個含まれており、現在5つの既知ESTについて完全長cDNAの取得を試みている。そしてこれまでに全長が約1.5kbのcDNAを取得、この全塩基配列を決定した。この遺伝子は、255アミノ酸、推定分子量が約26kDのORFをもち、なかにロイシンジッパー構造のモチーフとそれに続くプロリンが豊富な配列をもった新規遺伝子であった。ノーザンブロット分析では、大脳皮質特異的でなく一般臓器においても広く発現が見られ、特に骨格筋、心筋での発現が豊富であった。この遺伝子の機能については、ロイシンジッパー構造の部分でのホモログはいくつかみられるが^{4,5)}、それ以外では特異な類似分子はみあたらず全く不明である。ただしプロリンが豊富な配列にPXXPのパターンが見られることから、この部位にSH3のドメインをもった他の分子が結合する可能性があり、細胞内での情報伝達に関わるものかもしれない^{6,7)}。またこの遺伝子の発現をノーザンブロット分析で検討すると、AD症例の大脳皮質において明らかに低下しており、今後この遺伝子の機能、特に神経系組織における機能、さらにはADの病態への関与についての詳細な検討が急がれる。

ALSについては全576プロファイリングについての比較検討により合計84個のcDNAを選択し、今年度までに全てのcDNAフラグメントについて塩基配列を決定した。その中これまでに13個についてALS6例、正常対照4例での定量スクリーニングが終了した。その結果、正常対照脊髄前角での発現量に対するALS脊髄前角での発現比は0.1-10の範囲に分散しており、これらの中にALSの病態に関わって変化しているものが少なからず存在し

ていると考えられる。

ALSの病態に関わる未知の遺伝子の探索は、現在5つのcDNAについて完全長cDNAの取得を試みている。BsmA I / 61Cは、正常対照脊髄前角組織のプロファイル由来で塩基配列が全く未知のcDNA断片であり、分子インデックス法によって得られた114bpをもとに5'RACEを行い、現在910bpのcDNAを取得している。このcDNAをプローブとして行ったノーザンブロット分析では、正常対照の脊髄および脳のみ特異的に約4kbのトランスクリプトが明らかに認められ、各種一般臓器、あるいはALS脊髄では有意な発現は確認できなかった。さらに脊髄前角より、レーザーマイクロダイセクション法 (ZEISS社、PALM) を用いて前角運動ニューロンを20個ピックアップしてRNAを抽出後RT-PCRを行い、BsmA I / 61Cが確かに脊髄前角ニューロンで発現していることを確認した。これらのことよりこのBsmA I / 61Cがニューロンの機能に深く関わる新規の特異的遺伝子である可能性が示唆され、しかもALS6例、正常対照4例で行った定量RT-PCRでの検討では、正常対照に比べALS脊髄前角組織での発現が1/10に低下していたことから、ALSの病態、運動ニューロン死の機序を解明する上において重要な遺伝子 (分子) である可能性が考えられる。

またFok I / 3Gは、正常対照脊髄前角より得られた118bpのcDNAであり、しかも既知のより長い約500bpのESTに合致したため、これをプローブとしてノーザンブロット分析を行い、5.5kb付近に2つのトランスクリプトが確認された。さらにこのESTをもとに5'RACEを行い、さらに長い1.8kbのcDNAを取得した。この塩基配列を検討したところ、これまで約4kbと報告されていた既知のヒト膜蛋白分子の未知の3'-UTRであることが判明した。この膜蛋白分子の神経系における機能については今のところ明らかではない。しかも先のノーザンブロット分析の結果では末梢神経での発現は見られず、神経細胞体の存在する脊髄灰白質、大脳皮質、交感神経節、

後根神経節において有意な発現がみられていることから、この分子の神経系における機能を検討することはALSの病態解明にとって新たな一助となるかもしれない。

現在これら2つのcDNA以外にも、ノーザンブロット分析においてALS脊髄前角にのみ5kbのmRNAが見られるBsmF I / 39A、脊髄および大脳にのみ10kbのバンドを持つBsm A I / 5Cなどについても完全長cDNAの取得を試みており、今後これらの遺伝子が明らかとなることはALSの分子病態にとって重要な布石となると考える。

文 献

- 1) Kato K: Nucleic Acids Res 23: 3685-3690, 1995
- 2) Kato K: Nucleic Acids Res 24: 394-395, 1996
- 3) Kato K: Nucleic Acids Res 25: 4694-4696, 1997
- 4) Komarnitsski SI et al: Mol Cell Biol 18: 2100-2107, 1998
- 5) Luca FC et al: Mol Biol Cell 9: 29-46, 1998
- 6) Wang B et al: J Biol Chem 272: 17542-17550, 1997
- 7) Nakamura T et al: J Biol Chem 273: 6960-6967, 1998

紀伊半島の筋萎縮性側索硬化症とパーキンソン痴呆複合 (ALS/PDC) におけるタウ遺伝子多型とタウ遺伝子変異の検討

佐々木良元, 伊藤 伸朗, 葛原 茂樹

はじめに

紀伊半島, グアム島, 西ニューギニアを含む西太平洋地域には, 筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis ; ALS) とパーキンソン痴呆複合

(parkinsonism-dementia complex ; PDC) の多発地域が存在することが知られている。この ALS/PDC の特徴は, ①特定地域に集積して多発する, ②家族内発症が多い, ③中枢神経系にアルツハイマー神経原線維変化 (NFT) が多発する, ということである。その原因として, 従来から環境因子 (水質, 食物など) と遺伝素因の 2 つが推定されてきたが, 未だ不明のまま, グアム島では発症頻度が激減したと考えられていた (1)。しかし, 我々は, 多発地区の 1 つである穂原地区の実態調査によって, ALS の持続出現を認めたので, より徹底した臨床疫学的調査を実施し, ALS の高頻度発生の持続, 同地域に多数の PDC の存在, 穂原地区 ALS と PDC の剖検例を確認した。

最近, タウ遺伝子多型が病理学的にアルツハイマー神経原線維変化を特徴とする進行性核上性麻痺 (PSP) の遺伝学的危険因子であることが報告された (2-4)。また, 17 番染色体に連鎖する前頭側頭葉型痴呆

(frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17) においてタウ遺伝子変異が明らかにされた (5-7)。両疾患とも ALS/PDC と臨床的, 病理学的に共通する特徴を有するので, 紀伊半島の ALS/PDC 患者において, タウ遺伝子多型とタウ遺伝子変異を検討した。

対象と方法

対象は, 三重県が多発地区に在住あるいは出身の ALS/PDC 患者 12 例で, 内訳は ALS 3 例, 痴呆を伴う ALS 1 例, PDC-ALS 2 例, PDC 6 例である。タウ遺伝子多型の検討では, 本研究の目的を説明し同意を得て採血した健常日本人 359 名 (男性 135 名, 女性 224 名, 平均年齢 58.4±11.1 歳) を健常対照とした。方法は, ALS/PDC 患者 12 例と健常対照 359 名の血液からゲノム DNA を抽出し, 既報の方法を用いてタウ遺伝子多型を決定した

(2)。タウ遺伝子変異については, 全てのエクソンを single strand conformation polymorphism (SSCP) 解析でスクリーニングし, FTDP-17 で変異が発見されている

部分については, 直接塩基配列決定法でも解析した。

結果

タウ遺伝子多型の検討では, ALS/PDC 発症者の全例が 11 リピートのホモ接合子であったが, 健常対照の 90% 以上が 11 リピートのホモ接合子であった (表)。タウ遺伝子変異の検討では, SSCP 解析では全例でどのエクソンにも異常バンドは認められず, 直接塩基配列決定法でもタウ遺伝子変異は認められなかった。

