

るマウスから各種臓器を採取し、ウェスタンブロットリングやノーザンブロットリングを行い検討した。

3) 加齢および世代による siRNA 効果の変化

同一個体の 1 ヶ月齢、5 ヶ月齢における SOD1 タンパクの変化を検討した。また F1、F3 間の SOD1 タンパクの変化を検討した。

4) SOD1-siRNA TgM と G93A SOD1 TgM の掛け合わせ

SOD1-siRNA TgM と家族性 ALS のモデル動物である G93A SOD1 TgM を体外受精させ F1 マウスを得た。F1 マウスの尾からタンパク質を抽出し、ウェスタンブロットリング法で G93A SOD1 タンパクを検出した。

結果

1) SOD1-siRNA TgM の作製

受精卵へのマイクロインジェクション法ではマウスのゲノムに SOD1-siRNA トランスジーンを組み込みは確認できたが、SOD1 タンパクの発現は抑制できなかった。

一方、ES 細胞を用いた方法では、高率に SOD1 タンパクの発現を抑制したクローンが得られた。このクローンをマイクロインジェクションして作製したキメラマウスから生まれた F1 マウスにおいて、SOD1-siRNA トランスジーンを組み込みが確認され、SOD1 タンパクの発現が抑制された(図 1)。

2) TgM の解析

作製された SOD1-siRNA TgM では軽度の体重低下とメスの不妊がみられたが、重篤な表現型の異常はなかった。全身性に SOD1 タンパクの発現が抑制されており、脊髄や大脳では 85-90%の抑制率であった(図 2)。ノーザンブロットリング法では大脳と肝臓において SOD1 mRNA の発現抑制が確認された(図 3)。

3) 加齢および世代による siRNA 効果の変化
検討した月齢および世代の範囲内では siRNA の有意な効果の減弱はみられなかった(図 2)。

4) SOD1-siRNA TgM と G93A SOD1 TgM の掛け合わせ

SOD1-siRNA トランスジーンと G93A SOD1 トランスジーンを有するダブル TgM が得られた。このダブル TgM では G93A SOD1 タンパクおよびマウス内因性 SOD1 タンパクの発現抑制が認められた(図 4)。

考察

本研究の siRNA は正常アリル、変異アリルともに発現が抑制されるようデザインされている。変異遺伝子のみを選択的に抑制する siRNA が望ましいが、すでに報告されている SOD1 ノックアウトマウスは軸索損傷後の神経細胞の脆弱性、難聴、メスの不妊以外に重篤な異常がみられないため、正常 SOD1 の発現が低下してもこのモデル動物の治療方法としては大きな問題はないと考えた。

また本研究の SOD1-siRNA では変異 SOD1 遺伝子の発現を完全に抑制することはできないが、G93A SOD1 TgM では変異遺伝子のコピー数と生存期間に逆相関があることが示されており、変異 SOD1 タンパクの発現量を減らすことさえできれば、発症の予防ないし進行の抑制が期待できる。実際、SOD1-siRNA TgM と G93A SOD1 TgM の掛け合わせ実験では、ダブル TgM における G93A SOD1 タンパクの高度な発現抑制に成功し、4 ヶ月齢の段階で siRNA(-) G93A SOD1 TgM が全例発症、一部死亡しているのに対し、ダブル TgM は発症していない。本研究により siRNA が ALS の強力な治療法となる可能性が示されたが、今後は siRNA をいかに生体内にデリバリーするかが問題である。

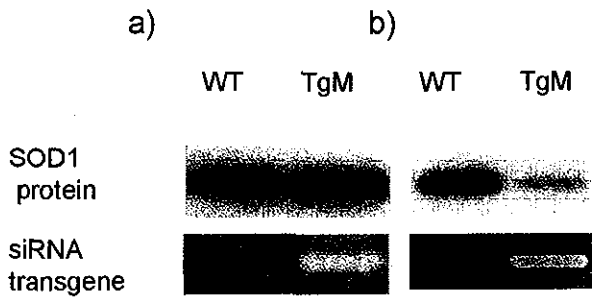


図1 SOD1-siRNA TgMの作製

a)マイクロインジェクション法

b)ES細胞を用いた方法

受精卵へのマイクロインジェクション法とES細胞を用いた方法を試みた。いずれの方法でもマウスゲノムにSOD1-siRNAトランスジーンを組み込みが確認できたが、ES細胞を用いた方法でのみSOD1タンパクの発現が抑制された。

WT: wild type, TgM: transgenic mouse

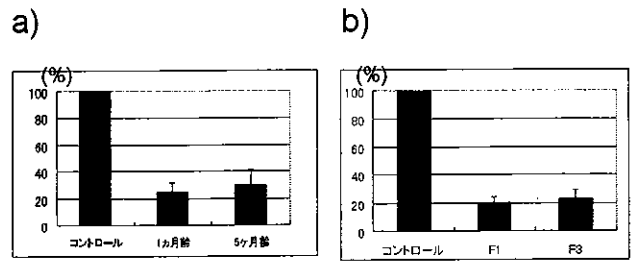
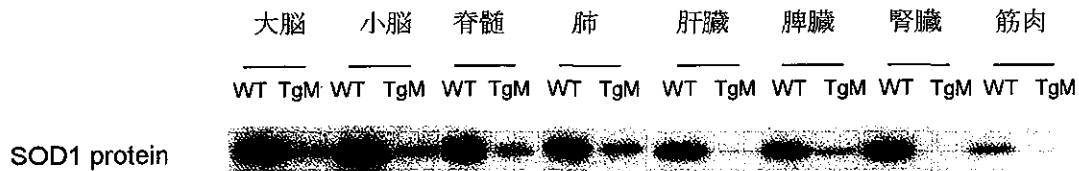


図3 加齢および世代によるsiRNA効果の変化

a)加齢による影響 1ヶ月齢と5ヶ月齢におけるSOD1タンパクの抑制 (コントロールに対する比率)

b)世代による影響 F1とF3におけるSOD1タンパクの抑制 (コントロールに対する比率)

検討した範囲内ではsiRNA効果に有意な減弱はみられなかった。



臓器別のSOD1タンパクの抑制 (コントロールに対する比率)

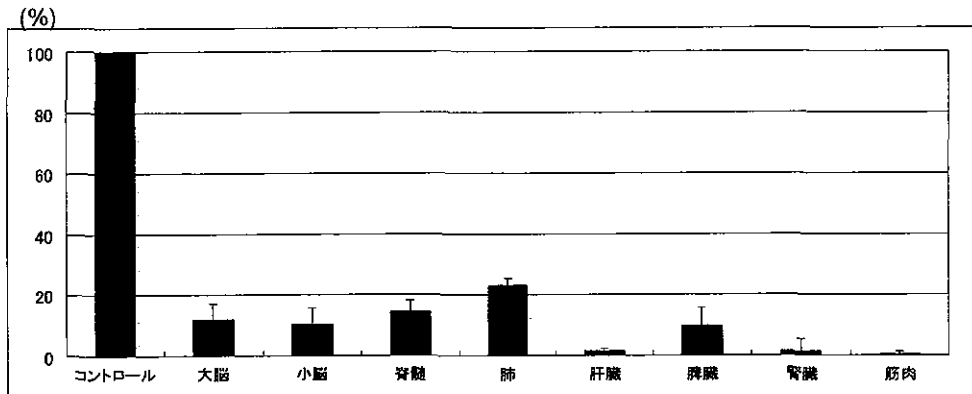


図2 SOD1-siRNA TgMの臓器別ウェスタンブロッティング

中枢神経で85-90%の抑制が認められた。

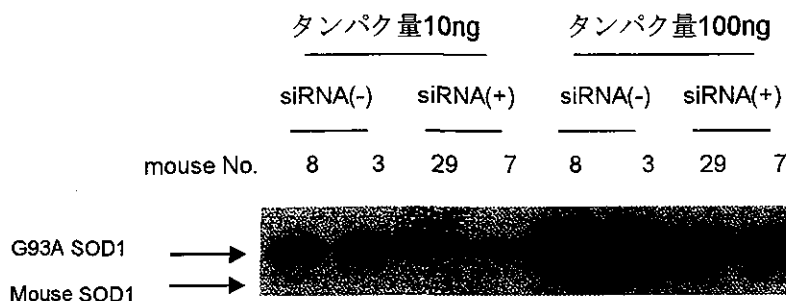


図4 SOD1-siRNA TgMとG93A SOD1 TgMの掛け合わせ (ウェスタンブロッティング)

G93A SOD1タンパクおよび内因性SOD1タンパクの発現抑制が認められた。

まとめ

- 1)ES 細胞レベルで遺伝子導入することにより、SOD1 mRNA に対する siRNA を過剰に発現した トランスジェニックマウスが作製できた。
- 2)この siRNA により全身性に内因性のマウス SOD1 タンパクの発現が抑制された。
- 3)G93A SOD1 TgM に SOD1-siRNA TgM を掛け合わせることで、G93A SOD1 タンパクを高率に抑制できた。

文献

- 1)Elbashir,S.M., et al. :Nature 411, 494-498, 2001.
- 2)Hasuwa,H., et al. : FEBS Letter 532, 227- 230, 2002.
- 3)Carmell,M.A., et al. : Nat. Struct. Biol. 10, 91-92, 2003.
- 4)Reaume,A.G., et al. : Nat. Genet. 13, 43-47, 1996.
- 5)Gurney,M.E.,et al. : Science 264, 1772-1775, 1994.
- 6)Guillermo,M.A.,et al. : Mol. Brain Res. 130,7-15, 2004.

Wobbler マウスに対する緑茶療法：

カテキン，テアニン，カフェイン投与との比較

岩崎泰雄¹⁾，池田 憲^{1),2)}，青柳 丞¹⁾

1) 東邦大学大森病院 神経内科

2) PL 東京健康管理センター 神経内科

研究要旨 筋萎縮性側索硬化症（ALS）の治療法を開発するために、運動ニューロン変性が生じるALS類似モデル動物である wobbler マウスに対する緑茶の治療効果を、その含有成分であるカテキン，テアニン，カフェインの投与と比較検討した。2%緑茶混餌療法により wobbler マウスの運動機能障害と神経筋病理学的所見を明らかに軽減できた。緑茶は飲料の形ではなく、それ自体を適量投与すれば、ALS患者で障害された運動ニューロンや骨格筋への保護作用がある可能性が示唆された。

はじめに

これまでに、われわれは筋萎縮性側索硬化症（ALS）患者の新薬開発を目的に、運動神経細胞の培養、坐骨神経や顔面神経の外傷モデルを用いた各種薬剤の治療効果を検討してきた^{1),2)}。今回は、運動ニューロン疾患モデル動物である Wobbler マウスに対する緑茶の神経保護効果を検討した。

方法

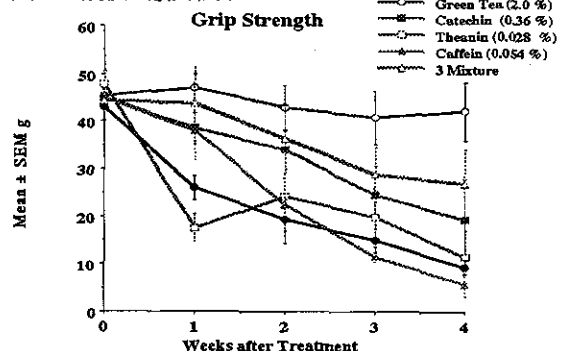
1) 2%緑茶混合粉末飼料、2%緑茶に相当する0.36%カテキン、0.028%テアニン、0.054%カフェインの各混合粉末飼料、3種混合の計5種類の飼料を作成した。Wobbler マウスの発病直後（生後3-4週齢）から、それぞれ5種類の混餌および一般飼料を4週間、自由投与した。2) 運動機能の評価は薬剤投与の開始から4週間、毎週、前肢の拘縮の程度（grade 1 から grade 4 の4段階評価）と特殊な dynamometer を用いて前肢の筋力を定量的に評価し、両前肢の運動機能を観察した。3) 病理学的検討は4週間の薬物投与終了後（生後7-8週齢）に上腕二頭筋の湿重量とATPas染色による筋繊維平均直径を求めた。同時に経心的灌

流固定後に脊髄を摘出し、cresyl-violet 染色による脊髄C5-6大型運動ニューロンの数を判定した。

結果

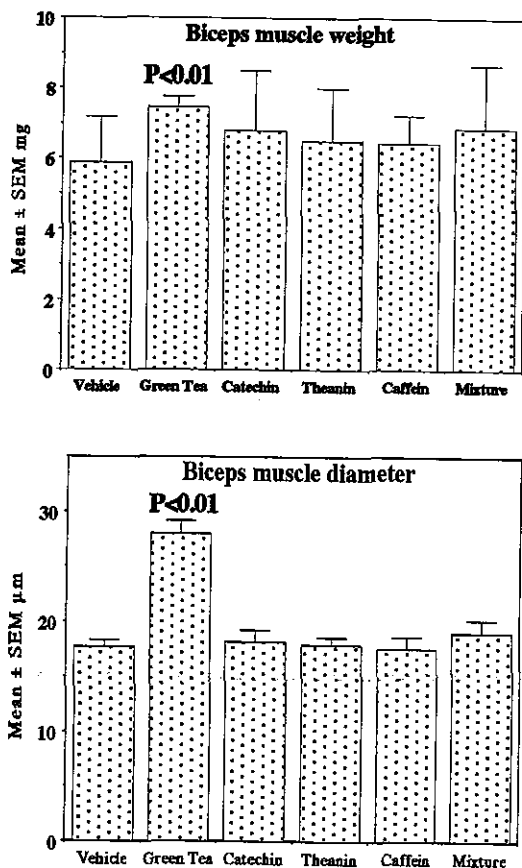
2%緑茶投与は前肢の筋力低下（図1）と拘縮の進行を有意に遅延した。また、上腕二頭筋の筋重量の減少と脱神経所見が抑制された（図2）。脊髄運動ニューロン数の減少が有意に抑制された（図3）。カテキン，テアニン，カフェイン，3種混合投与の4群では前肢の運動機能と神経筋病理学的所見の改善は認められなかった。