考察

本研究で検索した範囲には, 紀伊半島の ALS/PDC にタウ遺伝子の関与は確認されなかった。

ALS/PDC は中枢神経系に NFT が多発するという点で PSP に類似する。欧米における PSP のタウ遺伝子多型の検討では, イントロン 10 に位置する 2 塩基繰り返し配列数が 11 であることが危険因子であると報告されている (2-4)。しかし, グアム島の PDC の検討では, 発症者とコントロールで 11 リピートを有する割合に有意差は認められていない (2)。我々の検討では, ALS/PDC 発症者の全例が 11 リピートのホモ接合子であったが, 健常者の 90% 以上が 11 リピートのホモ接合子であったので, タウ遺伝子多型は ALS/PDC の遺伝素因である可能性は低いと考えた。日本人のタウ遺伝子多型の検討でも, ほとんどの日本人が 11 リピートのホモ接合子であることが報告されている (8, 9)。

FTDP-17 は常染色体優性遺伝形式をとり前頭側頭葉型痴呆を呈する疾患で, パーキンソニズムや筋萎縮を伴うことがある。病理学的には異常タウ蛋白の沈着を特徴とし, タウ遺伝子のエクソン 9-13 に変異が発見されている (5-7)。FTDP-17 の臨床的, 病理学的特徴は ALS/PDC に類似することからタウ遺伝子変異を検討したが, すべてのエクソンに変異は認められなかった。

文献

1. Garruto RM et al. Neurology 35:193-198,1985
2. Conrad C et al. Ann Neurol 41:277-281,1997
3. Higgins JJ et al. Neurology 50: 270-273, 1998
4. Oliva R et al. Arch Neurol 55:1122-1124,1998

5. Hutton M et al. Nature 393:702-705,1998
6. Proorkaj P et al. Ann Neurol 43:815-825,1998
7. Spillantini MG et al. Proc Natl Acad Sci USA
95:7737-7741,1998
8. Conrad C et al. Neurosci Lett 250:135-137,1998
9. Okuizumi K et al. Ann Neurol 707-708,1998

表 紀伊半島の ALS/PDC におけるタウ遺伝子多型

リピート数	10,10	10,11	11,11	11,12	11,13
ALS/PDC (n=12)	0 0.0%	0 0.0%	12 100%	0 0.0%	0 0.0%
コントロール (n=359)	1 0.3%	14 3.9%	336 93.6%	4 1.1%	4 1.1%

紀伊半島の筋萎縮性側索硬化症/パーキンソン痴呆複合 (ALS/PDC)

—最近の疫学像と臨床的病理学的疾患概念—

葛原茂樹, 成田有吾, 小久保康昌, 佐々木良元

研究の背景と目的

紀伊半島南部の熊野灘に面する山岳地帯には、戦後の疫学調査 (1, 2) によって、グアム島と並んで、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) が他地域の 50-100 倍の高率に発生する地域があることが知られている (3)。また、この地域には、アルツハイマー神経原線維変化 (NFT) の多発を特徴とするパーキンソン痴呆複合 (PDC) という地域特異性のある疾患も多発する (4, 5)。ALS/PDC の原因は精力的な研究にもかかわらず未だ明らかでない。ところが、グアム島では 1960 年代をピークにして ALS と PDC の発生が激減し、1980 年代には他地域の数倍のレベルに減少したことが報告された (6)。紀伊半島でも 1981 年以降はかつての多発地域の古座川と穂原において、新規発生がないことが報告された (7) 結果、グアム島と紀伊半島では ALS/PDC が消滅しつつあると考えられるに至った。しかし、我々 (8, 9) は 1993 年以降に穂原地区からの ALS の持続発生を観察し、この疾患が消滅していないことを確認した。

本研究の目的は、①地域に立脚した完全な疫学調査により、ALS/PDC の正確な発生状況を把握すること、②剖検例がないためにその存在が未確認であった PDC が、本当に紀伊半島にも存在するかどうかを確認すること、③それを通じて、紀伊半島の ALS/PDC の最近の疫学的動向と、本症の臨床医学的・病理学的本態と疾病概念を明らかにすることである。

対象と方法

1) 有病率と発生率の調査

a. 全戸訪問調査。行政当局と地区住民の理解と協力を得て、穂原地区 (1998 年時点で人口約 1450 人、450 戸) の全住民を対象に、健康状態調査を戸別訪問によって実施した (実施は 1997-98 年)。

b. 医療・福祉施設の病歴調査と患者検診。併せて、1985 年前後以降の医療・福祉施設の病歴調査によって疑い例を抽出した後に、病歴検討や診察により診断を確定して患者数を決定した。判明した患者の臨床症状を、離村者からの発症例も含めて検討した。

2) 病理学的検討

ALS/PDC の神経病理学的所見を明らかにするために、積極的に剖検を依頼するとともに、多発地域に近い三重県中南部の病院に保存されている過去の剖検例を見直した。

3) 臨床的特徴の検討

1985 年以降の発症者について、患者の背景と臨床症状の特徴を検討した。

結果と考察

1) ALS/PDC 粗有病率 (10 万人あたり)

表 1 に示すように、1998 年 1 月現在の ALS/PDC は 12 例 (800/10 万人) で、1969 年の八瀬ら (2) の調査時の、住民数 2050 名中 8 例 (388/10 万人) に比較して増加していた。また、ALS と ALS 徴候が明白な PDC を合わせた患者数も、1969 年当時の 4 例から 7 例へと増加していた。

2) ALS 粗発生率 (5 年平均で示した年間発生数/10 万人あたり)

通常の ALS と、PDC に明瞭な ALS 症状を合併した症例を併せたものを全 ALS として、図 1 に示す。1984 年以前と古座川地区のデータは、八瀬らの和歌山県立医科大学グループの発表 (7, 10, 11) からの引用である。年間発生率は、八瀬らの調査時の 1960-84 年は 14-49 であったのに対して、我々が調査した 1985-97 年 (3 年間平均) は 12-87 (PDC 先行例を含む) で、不変～増加であった。とくに、1990 年以降は激増して見えるが、これは調査を徹底したことによる見かけ上の増加と推定される。したがって、ALS の発生率は、1960 年代から今日まで、ほとんど変わらずに高発生率を維持していると考えられる。

3) 剖検例による PDC の存在の確認

剖検例は自験の 2 例を含め、5 例を確認した。臨床診断は、ALS が 2 例、PDC が 1 例、ALS/PDC 合併例が 2 例であった。PDC 例では、側頭葉、黒質、青斑核を中心に、高度の神経細胞脱落と多数の NFT を認め (図 2)、グアム島の PDC (5) と同じ所見であった。ALS 症状があるものではこれに ALS 病変が加わっていた。生前に痴呆を認めなかった例では大脳と脳幹の細胞脱落が軽度で NFT の出現量が少なかった。

4) 臨床的特徴の検討 (表 2)

(1) 1985-1998 年までの発症者の内訳。穂原地区住民からの発症は 17 例 (うち 2 例は近隣からの転入者)、同地区からの他地域への離村者からは 4 例で、離村後 60 年以上を経て発症した例もあった。

(2) 性比。女性が多かった。

(3) 家族歴。21 例の中で、15 例 (71%) が近親者に ALS か PDC の発症があった。

(4) 臨床像。初発症状は ALS 症状、パーキンソニズム、痴呆のいずれかで、最終像はこれらの組み合わせであった。臨床病型は図 3 に示すように、最後まで ALS のみであったのが 7 例、痴呆から始まり ALS になったのが 3 例、痴呆かパーキンソニズムから始まり PDC になったものが 11 例で、そのうちの 4 例は最終的には ALS 症状が出現した。