図1 前肢の筋力低下



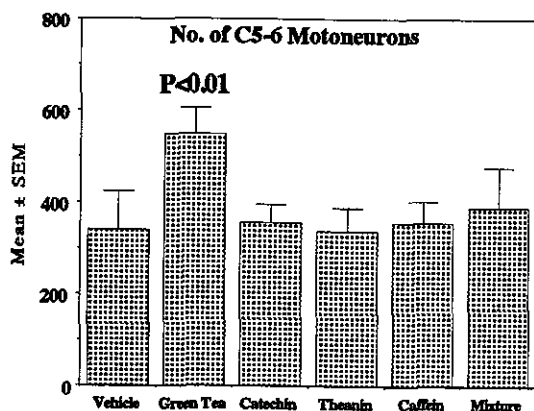
緑茶の混餌投与により、前肢の筋力低下が抑制されている。

図2 上腕二頭筋の筋重量と筋線維平均直径



緑茶の混餌投与により、筋重量の減少と脱神経所見の進行が抑制されている。

図3 脊髄運動ニューロンの残存数



緑茶の混餌投与により、運動ニューロン死が軽減されている。

考察

緑茶混餌により wobbler マウスの神経筋機能障害の進行を有意に軽減できた。その作用機序には骨格筋、脊髄運動ニューロンを介する病理所見が確認された。

これまでに神経変性疾患モデルに緑茶に含有されているカテキン、特に epigallocatechin gallate (EGCG)を用いた研究が施行されている。運動ニューロン疾患では mutant SOD (G93A)マウスの G93A mutant cell を培養系に、EGCG を前処置すると生存シグナルである PIK3/Akt シグナルを増強し、GSK シグナルを抑制することが報告されている³⁾。パーキンソン病モデルである MPTP マウスに対して、緑茶抽出物ないし EGCG の前投与が黒質のドパミンニューロンに保護的に働くことが報告されている⁴⁾。緑茶には種々のカテキン、ビタミン、遊離アミノ酸、カフェイン、テアニンなど様々な成分が含まれている。しかし、wobbler マウスに対する治療効果は緑茶の含有成分で知られているカテキン、テアニン、カフェインの単独や三種混合では発揮されなかった。よって、何の緑茶成分が運動ニューロンに対して保護効果を発揮するのかに関しては不明であった。現時点では、抗酸化作用や鉄キレート作用を有するいくつかの成分が血液脳関門を良好に通過し、相乗・相加作用すると推察された。

結論

緑茶混餌療法により wobbler マウスの運動機能障害と神経筋病理学的所見を明らかに軽減できた。

文献

- 1) Iwasaki Y, et al. Neurochem Res 27: 225-228, 2002
- 2) Iwasaki Y, et al. Ann Neurol 52 (Suppl 1): 55, 2002
- 3) Koh SH, et al. Toxicology 202: 213, 2004
- 4) Levites Y, et al. J Neurochem 78: 1073, 2001

筋萎縮性側索硬化症に対するメチルコバラミン大量投与の長期効果 —第3報—

梶 龍兒¹⁾, 和泉唯信¹⁾, 野寺裕之¹⁾

¹⁾ 徳島大学医学部神経内科

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) 患者に対するメチルコバラミン大量投与の長期効果を検討した。呼吸不全をきたしていない孤発性 ALS 患者 41 名をメチルコバラミン大量投与と無投与の二群に無作為に振り分けた。投与群にはメチルコバラミン 50mg/day を週 2 回筋肉注射する。投与群および非投与群で生存期間または呼吸器使用に至るまでの期間を比較する。経過観察中に症状が進行しないもの、処方を変更したもの (riluzole を開始したもの)、メチルコバラミン大量投与を中断したもの、重篤な副作用が出現したものは除外した。7 名が除外され、34 名を解析した (投与群 18 名, 非投与群 16 名)。投与群と非投与群で臨床型および重症度に有意差を認めなかった。2004 年 8 月末時点で生存期間または呼吸器使用にいたるまでの期間は、投与群が 28.8 月であるのに対し非投与群は 17.7 月であり、投与群の方が有意に長かった (Kaplan-Meyer Logrank $\chi^2 = 5.16, p = 0.023$)。病型別では球型には差がなく ($p = 0.381$)、四肢型では投与群が非投与群に比べて経過が長い傾向にあった ($p = 0.052$)。

はじめに

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) の病因は不明であり治療薬も riluzole しかないのが現状である。今回、われわれは以前報告した ALS 患者に対するメチルコバラミン大量投与の長期効果の続報を報告する。

対象および方法

対象は呼吸不全をきたしていない孤発性 ALS 患者 41 名。方法：患者をメチルコバラミン大量投与と無投与の二群に無作為に振

り分けた。投与群にはメチルコバラミン 50mg/day を週 2 回筋肉注射する。投与群および非投与群で生存期間または呼吸器使用に至るまでの期間を比較する。経過観察中に症状が進行しないもの、処方を変更したもの (riluzole を開始したもの)、メチルコバラミン大量投与を中断したもの、重篤な副作用が出現したものは除外した。

結果

7 名が除外され、34 名を解析した (投与群 18 名, 非投与群 16 名)。投与群と非投与

群で平均発症年齢、性差、El Escorial の分類、病型（球型、四肢型）、観察開始時の ALSFRS（amyotrophic lateral sclerosis functional rating scale）および観察開始までの平均罹病期間に有意差を認めなかった。2004年8月末時点で生存期間または呼吸器使用にいたるまでの期間は、投与群が28.8月であるのに対し非投与群は17.7月であり、投与群の方が有意に長かった（図1；Kaplan-Meyer Logrank $\chi^2 = 5.16, p = 0.023$ ）。病型別では球型には差がなく（図2； $p = 0.381$ ）、四肢型では投与群（29.0月）が非投与群（16.5月）に比べて経過が長い傾向にあった（図3； $p = 0.052$ ）。副作用は皮疹と肝逸脱酵素上昇を各1名に一過性に認めたのみである。