結論

グアム島と紀伊半島の ALS/PDC 多発地域では 1980 年以降の発生率激減が報告されている (6、7) が、穂原地区の全住民を対象とした調査によって、今なお高い発生率が持続していることが明らかになった。また、自験例と過去の剖検例の再調査を通じて、この地域にはグアム島の PDC (5) と同じ病理所見を呈する PDC 例が存在することを初めて確認した。穂原地区の ALS/PDC の特徴は、家族性発症が極めて高率であること、同一患者にあるいは同一家系内に、ALS、パーキンソニズム、痴呆が様々な組み合わせで出現すること、病理所見は NFT が多発することが特徴で、臨床病型に関係なく認められ、これに ALS 病変を伴うものがあつた。これらの所見は、紀伊半島の ALS と PDC は、別々の疾患が偶然に同じ地域の同じ住民に発生したと考えるよりも、むしろ同じスペクトル上にある ALS-parkinsonism-dementia complex と見なす方が合理的であり、単一疾患の異なった表現型である可能性を示唆する。さらに、高頻度の家族性発症と長期離村者からの発生は、環境要因よりも遺伝素因の重要性を示唆しており、紀伊半島の ALS/PDC は近年注目されている familial tauopathy (12) の 1 型と見なすことができる。

文献

1. Kimura K et al. Dis Nerv Syst 24:155-159,1963
2. Shiraki H et al. In Hand book of clinical neurology (edited by Vinken PJ & Bruyn GW), North Holland, Amsterdam, 1975, vol 22, pp353-419
3. Garruto RM et al. In Hand book of clinical neurology (edited by Vinken PJ, Bruyn GW &

Klawans HL), North Holland, Amsterdam, 1991, vol 15, pp253-271

4. Hirano A et al. Brain 84:642-661,1961
5. Hirano A et al. Brain 84:662-679,1961
6. Garruto RM et al. Neurology 35:193-198,1985
7. 吉田宗平. 臨床神経 31:1310-1312,1991
8. Kuzuhara S et al. Neurology 50:A173,1998
9. 葛原茂樹ほか. Dementia 10:378-390,1996
10. Uebayashi Y. In Amyotrophic lateral sclerosis. Recent advances in research and treatment. (edited by Tsubaki T. & Yase Y), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1988, pp17-23
11. 吉田宗平ほか. 神経内科 41:369-376,1994
12. Spillantini MG et al. Brain Pathol 8:387-402,1998

図 1 紀伊半島多発地区の ALS 年間発生率 (人口 10 万人当たり、5 年間ごとの平均値で示す。1995-1997 年は 3 年間の平均)

点線は和歌山県立医科大学の研究報告(16、17)から作成

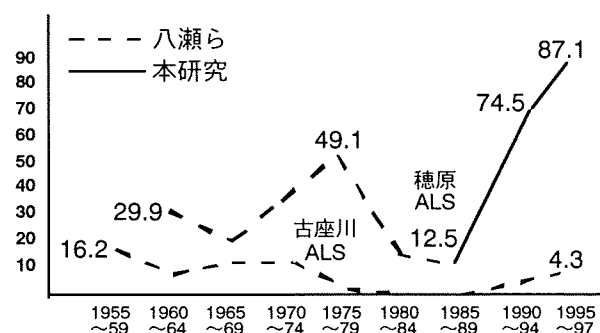


図 2 紀伊半島 PDC 患者脳の顕微鏡所見

海馬に多発する NFT と神経細胞脱落 (Bielschowski 染色、x 300)

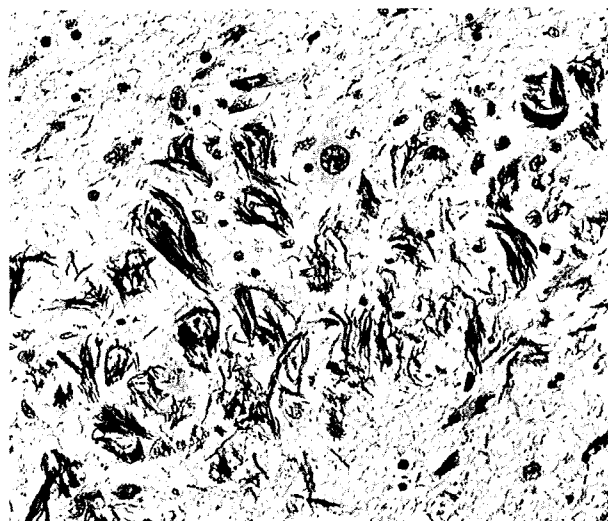


図3 紀伊半島 ALS-parkinsonism-dementia の臨床像 (1985-1998年発症の21例の特徴)

All ALS/PDC = 21 cases
 M/F = 8/13
 家族歴 (+) = 15/21(71%)
 (*): 家族歴あり

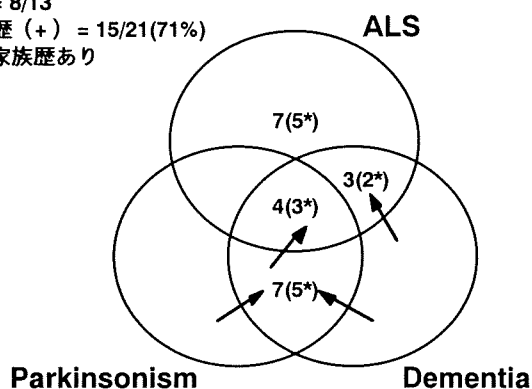


表1 紀伊半島穂原地区の ALS-parkinsonism-dementia の疫学

1. 粗有病率 (1998年1月現在, 人口1498人)		
ALS-PDC総数	12例	800/10万人
ALSのみ	2例	133/10万人
PDC-ALS	5例	333/10万人
PDC	5例	333/10万人

2. 粗発生率 (ALS+PDC-ALSの5年間の平均)		
1985-1989	1例	12.5/10万人/年
1990-1994	6例	74.5/10万人/年
1995-1997	4例	87.1/10万人/年

表2 臨床的特徴 (1985-1998年発症の21例の検討)

1 内訳	元々の住民からの発症	17例
	離村者からの発症	4例
	転入者からの発症	2例
	(両者とも近隣から)	
2 性別	男:女=8:13	
3 臨床像	ALS	7例
	PDC	7例
	PDC-ALS	7例
4 家族歴	(親子、同胞、叔父 叔母、甥姪)	15例 (71%)

痴呆を伴う運動ニューロン疾患の大脳病変

岡本 幸市¹⁾ 櫻井 篤志¹⁾ 藤田 行雄¹⁾

Safa AL-Sarraj²⁾ P.N. Leigh³⁾

はじめに

痴呆を伴う運動ニューロン疾患 (Dementia with MND; D-MND)は、運動ニューロン疾患徴候と痴呆を呈する疾患であり、本疾患と筋萎縮性側索硬化症(ALS)との関連性についてはなお不明である。D-MNDは非Alzheimer型痴呆症の病理所見を示す前頭・側頭痴呆症(Frontotemporal dementia; FTD)の1亜型に分類されているが、D-MNDとFTDとの関連性もなお不明な点が多い。今回、英国の2施設にて多数例のMNDとD-MNDを検討する機会を得た。またD-MNDの中脳黒質病変についても検討を行ったので報告する。

対象・方法

1. 英国のInstitute of Psychiatry(IOP)にて1984年1月から1998年2月までの間に剖検されたMND85例中の65例と、King's college HospitalにてLeigh教授が収集されたD-MND8例(45歳から76歳、平均61.5歳)、および自験30MND例中側頭葉病変のみられた12例について、光顕的、免疫組織学的に、一部は電顕的に検索した。IOPで臨床的・神経病理学的にMNDと診断された剖検例は85例(家族性MND3例を含む)あり、その中の65例の大脳と脊髄のパラフィン切片標本を今回検索できた。脊髄(HE染色とubiquitin免疫染色)、中脳・側頭葉・前頭葉のHE染色を主体に観察し、D-MNDが疑わしい症例では側頭葉・前頭葉の切片にubiquitin免疫染色を行った。以下の5項目を満たす症例をD-MNDの病理所見を示す例と判断した。即ち、①脊髄でBunina小体、skein-like inclusionなどALSの所見、②中脳黒質の変性、③前頭葉、側頭葉の皮質2,3層の非特異的変性、④subiculumの限局性のgliosis、⑤海馬歯状回顆粒細胞内のubiquitin陽性封入体(+)の5項目である。

1) 群馬大学医学部神経内科

2) Institute of Psychiatry(UK)

3) King's College Hospital (UK)

2. MND21例、D-MND16例、Guam島ALS5例(平野朝雄教授より)、Multiple system atrophy (MSA)7例、Parkinson病(PD)8例、一般剖検例30例の中脳黒質を含むパラフィン切片に対してHE染色のほか、neurofilament、GFAP、ubiquitin(Dako)に対する抗体と、ヒト α -synuclein¹⁾のアミノ酸残基116-131に対するポリクロナール抗体を作成し、ABC法で免疫組織染色を行った。

結果

1. 英国におけるD-MND

今回、神経病理学的に検索できた65例のMND中7例、10.8%にD-MNDに一致する病理所見が観察できた。剖検依頼書をもてみるとその中の5例で精神的変化が記載されていた。Leigh教授の8例を含め15例とも、その所見は著者らが本邦で検索してきたD-MNDとほぼ一致していた。海馬歯状回顆粒細胞内のubiquitin陽性封入体の出現頻度も症例によって差異がみられたが全例で観察された。5例のD-MNDでは、前頭葉と側頭葉の皮質2、3層において、小型神経細胞内のほかに、神経突起にもubiquitin陽性構造が少数観察された(図)。また、小型神経細胞内のubiquitin陽性封入体は核の直下から軸索近位に存在する傾向を示す例もあった。MNDの臨床所見を欠く74歳男性でFTDと診断されていた症例では、海馬歯状回顆粒細胞内にubiquitin陽性封入体のみられ、D-MNDの病理所見を呈しており、さらに前頭・側頭葉の皮質2、3層には多数のubiquitin陽性神経突起がみられた。この突起はタウ免疫染色では陰性であった。

2. 自験30MND例の側頭葉病変

4例のD-MNDを含む30例のMND例の側頭葉を前額断5mm厚間隔で切り出し、パラフィン切片を作成しH-E、K-B染色、GFAP免疫染色などを用いて検討した。30例中12例に側頭葉病変が認められた²⁾。主としてGFAP免疫染色でグリオシスの程度から病変の強さを判断すると、症例毎に病変の程度の差がみられたが、側頭極下部

内側皮質, 内嗅野, 迂回回を含む側頭葉内側面に主として認められ, 側頭極背内側皮質に特に目立つ症例はなかった. D-MNDではlimbic systemに病変が強いと考えられた.

3. 海馬支脚に限局するグリオーシス

D-MNDで海馬足レベルの海馬CA1一支脚移行部の限局性錐体細胞消失とグリオーシスは, 我々の12例全例でも観察できた²⁾. 5mm厚間隔で切り出したパラフィン切片のGFAP免疫染色でその分布を調べたところ, 海馬支脚のグリオーシスは前方から後方に移行するに従い, CA1に近い部位からprosubiculumの方に漸次移行していることが明らかとなった. また病変のみられる海馬支脚では, グリオーシスはstratum lacunosumにも及んでいた.

4. D-MNDの中脳黒質病変

MND例では中脳黒質にはわずかに遊離メラニンが散在性にみられる程度であったが, D-MND16例では, 全例で軽度から中等度の神経細胞脱落と遊離メラニンの存在, グリオーシスが観察された. 神経細胞の脱落は内側から外側にかけてほぼ同程度であり, 特に脱落の強い部位を指摘できなかった. 今回作成した抗ヒト α -synuclein抗体による検討では, PD例ではLewy小体と神経突起が陽性所見を示し, MSA例ではoligodendrocyte内の封入体が陽性であったが, D-MNDとGuam島ALS例では α -synucleinに陽性所見を示す構造はみられなかった. また, ubiquitin免疫染色で陽性所見を呈する Marinesco小体と黒質神経細胞内のエオジン好性小顆粒は α -synuclein免疫染色では陰性であった.

考 察

自験例では30例中の12例に側頭葉病変がみられたが²⁾, 今回検索できた英国例のMNDでも約10%に神経病理学的にD-MNDの所見を呈する例があり, 英国でもD-MNDは少なからず存在するものと思われた. D-MNDの認識はまだ少なく, D-MNDと診断されていたのは1例のみであった. 1例では多数の老人斑と, 軽度から中等度の神経原線維変化がみられており, Alzheimer病の合併と診断されていた. また, 英国では人工呼吸器の装着は行われず, 死後1日から3日後に剖検される例が多く, 自験例に比べると死後変化が強い印象があった. そのため, 前角細胞もやや萎縮し濃染する傾向があり, HE染色では

Bunina小体は見づらい印象があった.

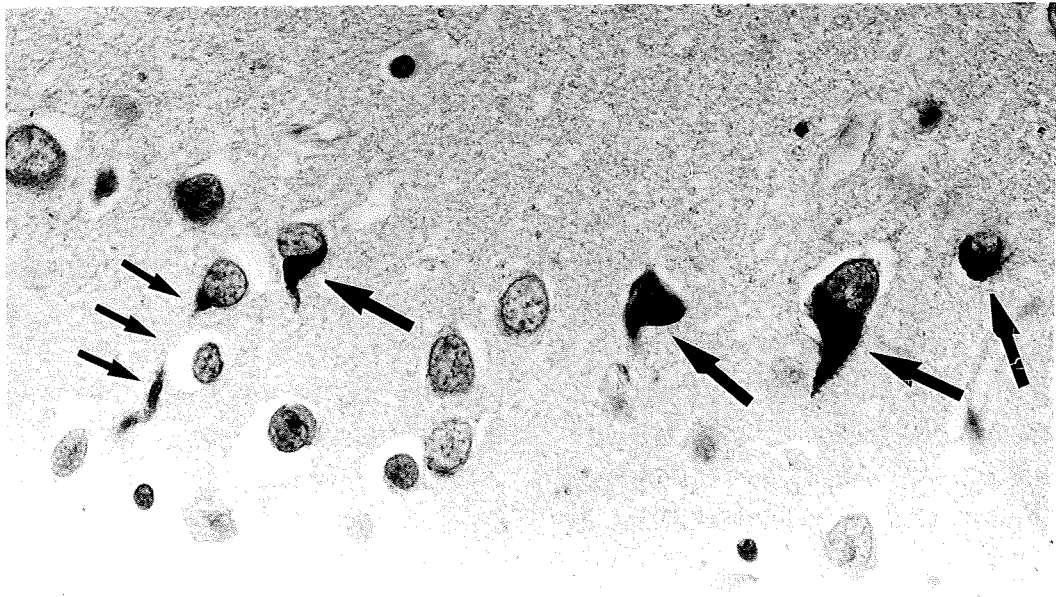
FTDの剖検例は十分検索できなかったが, 1例でD-MNDに一致する病理所見と大脳皮質に多数のubiquitin陽性神経突起もみられた. これはTolnayら³⁾が報告した所見と同様である. 出現頻度は少ないが, 類似のubiquitin陽性神経突起はD-MNDの5例でもみられた. またD-MNDの症例によっては, 大脳皮質のubiquitin陽性封入体は, 核の直下から軸索にかけて存在しており, 細胞の機能障害を考える上で重要と思われた.