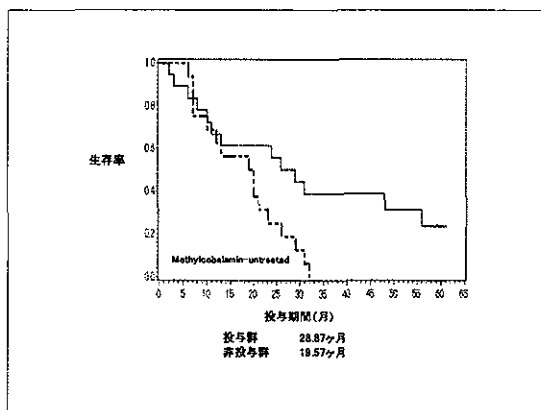


図1

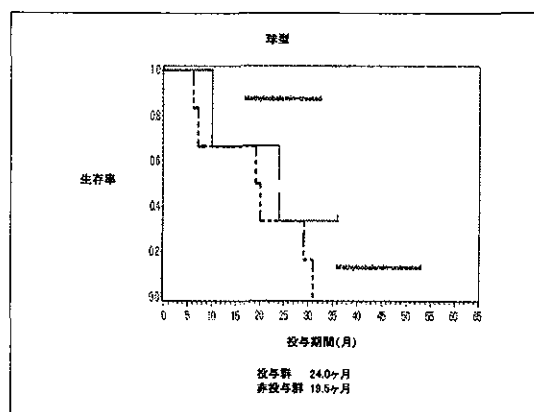


図2

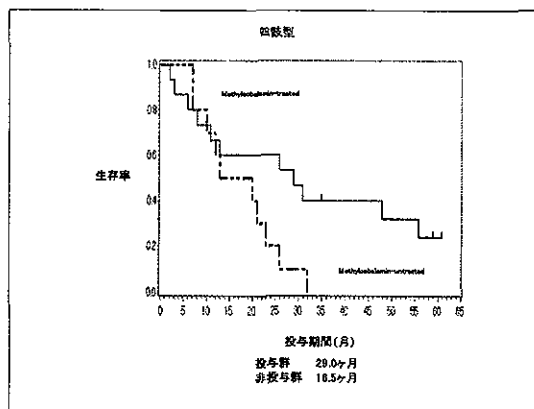


図3

考察

今回の検討ではALS患者に対するメチルコバラミン大量投与は長期的には生存期間あるいは呼吸器使用にいたるまでの期間を有意に延長する。どのようなメカニズムでこれらの効果をもたらすのかは明らかではないが、いくつかのことが考えられる。第一に、ALSの病因としてグルタミン酸異常仮説が提唱されているが¹⁾、メチルコバラミンは高濃度ではグルタミン酸の細胞毒性に対して防御効果をもつ²⁾ことが報告されており、そのためメチルコバラミンが有効である可能性があると考えられる。第二に、

メチルコバラミンは DNA 代謝においてメチル基輸送に直接働いており、神経細胞死を防ぐ働きがある。第三に、メチルコバラミンの大量投与は *in vitro* で遺伝子転写を *up-regulate* したり³⁾、ラットの挫滅した坐骨神経の Schwann 細胞の蛋白代謝を活性化したりする⁴⁾。これらのことから、メチルコバラミンは運動ニューロン、星状膠細胞および Schwann 細胞でつくられる内因性神経成長因子のように蛋白合成を活性化することによって効果を発揮している可能性が推測される。

まとめ

メチルコバラミン大量投与は ALS 患者の生

存期間または呼吸器使用にいたるまでの期間を延長するが、球型には無効であり四肢型に有効である傾向がある。今回の検討はいずれも少数例であるが、重篤な副作用は全くなく安全に施行できた。2004 年より欧州において治験が開始された。

文献

- 1) Albin, RL, et al: Neurology: 733-738, 1992.
- 2) Akaike A, et al.: Eur J Pharmacol: 1-6, 1993.
- 3) Pfohl-Leszkowicz A, et al: Biochemistry: 8045-8051, 1991.
- 4) Yamatsu K, et al.: Folia Pharmacol Jpn : 259-268, 1976.

運動単位推定数 (MUNE) 自動算出のためのソフトウェア開発

荒崎圭介¹⁾、牛島良介²⁾、兵頭 亮²⁾

¹⁾ NTT 東日本関東病院 神経内科

²⁾ 日本光電工業 (株) 脳神経機器 BG

研究要旨 新規開発した MUNE 自動算出用ソフトウェアを用い、非侵襲的な測定法として知られる多点刺激法 (multiple point stimulation 法) による健常成人の MUNE を算出し、信頼性・再現性の検証を行った。解析を含む本検査の所要時間は平均して 30 分程度であり、ルーチン検査としての応用が期待できた。

はじめに

これまで intraneural microstimulation 法¹⁾、多点刺激法²⁾などを用いて運動単位推定数 (MUNE) を求めてきた。後者は non-invasive なテストであり、検査に要する時間も約 30 分であるためルーチン検査に適している。しかし市販されている筋電によって簡便に検査を行うためのソフトウェアがないことが、この検査が広く普及しない原因となっている。そこで本年度、上記の目的にかなったソフトウェアを開発し、本検査法の普及をはかることとした。

方法

本研究の対象は健常成人男性 11 名 (年齢 24-48 才) で、検査に先だってその内容を説明し、リスクが全くないことを了解していただいた上で御協力をいただいた。

両側の小指球筋における MUNE は多点刺激法³⁾によって求めた。この筋腹上の皮膚上に陰極、第 5 指の MP 関節上に陽極の表面電極を貼り付け、筋活動電位を導出した。この陰極電極から 70mm 離して刺激電極を置き、矩形波の定電流通電により尺骨神経を刺激した。超最大刺激強度により最大筋活動電位 (CMAP) を記録し (図 1、中央下)、次に閾値程度の弱刺激により単一運動単位の筋活動電位 (uMAP) を記録した。その後、刺激電極を中枢側へ 5mm 間隔で移動させながら、閾値刺激を繰り返しながら 10 個の uMAP を記録した (図 1、左)。これらの uMAP の波形を陰性部分の立ち上がり部でそろえ、コンピューターにより平均加算して平均的 uMAP の波形を求めた (図 1、右下)。

MUNE の算出のため、(1) CMAP のピーク間振

幅と平均的 uMAP のピーク間振幅、(2) CMAP 陰性部分の面積と平均的 uMAP の陰性部分の面積、をそれぞれ計測した。最後に (1)、(2) における前者を後者で除し、2 種類の小指球筋 MUNE (振幅による MUNE および面積による MUNE) を求めた。

結果

本研究に用いたソフトウェアによって筋電計画面に示される図を図 1 に示す。11 例にて得られた MUNE の平均値±標準偏差は、第 1 回検査時、面積を用いた MUNE は 308 ± 87 (平均値±SD)、振幅による MUNE は 316 ± 134 であった。第 2 回検査時には、MUNE (面積) は 311 ± 94 、MUNE (振幅) は 341 ± 84 であった。

図 2 に、MUNE (振幅)、MUNE (面積) それぞれの手法による平均値の差の検証結果を示した。第 1、2 回検査共に MUNE (面積) が小さい値を示したが、統計的には有意ではなかった。また、図 3 に全被験者の試験-再試験結果を示した。この結果、MUNE (面積) の値が MUNE (振幅) よりも高い再現性を示し (回帰係数 1.03)、信頼度の高い指標であるということが示された。

考察

本研究では、研究的検査に供する目的で新たに開発したソフトを用いて、健常男性 11 名における MUNE を 2 種類 (筋電図波形の振幅に基づく MUNE とその面積に基づく MUNE) 算出した。MUNE (面積) と MUNE (振幅) 両手法による結果では、MUNE (面積) の方が両試行ともに大きい値を示したが統計的有意差は認められなかった。MUNE の試験-再試験の検証については、MUNE (面

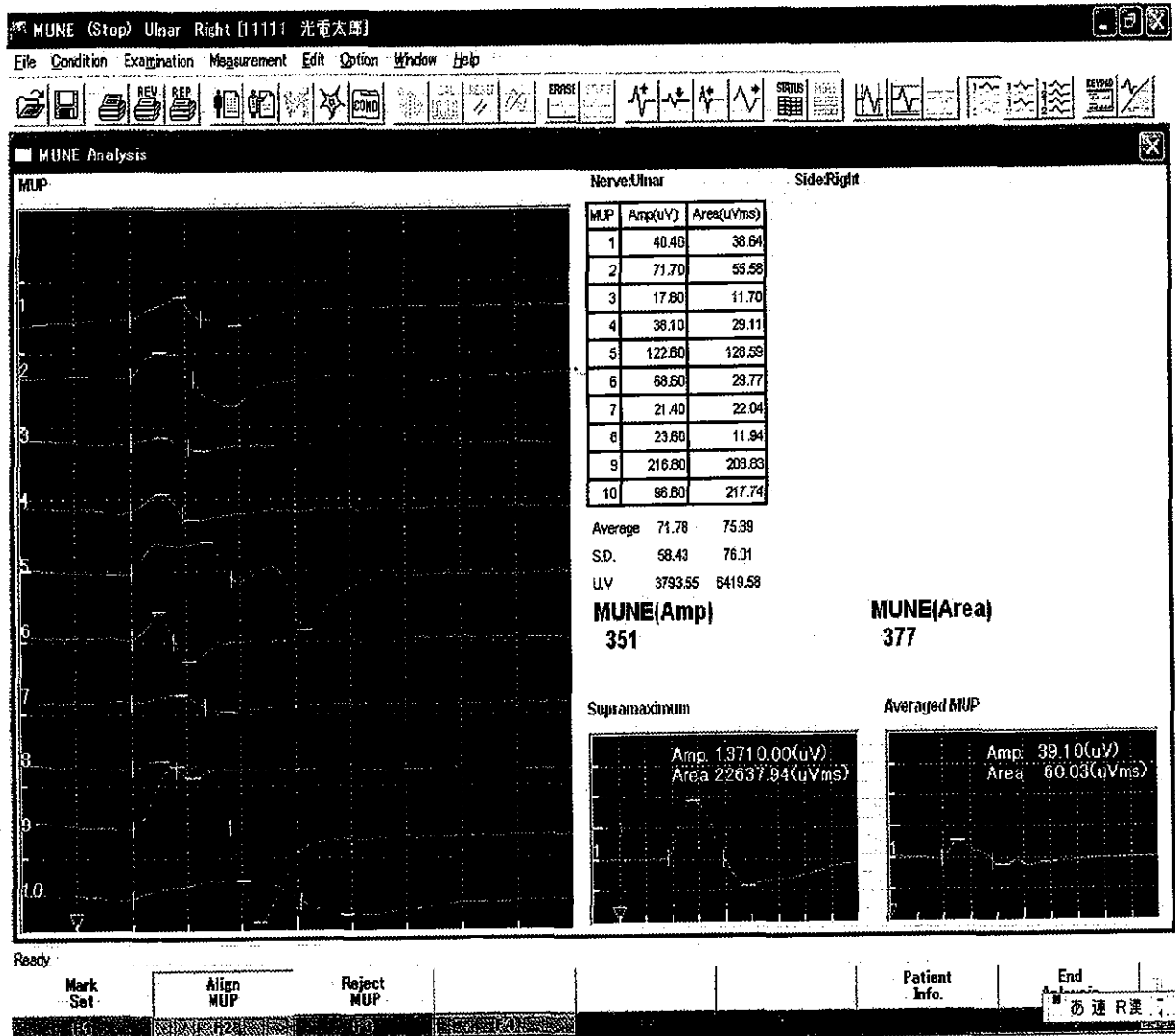


図1 MUNE 検査時の筋電計画面
単一運動単位による筋活動波形は左に縦に並べられた10波形で、最大波形が中央、平均的単一筋活動波形は右下に示される。

得られたMUNEは画面右下1/3にあり、振幅によるものが左、面積によるものが右に示される

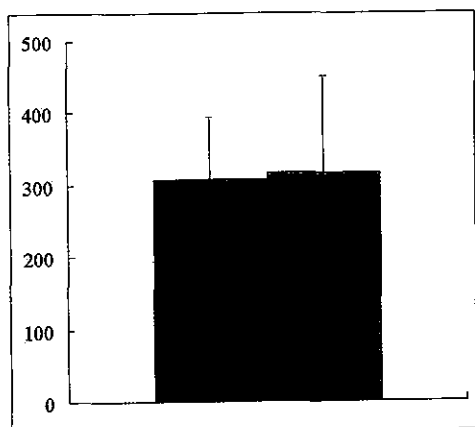
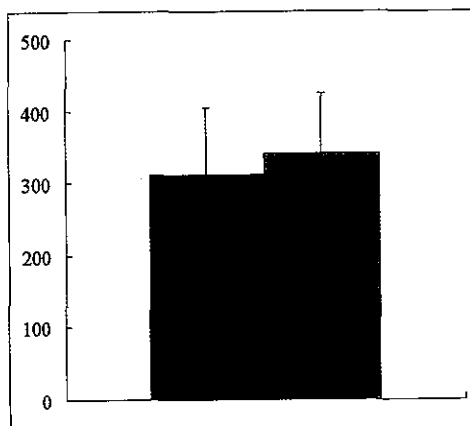


図2 MUNE (面積、左) と MUNE (振幅、右)