中野ら⁴⁾は, D-MNDで海馬足レベルの海馬CA1一支脚移行部の限局性錐体細胞消失とグリオーシスがD-MNDの全例にみられることを指摘した. ヒトでの貫通線維の走行は必ずしも明らかになっていないが, 内嗅野の第2~3層にも強い変性所見がみられることと, 海馬支脚での変性部位が移動していることより, 著者らはこの病変は貫通線維の変性ではないかと推論している²⁾. 大半の大脳皮質から海馬に至る経路は, 内嗅野でニューロンを変える⁵⁾. 内嗅野からは貫通線維として海馬支脚を経て海馬に至る. この経路の変性はD-MNDの知的機能障害に重要な役割を果たしているものと考えられる. 同様の海馬支脚の病変はAlzheimer病でもみられている⁶⁾.

D-MNDでは黒質の変性がみられることは以前より指摘されていたが, その病的意義についてはなお不明である. 臨床的にParkinson症状を呈した症例の報告もほとんどみられていない. 一般にPDでは黒質病変は腹外側に強いと指摘されている. D-MNDでは三山らは腹内側に強いと記載している⁷⁾. 今回の検討では, 症例毎に剖面レベルが異なり, 詳細な検討はまだできていないが, 内側から外側にかけてほぼ同程度の病変のように思われる症例が多い印象であった. さらに詳細な検討が必要である.

近年, PDでの α -synucleinの異常が目目されている. 免疫染色では, PDではLewy小体以外に神経突起の一部も陽性所見を呈すること, またMSAでのoligodendrocyte内の封入体も陽性所見を呈することが明らかにされている⁸⁾. 今回の検討ではGuam島ALSやD-MND例では α -synuclein陽性の封入体や神経突起はみられず, PDとは異なる変性過程が示唆された.

また, MNDの2例で多数のLewy小体が観察された. その中の一例では臨床的にもParkinson徴候が観察され



D-MND例の前頭葉皮質2~3層. 小型の神経細胞の核の直下から近位軸索内にubiquitin陽性構造物がみられる(矢印). 一部は軸索内に連続的に延びている(小矢印).
(ubiquitin免疫染色+hematoxylin染色, 100倍)

ており, 大脳皮質にも少数の皮質型Lewy小体が見られた. MNDでのLewy小体の出現率は低く, 偶然の合併と考えられた.

まとめ

英国でもD-MNDは稀ならず観察された. D-MNDで見られる海馬支脚の変性は貫通線維の2次変性が示唆された. D-MNDでは黒質に軽度から中等度の変性所見が見られるが, α -synuclein陽性の封入体や神経突起は見られず, PDとは異なる変性過程が示唆された.

文献

- 1) Jakes R et al : FEBS Lett 345:27-32, 1994
- 2) Okamoto K : Neuropathol 18:222-227, 1998
- 3) Tolnay M et al : Neuropathol Appl Neurobiol 21: 492-497, 1995
- 4) Nakano I : T Neuropathol 13:215-227, 1993
- 5) Carpenter MB : Human Neuroanatomy, 7th ed, Williams and Wilkins, Baltimore, 536-539, 1976
- 6) Mizutani T et al : Neurosci Lett 184:141-144, 1995
- 7) 三山吉夫 : Dementia 10:423-429, 1996
- 8) Tu P-H et al : Ann Neurol 44:415-422, 1998

運動ニューロン疾患患者における事象関連電位の検討

中村重信、中野葉子、大下智彦、加世田ゆみ子

目的

運動ニューロン疾患 (MND) では、一般に知的機能は最後まで保たれるとされているが、一部の患者は特徴的な痴呆を呈し、痴呆を伴う ALS (ALS with dementia) と呼ばれている¹⁾²⁾。また、MND では、球症状、運動機能障害などにより、詳細な知的機能の評価が困難であることが多く、電気生理学的手法などを用いた客観的評価が有用と考えられる。

今回、私達は、運動ニューロン疾患患者で聴覚および視覚性事象関連電位により認知機能を評価し、臨床所見、知的機能、画像所見との関連を比較検討したので報告する。

対象および方法

運動ニューロン疾患患者 10 名 (男/女=3/7、平均年齢 63.1±9.0 才、平均罹病期間 16.8±10.4 ヶ月) を対象とし、DSM-IV の診断基準に基づいて痴呆の有無を検討し、改訂版長谷川式簡易知能スケール、事象関連電位、頭部 MRI、SPECT の検査を施行した。

事象関連電位の記録には、視覚性および聴覚性オドボール課題 (標的刺激 20%、非標的刺激 80%) を用いた。視覚性課題では刺激間隔は 2 秒、刺激提示時間は 0.5 秒とし、図形、ひらがな、漢字の 3 種類の課題を用いた。聴覚性課題では標的刺激 2000Hz、非標的刺激は 1000Hz の音を用いた。加算回数は視覚刺激性課題で 20 回、聴覚刺激は 30 回加算とした。被検者には標的刺激の数を数えて頂き、視覚性課題ではボタン押しも施行した (表 1)。活性電極を Fz、Cz、Pz、基準電極を A1+A2 とし Bandpass は 0.05-60Hz、電極抵抗は 10k Ω 以下とした。Pz で P300 潜時を計測し、5 例では活性電極を 21 個とし、P300 成分の頭皮上分布も検討した。P300 潜時が年齢から計算した平均値+2SD (標準偏差) を超えている場合に延長と判定した³⁾。

結果

ICD-10 の診断基準では、10 例中 2 例に軽度から中程度の痴呆を認めた。症例 1 では意欲低下、症例 2 では物忘れ、感情失禁、失見当識を認めた。症例 3 では明らかな痴呆は認めなかったが、軽度の失見当識を認めた。

痴呆を認めた症例では、課題の種類により P300 の所見が異なっていた。症例 1 では視覚性 P300 は誘発されず、聴覚性 P300 の潜時が延長し、振幅は低下しており、頭皮上分布は前頭部優位であった。症例 2 ではひらがな、漢字を用いた P300 潜時は正常であったが、他の課題では P300 が誘発されなかった。症例 1 と症例 2 では頭部 MRI にて前頭葉、側頭葉内側面が萎縮しており、SPECT にても同部位の集積低下がみられた。

症例 3,4,5 では臨床的には痴呆は明らかではなかったが、症例 3 と症例 5 では聴覚性 P300 の潜時が延長しており、症例 4 では聴覚性 P300 が誘発されなかった。症例 3 と症例 5 では側頭葉の内側面が萎縮していた (表 2)。

軽度の失見当識をみとめた症例 3 と痴呆を認めなかった症例 10 を比較すると、症例 3 では聴覚性 P300 の潜時が延長し、振幅は低下しており、頭皮上分布は前頭部優位であった (図 1)。また、図形および漢字課題による P300 の潜時は正常であったが、振幅が低下しており、頭皮上分布は前頭部優位であった (図 2)。症例 10 では聴覚性および視覚性 P300 の潜時、振幅は正常で、頭皮上分布は後頭部優位であった。

考察

MND 患者において、特に球症状の強い MND では、知的機能の評価は困難であり、実際には存在した痴呆が見逃されたり、反対に知的機能を低く評価している可能性がある¹⁾。

事象関連電位は認知機能を反映する電気生理学的指標であるとされ、P300 成分は痴呆の客観的評価に用いられている。事象関連電位は、球症状を有する患者でも正確かつ安全に記録することが可能であると考えられ、MND 患者の知的機能の評価に適していると思われる。