左が第1回、右が第2回検査結果

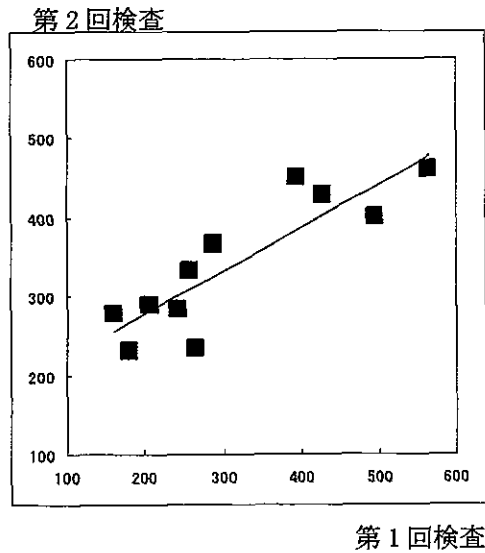
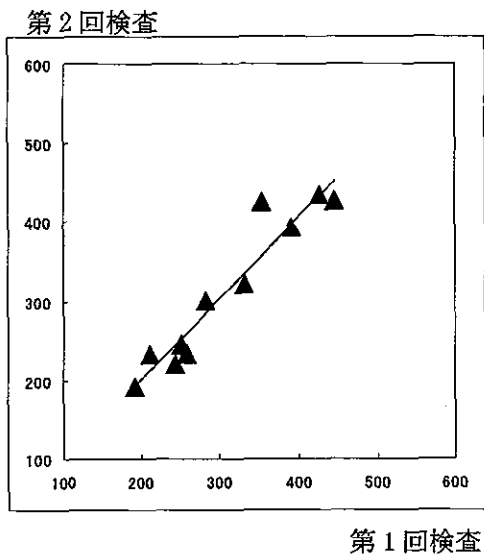


図3 MUNE(面積)、MUNE(振幅)の再現性
左は面積によるMUNEを示し、第1、2回目検査での値の変動が少ない。

右は振幅によるMUNEで、第1回検査の値が大きいほど第2回検査の値が小さくなっており、再現性が悪いことが分かる。

積)が高い再現性を示し、以前の著者らの報告³⁾を支持する結果が得られた。

文 献

- 1) Arasaki K, et al.: Neurology 51:603-605, 1998
- 2) Doherty TJ, et al.: Muscle Nerve 16:355-366, 1993
- 3) Arasaki K, et al.: Muscle Nerve 20:552-560, 1997

遠心系以外の ALS 病変の意義について

林 秀明¹⁾、川田明広¹⁾、清水俊夫¹⁾、長尾雅裕¹⁾、水谷俊雄²⁾

1) 都立神経病院神経内科、2) 検査科

研究要旨

ALS は、長年、呼吸筋麻痺で死亡するまでの臨床と病理像で定義されてきた（「今までの ALS 観」= Charcot ALS）で考えられてきた。しかし、現在の ALS は、呼吸筋麻痺を越えた ALS の臨床病理所見から「運動系に関わる全ての系が障害されうる疾患」であることがわかってきた（「新しい ALS 観」）ので、新たな ALS 疾患概念を再構築しなければならなくなっている。

今回は「遠心系以外の ALS 病変の意義」として、脊髄後索中央根帯（middle root zone=MRZ）変性について、臨床的には四肢筋麻痺、延髄筋麻痺、橋筋麻痺、外眼筋麻痺で TLS を呈し、病理学的には TLS 病変に加えて橋核・中小脳脚病変が加わった事例の臨床病理所見を系統及び個体運動発達の視点から、ALS の橋核・中小脳脚病変も含めて検討した。

はじめに

ALS の疾患概念は、Charcot の 1869 年の報告して以来、呼吸筋麻痺で死亡するまでの臨床と病理像で定義されてきた（「今までの ALS 観」= Charcot ALS）。しかし、医療機器、医療ケアなどの発達で、TPPV（tracheostomy positive pressure ventilation）での長期呼吸療養ができるようになり、ALS の呼吸筋麻痺は ALS の一つの随意筋麻痺で、全 ALS 経過の一過程に過ぎないことが明確となった。

即ち、今までの ALS の診断基準から除外されてきた外眼筋麻痺を含めて全ての随意筋が麻痺する病態（totally locked-in state=TLS）や、病理学的には、Charcot ALS で motor 系に限定していた遠心系病変に加えて、non-motor 系を含む運動遂行に関与する遠心系以外の連合系と求心系の「運動系に関わる

全ての系が障害されうること」がわかってきた（「新しい ALS 観」）。

そのため、現在は、呼吸筋麻痺を越えた ALS の臨床所見と病理所見から、新たな ALS の疾患概念を再構築していかなければならなくなっている。

そこで、私達は、遠心系以外の ALS 病変として、Charcot の時代から十分に議論されてきた ALS 脊髄病変から検討を始めた。脊髄では、「脊髄の連合系と求心系の ALS 病変」として、脊髄前側索変性（pallor of spinal cord in antero-lateral column）と脊髄後索中央根帯（middle root zone=MRZ）変性が ALS の病理像と臨床像間の不一致（clinico-pathological non-correlation）として知られてきた。脊髄前側索変性については、臨床的に ALS の呼吸筋麻痺を通じた全臨床経過から「呼吸運動系先

行麻痺型 ALS」を分離し、その病理像と臨床像の病態を個体運動発達の視点で検討して、脊髄前側索変性が ALS の早期の基本的な臨床像⁽¹⁾であり病理像⁽²⁾であることを報告した。今回は、ALS の MRZ について、その意義を系統及び個体運動発達の視点から検討したので報告する。

対象事例と方法

臨床的には四肢筋麻痺、延髄筋麻痺、橋筋麻痺、外眼筋麻痺で TLS を呈し、病理学的には TLS 病変に加えて、橋核・中小脳脚病変が加わった事例の臨床病理所見を文献も加えて検討した。

症例 47 才男 (橋核・中小脳脚病変をもった TLS 例 : 兄が ALS)

[臨床経過] 1993 年 10 月左下肢筋力低下、翌年 1 月右下肢に線維束性収縮、3 月首下がり、8 月右下肢筋力低下で歩行困難、1995 年 1 月上肢筋力低下、首保持困難、6 月呼吸苦、9 月呼吸器装着、延髄筋麻痺で胃瘻、1997 年 11 月四肢筋麻痺、2000 年 4 月、前頭筋麻痺し眼球運動でコミュニケーションを行っていたが、2000 年 9 月橋筋麻痺で下顎運動麻痺し、2000 年 12 月に外眼筋麻痺でコミュニケーションが困難となり (臨床的に TLS)、2002 年 4 月に難治性肺炎で死亡した。

[病理所見] いわゆる後索型 familiar ALS (FALS) の所見に、淡蒼球、視床下核、黒質、脳幹網様体、上丘、歯状核・赤核、前庭神経核などの TLS の病理所見に加えて、橋核と中小脳脚に変性を認めた。下位運動ニューロン変性として、脳幹諸運動核変性ととも動眼神経主核にも神経脱落を認め、脊髄前角及び中間帯