今回の検討では、臨床的には痴呆が明らかではなかった MND 患者にも、P300 の異常が存在した。これらの症例では、MRI で側頭葉内側面の萎縮がみられ、P300 の異常と関連していると考えられた⁴⁾。

MND では、臨床的には痴呆が明らかではなくとも、潜在的に知的機能の低下が存在している可能性が示唆された。このような症例では、事象関連電位の記録が有用であるが、視覚性課題など複数の課題を用い、頭皮上分布を検討することにより、電気生理学的異常を検出する頻度が高くなると考えられた。また、臨床的に痴呆を認める症例では、課題の種類により P300 所見が異なり、高次機能をより詳細に評価することが可能であると思われる。

文献

- 1) 中野今治：神経進歩、63～74、1996
- 2) 吉田真理ほか：臨床神経学、1193～1202、1992
- 3) 伊藤多枝子：リハビリテーション医学、277～82、1997
- 4) 伏見雅人ほか：脳波・筋電図の臨床、304～308、1995

表1. 聴覚、視覚オドボール課題

種類		標的刺激 (20%)	非標的刺激 (80%)	加算 回数
視覚性 TV画面表示	非言語性	図形	○	20
	言語性	ひらがな	あ	
		漢字	川	
聴覚性	tone burst (85 dB)	2000 Hz	1000 Hz	30

表2. 患者背景と事象関連電位所見

症例	年齢	性	罹病 期間 (月)	痴呆	HDS	MRI 委縮部位	P300 潜時 (msec)			
							聴覚性	視覚性		
								図形	ひらがな	漢字
1	74	F	13	+	24	F,T	411 ↑ (F)	n.e.	n.e.	n.e.
2	72	F	28	+	13	F,T	n.e.	n.e.	444	400
3	65	F	12	-	25	T	456 ↑ (F)	437(F)	470	477(F)
4	55	F	12	-	29	-	n.e.	382	436	344
5	70	F	10	-	25	T	393 ↑	377	464	415
6	52	M	10	-	30	-	366	388	434	433
7	62	M	26	-	29	-	368(P-O)	449(P-O)	410	460(P-O)
8	69	F	39	-	27	-	378	383	419	394
9	47	F	8	-	30	-	332(P-O)	440(P-O)	405	461(P-O)
10	65	M	10	-	30	-	348(P-O)	415(P-O)	430	419(P-O)

n.e.; not evoked F; frontal lobe T; temporal lobe P-O; parieto-occipital lobe

以下の計算式よりP300潜時の正常値を算出し、2SDを超えたものを延長(↑)とした。

視覚性

非言語性: $Y = 328.6 + 0.699 X$ 、言語性: $Y = 353.3 + 1.035 X$

聴覚性 $Y = 286.3 + 0.896 X$ (Y:P300潜時、X:年齢)

(伊藤多枝子、音成龍司:リハビリテーション医学34:277-282,1997より引用)

P300頭皮上分布を検討した例では()内に振幅が最も高い部位を示した。

図 1. 聴覚課題による P300 の頭皮上分布

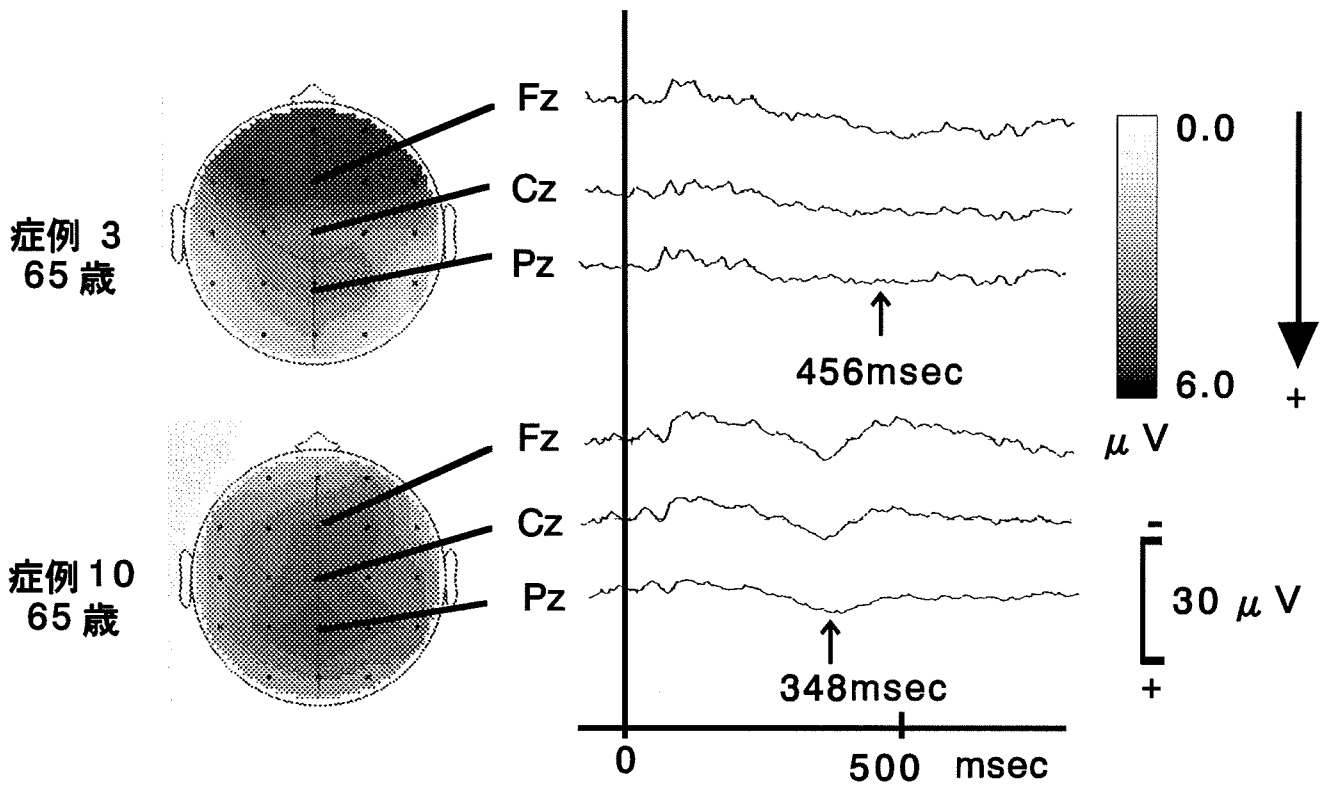
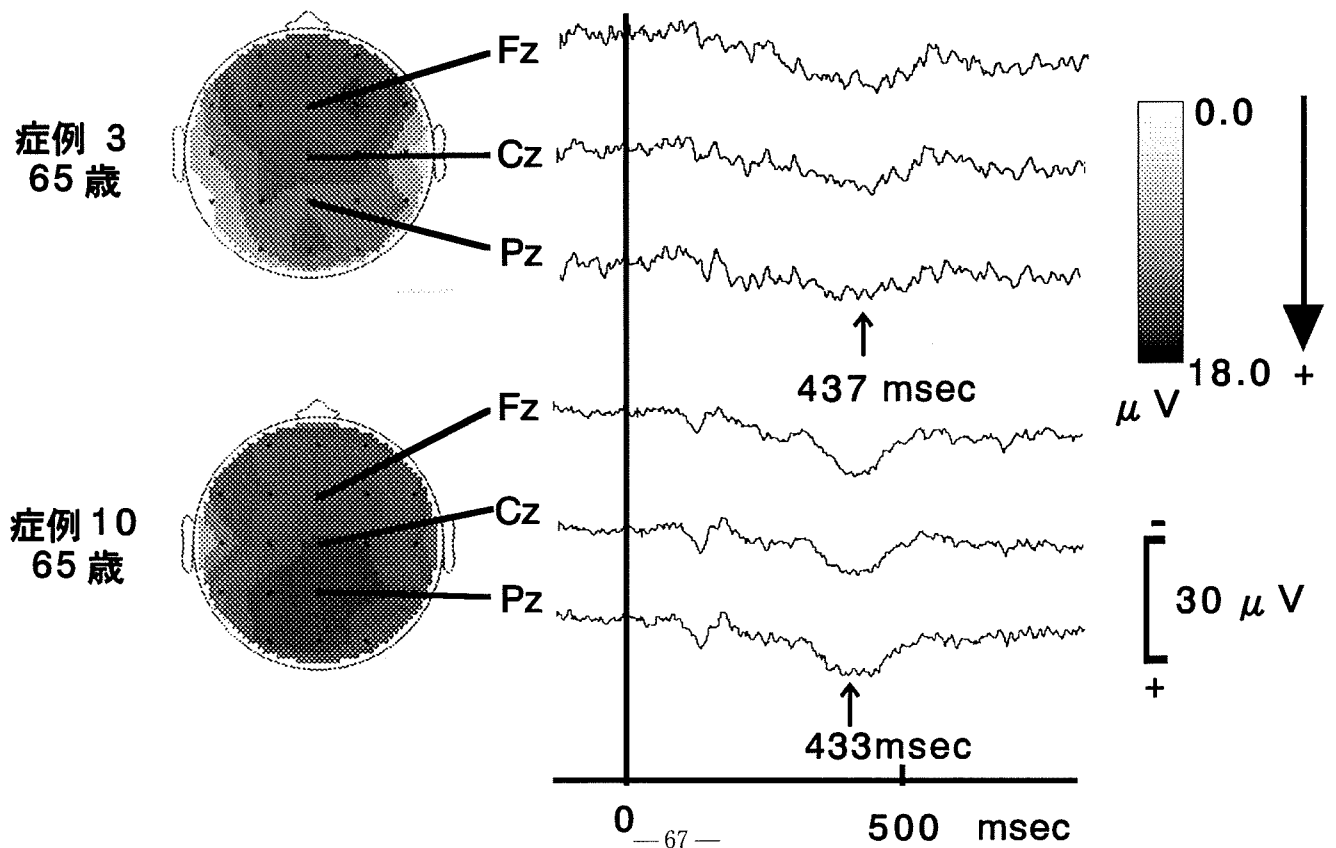