も含めた細胞変性も高度であった。両側の脊髄小脳路を含め脊髄前側索と MRZ の高度の索変性と Clark 神経細胞の高度脱落あるが中間外側核の脱落は中等度であった。

結果と考察

当院 TLS の 5 剖検例の全例で、MRZ-クラーク核-脊髄小脳路の連続病変を認めたが、MCS の 7 全剖検例では、MRZ に変性を認めたのは 1 例のみであった。FALS を除き、TLS に至るまで孤発型 ALS の MRZ 変性は障害されにくい TLS では全例に認められるので、ALS では基本的に障害されると考えられる。しかし、当院の TLS を含めた全 ALS 剖検例で、ALS の橋核と中小脳脚変性所見は本例の TLS1 例のみで ALS では極めて障害されにくいといえるが、ALS での小脳との関わりを考えていく上では極めて重要な症例と考えられた。

ALS の MRZ 変性は、1957 年に Engel ら⁽³⁾が、「An intermediate form ?」と、ALS と脊髄小脳変性症の移行型に位置づけて報告されたことに始まる。その後、1967 年に平野ら⁽⁴⁾は、FALS の MRZ 変性として、MRZ 病変に関わる詳細な病理像を記載し、クラーク核から脊髄小脳路を経て vermis の異常構造物の蓄積に至るまで、系として繋がった病変を確認している。その後、MRZ-クラーク核-脊髄小脳路変性は、後索型 ALS の FALS に頻度が高い病変として確かめられている。

後索型 ALS の FALS の臨床像は、初発症状が歩行障害など下肢運動障害から発症し、偽多発神経炎型を呈することが多く、MRZ 変性の ALS での運動機能障害の意義を考える上で

は留意すべきことと考えた。

ところで、私達は「ALS の運動系の障害のされ方は個体運動発達の新しい運動機能から障害され古い運動系障害されにくい」という、Jackson の考えが ALS 病変の解釈に適応できることを報告してきた⁽¹⁾⁽²⁾。Engel らは、脊髄で MRZ が最も発達早期に髄鞘化されることを指摘している。このことは、系統運動発達の MRZ が四肢体幹を用いた移動機能の四つ這い動物から極めて重要な役割をもっていることを示している。腹這い、四つ這い、直立姿勢、直立二足歩行へと人間として重要な直立して随意的に二足歩行するという運動機能を制御する機構 (central pattern generator=CPG) を構築していくには、前庭・網様体と脊髄間、前庭・網様体と小脳間、前庭・網様体と大脳間との個体運動発達の機能的連携をもった成長が必須である。その中で、前庭神経核と脳幹網様体とともに、小脳求心系の「MRZ—Clark 核—脊髄小脳路と大脳-橋-中小脳脚」と小脳遠心系の「歯状核-上小脳脚-赤核」の三つの小脳系の機能維持が重要となる。

そして、「最も新しく CPG の機能構築に関与してきた機能から ALS では障害されていく」という、この CPG の機能構築に関与してきた系に加わる ALS 障害に Jackson の考えを適応して考えた。この系の中で、新しく下肢体幹からの MRZ—Clark 核—脊髄小脳路からの求心系と歯状核-上小脳脚-赤核の小脳遠心系の二つの系が個体運動発達の直立二足歩行のための CPG の前運動ニューロン系に属す随意運動系として関与を強いられ、TLS のパルマ

で ALS が進行すると、これらの新たに関与した系が最終的には障害されると考えた。最後に、ALS の橋核と中小脳脚病変について考えたい。

ところで、橋核と中小脳脚病変を伴う ALS の報告は本例を含め 4 例ある。臨床的には、下肢発症例で歩行困難となり小脳症状が認められなかった 2 例と小脳症状を認めた 2 例がある。このような症例は、極めて少ないが上記の CPG を制御する系を先行して障害する ALS として ALS の範疇に含めて考えられうることと、そのような時には三つの小脳系が機能系として障害されることになる。そのために、ALS の四肢筋群、橋・延髄筋群、呼吸筋群、外眼筋群などの他の随意運動筋群の障害を含めた運動障害の程度の組み合わせによっては、臨床的に軽い小脳症状⁽⁵⁾が見いだされることもあることを示している。しかしながら、神経病院の ALS で病理学的に ALS 橋核と中小脳脚病変を伴う例は、TLS の本例だけであったことから系統及び個体運動発達の視点から考えると、ALS で障害されにくいことは大脳-橋-中小脳脚からの小脳求心系は、他の二つの小脳系に比して直立二足歩行獲得過程での関与が少ないことを示唆していると考えられた。

文献

(1) 林秀明、ほか：ALS の全運動筋麻痺までの経過からみた ALS 臨床分類—呼吸運動系先行麻痺型の提唱とその意義— 脳神経 49:435,1997.

(2) 林秀明、ほか：ALS の呼吸運動系先行麻痺型の臨床病理学的検討 脳神経

51:771,1999.

(3) WK Engel, et.al: An inherited disease similar to amyotrophic lateral sclerosis with a pattern of posterior column involvement. An intermediate form? Brain 82:203,1957.

(4) A Hirano,et al: Familiar amyotrophic lateral sclerosis. A subgroup characterized by

posterior and spinocerebellar tract involvement and hyaline inclusions in the anterior horn cells. Arch Neurol 16:232,1967.

(5) 村上信之、ほか：小脳運動失調を初発とし、筋萎縮性側索硬化症類似の病像を呈する症例に関する検討 臨床神経 29:1116,1989.

ハンチントン病モデルマウスにおけるナトリウムチャンネル β4 サブユニットの発現低下

貫名信行¹⁾，小山文隆¹⁾，宮崎晴子¹⁾，池田哲朗¹⁾，町田陽子¹⁾，金子貢巳¹⁾
黒沢大¹⁾，櫻井隆¹⁾

1) 独立行政法人理化学研究所脳科学総合研究センター構造神経病理研究チーム

研究要旨 我々はハンチントン病トランスジェニックマウス脳で発現が顕著に低下する分子としてナトリウムチャンネルβ4 サブユニットを同定した。RT-PCR、イムノブロット、in situハイブリダイゼーションそして免疫組織化学的解析でβ4 サブユニットは主として線条体で発現し、トランスジェニックマウスで HD 様症状が認められる前から発現が低下することを示した。さらにβ4 の発現低下は HD 患者脳でも認められた。 [³H] バトラコトキシンの線条体シナプトソーム膜への結合を測定したところ、トランスジェニックマウスではナトリウムチャンネル密度が低下していた。β4 を過剰発現すると、Neuro2a 細胞では神経突起伸長の促進、海馬初代培養細胞では樹状突起の肥厚ならびにスパインの増加が認められ、β4 に神経突起伸長活性があることが分かった。これらの結果から、HD トランスジェニックマウス、患者の線条体におけるβ4 の発現低下はナトリウムチャンネルの機能障害と神経突起の変性を生じさせる可能性が考えられた。