図 2. 視覚課題 (図形) による P300 の頭皮上分布



Axotomized motor neuron death に対する IGF-I , riluzole の効果

岩崎泰雄 池田 憲

はじめに

生直後のラットの坐骨神経を切断することにより、それに支配されている脊髄運動ニューロンが死滅することが知られており、axotomy-induced motor neuron death,あるいはaxotomized motor neuron death という名称で呼ばれている。この現象がいかんして起きるのかは不明であるが、脊髄運動ニューロンは神経栄養因子によってその存在、機能が維持されていると考えられており、axotomyにより、運動ニューロンとその末梢側がある筋肉とのconnectionがとざられて、筋肉よりの種々の栄養因子がsupplyできなくなったり、axotomyの結果、過剰な興奮性アミノ酸などの関与により、脊髄運動ニューロンが死滅するという考えが存在している¹⁾。

Insulin-like growth factor-I (IGF-I) は70個のアミノ酸から成るポリペプチドである。これまでの研究によるとIGF-Iは運動ニューロンに対して以下の特徴を有している。1)培養した運動ニューロンに対してその生存を延長させる²⁾。2) Naturally occurring cell death に対して保護効果がある³⁾。3) Wobbler mouse の運動機能に対して効果がある⁴⁾。IGF-I受容体も脊髄運動ニューロンに存在している。一方、グルタミン酸を中心とする興奮性アミノ酸、及びその受容体が過剰に興奮することにより、細胞死が生じることも知られている⁵⁾。Riluzoleはシナプス前に働き、グルタミン酸の遊離を阻害する作用を有している⁶⁾。Riluzoleと同じ作用を有するLamotrigineがaxotomyによって生ずる運動ニューロン死に対して効果があることが知られている⁷⁾。

今回、axotomyによって生ずる運動ニューロン死に対してIGF-I, riluzoleを投与し、若干の知見を得たので報告する。

対象および方法

実験動物は生後1日以内のSD系ラットを用いた。1)ラットを低体温にて麻酔した。2)左側の坐骨神経をobturator tendonの所で完全に切断した。3)それぞれ濃度の異なるIGF-I, riluzoleを14日間連日腹腔内投与した。また、対照群には同量のPBSを14日間連日腹腔内投与した。4)投与終了後、経心的灌流固定によりL₄の脊髄を摘出した。5)脊髄をパラフィン包埋し、約10 μ mの連続切片を作製し、cresyl-violet染色した。6)脊髄運動ニューロン数と直径を測定し比較検討した。

結 果

左右それぞれの脊髄運動ニューロン数を数え、以下の式にて導き出されるものをsurvival ratio (lesionside / non-lesion side X 100) として求めた。IGF-I投与群は0.1mg/kg, 0.5 mg/kg投与群はcontrol群に比して何ら有意差を認めなかったが、1.0mg/kg, 5.0 mg/kg投与群はcontrol群に比して有意に高値を呈した。しかし、1.0mg/kgと

5.0 mg/kgとでは差が得られなかった。一方、riluzole投与群は1.0mg/kg, 2.0 mg/kg投与群はcontrol群と比して何ら差を認めなかったが、5.0mg/kg, 10.0 mg/kg投与群はcontrol群と比して有意に高値を呈した。しかし、5.0mg/kgと10.0mg/kgとでは差を認めなかった。

IGF-Iは1.0 mg/kgと5.0mg/kgでriluzoleは5.0 mg/kgと10.0mg/dlでtherapeutic efficacyが同じであったために、IGF-I 1.0mg/kg, riluzole 5.0mg/dlを用い、併用投与を行った。併用療法はそれぞれ単独に用いた時より多少効果が増強したが、有意差を得るまでには至らなかった(Fig. 1)。

考 察

坐骨神経を切断することにより、それに対応する脊髄運動ニューロンに変性、脱落が生じることが知られているが、この現象がいかんして生じるかは不明である。脊髄運動ニューロンは筋肉などからsupplyされる種々の神経栄養因子によってその機能、分化などが維持されており、axotomyにより筋肉からの栄養因子が中断されるため運動ニューロン死が生じるとの説である¹⁾。

動物実験の成績からは、IGF-Iは運動ニューロンに対してtrophicな効果を有している²⁻⁴⁾。今回、我々の結果からも、これまでの知見を裏づけるものと考えられた。

運動ニューロンが死滅する代表的疾患である筋萎縮性側索硬化症(ALS)の治験においては、これまでTRH, CNTF, BDNFなどの種々の神経栄養因子が用いられており、IGF-Iもその一つである。ALSにおいて、IGF-Iもすでに北米とヨーロッパでトライアルが行われ、北米では多少ながら有効であるとする結果が得られているが、ヨーロッパでは無効だとする結果が得られ、conflictingな結果が得られている⁸⁾。

RiluzoleについてはALSの治療薬として欧米ではapproveされており、日本においてもまもなく、使用できる状態にある。

ALSの治療を考えた場合、単剤では全ての運動ニューロンを救えず、全ての運動ニューロンを保護するには多剤併用の方がより効果があるのではないかという考えも既に存在しており、動物実験においては多剤併用にてその効果をみている。

Mitsumotoら⁹⁾は、wobbler miceを用いた実験でCNTFとBDNFを用いることにより、motor deficitをarrestしたと報告している。Zumら¹⁰⁾もGDNFとBDNF, GDNFとCNTF, BDNFとCNTFの相乗効果を報告している。一方、Hughesら¹¹⁾, Hendersonら¹²⁾も種々の神経栄養因子を用い、その相乗効果を検討したが、結果は陰性であったと報告している。この様に種々の神経栄養因子を用い、その相乗効果の検討が行われてきているが、それぞれの方法も異なっており、一定の見解が得られていない。どの組み合わせを用いればベストの結果が得られるかを見出すことにより、ALSへの新たな治療方法も生まれると考えられる。

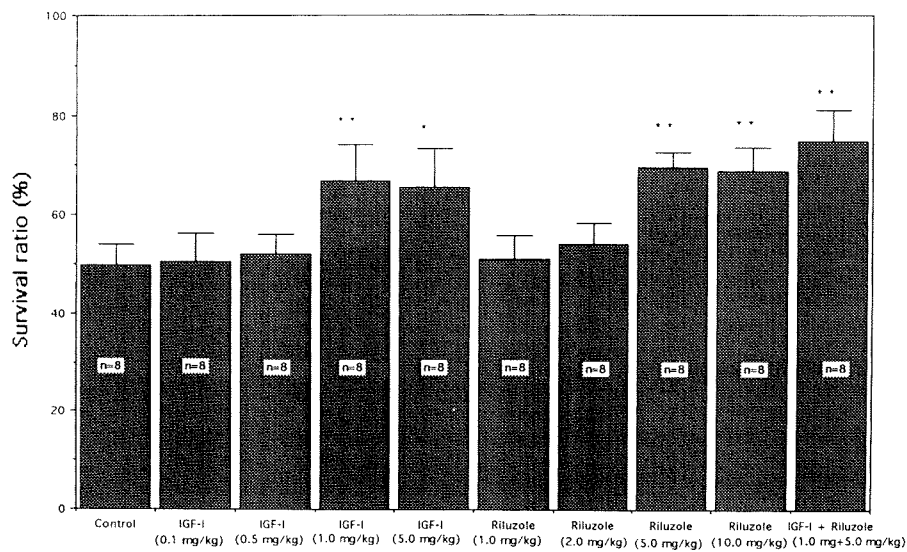


Fig 1 Survival ratio

文 献

- 1) Snider WD et al: J Neurobiol 23: 1231-1246, 1992
- 2) Arakawa Y et al: J Neurosci 10: 3507-3515, 1990
- 3) Neff NT et al: J Neurobiol 24: 1578-1588, 1993
- 4) Hantái D et al: J Neurol Sci 129 (Suppl): 122-126, 1995
- 5) Choi DW: J Neurobiol 23: 1261-1276, 1992
- 6) Doble A: Neurology 47(Suppl4): 233-241, 1996
- 7) Casanovas A et al: Neuroscience 71: 313-325, 1996
- 8) Lai EC et al: Neurology 49: 1621-1630, 1997
- 9) Mitumoto H et al: Science 265: 1107-1110, 1994
- 10) Zurn AD et al: J Neurosci Res 44: 133-141, 1996
- 11) Hughes RA et al: J Neurosci Res 36: 663-671, 1993
- 12) Henderson CE et al: Science 266: 1062-1064, 1994

超大量メチルコバラミン筋注によるALS治療 -無作為割り付けによる二重盲検クロス・オーバー試験-

児玉 光生 梶 龍兒 坂本 崇 松本 真一 高木 恒和
村瀬 永子 小島 康祐 幸原 伸夫 木村 淳

はじめに

現在のところ筋萎縮性側索硬化症に対する客観的な臨床評価項目を改善させる治療法は見つかっていない。超大量メチルコバラミンは実験的アクリルアミドニューロパチーの神経再生を促す作用をもつ(文献1)。さらに通常量の100倍に相当するメチルコバラミン50mg投与は毒性実験で安全であることが分かっている。我々は、京都大学医学部医の倫理委員会の承認を受けて、超大量メチルコバラミン筋注によるALS治療の試みを行っている。1日25mgの投与によりCMAP振幅が上昇することを評価医と患者に対する二重盲検試験で確認している(文献2)。今回は平成10年8月から無作為割り付けによる二重盲検クロス・オーバー試験で50mg投与の筋力など他の臨床指標に与える効果を検討している。今回はその途中経過を報告するため、統計学的分析に必要なデータ数はまだ得られていない。

方 法

対象患者はEl Escorial World Federation of Neurology criteriaをたす筋萎縮性側索硬化症患者のうち、文書による同意が得られ、他覚的・自覚的評価が可能なものである。但し18歳未満、85歳を越えるもの、発症後5年を越える場合、呼吸不全をきたしている場合、人工呼吸器使用の場合、もしくはFVC 50%未満の場合、妊娠中の女性を除く。

試験デザインは初回入院8週間のうち2週間連日投与し、自宅療養1、2ヶ月をへて再入院8週間のうち2週間連日投与するものである。コントローラーの無作為割り付けで初回が低用量、再入院が超大量もしくはその逆を投与する。コントローラー及び入院主治医のみ薬剤投与量を把握し、診察評価医師、検査担当医師・技師及び患者には薬剤投与量をブラインドにする。診察、検査は入院中2週間ごとに行う。

メチルコバラミン25mg注射薬は京大病院薬剤部(無菌

暗室)で作成する。試薬(SIGMA社製、USA)メチルコバラミン粉末を25mgあたり生理的食塩水2mlで溶解し、マイクロフィルターによる濾過を2回行い、濾過行程に滅菌操作をかねる。2ml注射薬用アンプルに詰め、30分の光によりすべてのメチル基がはずれるので、遮光、冷蔵庫保管する。

今回報告できるのは参加9名のうち、100倍量が6名、通常量が4名である。試験中に自然経過で呼吸不全をきたし気管切開を行った例と、自然経過による呼吸不全により死亡した例は除いている。

評価項目は、ALS Functional Rating Scale (40点満点)、The Norris ALS Scale (100点満点)、徒手筋力検査(32筋を7段階評価で224点満点)、握力、Bulbar Function(Times required to repeat the syllables "pata" 15 times)、呼吸機能(Forced Vital Capacity)、神経伝導検査(averaged CMAP amplitudes of bilateral median, ulnar and tibial nerves stimulation)、副作用である。神経伝導検査は一定の場所に刺激、記録部位を定め、記録電極を表面積が大きく接着性の良いものを使用し再現性を高めた。

結 果

ALSFRSは1.0mg、50mgともほぼ不変であった。NORRIS Scaleは1.0mgで不変ないし8週で20%程度の低下を示し、50mgは不変ないし8週で10%程度の低下であった。調べたすべての徒手筋力検査は1.0mgで不変ないし6、8週で15から25%程度の低下を示し、50mgは不変ないし6週で20%程度上昇した(図1)。上肢筋の徒手筋力検査は1.0mgで不変ないし6、8週で15から30%程度低下し、50mgは不変ないし6週で50%程度上昇した。呼吸機能は1.0mgで不変ないし6、8週で40から60%程度の低下を示し、50mgは不変ないし6週で20%程度低下した。神経伝導検査は1.0mgで30%程度の低下または20%程度上昇を示す例があったが、50mgは不変ないし60%程度上昇した。副作用は今回のスケジュールでは発生しなかったが、以前に使用した29名中2名に軽度の紅斑と肝酵素異常をあわせても、37名中軽微な副作用2例である。