はじめに

ハンチントン病(HD)は CAG リピート病の一種で、典型的な常染色体優性遺伝の形質を示す遺伝病である¹⁾。この病気の原因は病因遺伝子であるハンチンチンの exon 1 領域に存在する CAG トリプレットリピートの伸長であり、翻訳産物のハンチンチンの伸長 polyglutamine (poly Q) が原因となり HD が発症する²⁾。

これまで HD の発症メカニズムに関しさまざまな研究がなされており、伸長 poly Q 断片が核内封入体を作りその過程で転写因子などを取り込むことで遺伝子発現が変化し発症にいたる、などの仮説が提唱されている³⁾。

我々は HD の発症に密接に関係する遺伝子を検索するために伸長 poly Q を発現するトランスジェニックマウスを DNA チップ法で解析し⁴⁾、線条体で強く発現し、HD マウスモデルで発現が著しく低下する分子としてナトリウムチャンネルβ4 サブユニットを同定した。この分子は線条体細胞膜表面のナトリウムチャンネルのナトリウムチャンネル密度ならびに培養細

胞での神経突起伸長を調節していることを示す。

方法

DNA チップ

190Q を EGFP と融合タンパク質として発現するトランスジェニックマウスと同腹のコントロールの脳における発現プロファイルを DNA チップ (Affymetrix 社 GeneChip) で比較した⁴⁾。

同定した遺伝子の脳での発現変化の確認

同定した遺伝子のトランスジェニックマウス脳での発現変化は TaqMan RT-PCR、in situ hybridization、イムノブロット、および免疫組織化学法で解析した。

HD をめぐる研究では R6/2 と呼ばれるトランスジェニックマウスが最もよく調べられている。そこでここでの研究ではそのマウスを使って解析を進めた。

遺伝子発現低下のナトリウムチャンネル活性

への影響

ナトリウムチャンネルを構成している成分の発現が低下するとチャンネルの本体の活性が低下する可能性が高い。そこで、トランスジェニックマウス脳でナトリウムチャンネル活性が低下しているかどうかをナトリウムチャンネル α サブユニットのサイト2への ^3H バトラコトキシンの結合性で調べた。

同定した遺伝子の過剰発現の影響

Neuro2a、線条体の初代培養細胞に一過的に過剰発現しその影響を調べた。

結果と考察

ナトリウムチャンネル $\beta 4$ サブユニットは HD トランスジェニックマウス脳で顕著に発現が低下する

我々はトランスジェニックマウス脳で発現が顕著に低下する EST(AI847519)を同定した。この分子はコントロール脳では主として線条体で発現し、トランスジェニックマウス脳ではその発現が顕著に低下していた。Bioinformatics 的手法で、この EST がナトリウムチャンネル $\beta 4$ サブユニット cDNA の3'末端領域由来であることを明らかにした。

$\beta 4$ 遺伝子発現低下は症状が顕著になる前に始まっている

$\beta 4$ の発現低下を mRNA レベル (TaqMan RT-PCR)、タンパク質レベル (特異抗体を用いたのイムノプロット法) で検討した。 $\beta 4$ は R6/2 での症状が認められる前から発現が低下し、症状が現れる頃には発現が顕著に低下していた。

HD トランスジェニックマウス、患者脳では $\beta 4$ の発現が低下している

In situ ハイブリダイゼーション法と免疫組織化学法で $\beta 4$ の脳内での発現を調べたところ、 $\beta 4$ はコントロールマウスの線条体で高いレベルで発現し、症状を示す時期のトランスジェニックマウス脳ではほとんど発現しなくなった。 $\beta 4$ の発現低下は HD 患者脳でも認められた。

$\beta 4$ は脊髄運動神経細胞にも発現していたがトランスジェニックマウスでは発現が低下し

ていなかった。

ユビキチン化された封入体の存在と $\beta 4$ の発現低下には相関関係がある

症状を示す前に R6/2 マウスの脳内には伸長 poly Q とユビキチンからなる神経細胞核内封入体 (NIIs) が形成される。神経症状を示すトランスジェニックマウスの脊髄運動ニューロンでは NIIs がほとんど形成されず、 $\beta 4$ を強く発現していた。これに対し、線条体の神経細胞ではユビキチン陽性の NIIs が多数認められ、 $\beta 4$ の発現が顕著に低下していた。

トランスジェニックマウスの線条体シナプトソーム画分ではナトリウムチャンネルの密度が低下している

^3H バトラコトキシンの線条体シナプトソーム膜への結合測定から、トランスジェニックマウスではナトリウムチャンネル密度の低下があることが分かった。

$\beta 4$ を過剰発現すると、Neuro2a 細胞では神経突起の伸長の促進、海馬初代培養細胞では樹状突起の肥厚ならびにスパインを増加させた

$\beta 4$ は $\beta 2$ サブユニットと構造的に類似している。両分子には IgG 様ドメインが存在し、 $\beta 2$ ではこの領域に細胞接着活性があることが知られている。そこで、 $\beta 4$ を培養細胞で過剰発現し細胞接着活性について検討した。

Neuro2a 細胞で $\beta 4$ を過剰発現すると形態変化がおり、神経突起が伸長し、分枝の数が増加した。Array Scan で定量したところ、神経突起の長さ、分枝の数が有意に増加していた。

この突起伸長活性をさらに検討するために海馬初代培養に $\beta 4$ を発現したところ、樹状突起の肥厚ならびにスパインの増加が認められた。

結論

HD トランスジェニックマウス、患者の線条体における $\beta 4$ の発現低下によってナトリウムチャンネルに機能障害と神経突起の変性を生じる可能性が示唆された。

文献

- 1) Harper, P. S. *Huntington's Disease* (London: W. B. Saunders) (1991).
- 2) Huntington's Disease Collaborative Research Group. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell* **72**, 971-83 (1993).
- 3) Mitsui et al. Purification of polyglutamine aggregates and identification of elongation factor-1 α and heat shock protein 84 as aggregate-interacting proteins. *J Neurosci* **22**, 9267-77 (2002).
- 4) Kotliarova et al. Decreased expression of hypothalamic neuropeptides in Huntington disease transgenic mice with expanded polyglutamine-EGFP fluorescent aggregates. *J Neurochem* (2005) in press.

Unified Huntington's Disease Rating scale (UHDRS) の問題点

研究報告者 長谷川一子¹⁾
研究協力者 堀内恵美子¹⁾, 武藤香織²⁾, 加藤元一郎³⁾
古和久幸⁴⁾, 辻 省次⁵⁾, 小幡文弥⁶⁾

- 1) 国立病院機構相模原病院神経内科
- 2) 信州大学医学部保健学科社会学研究室
- 3) 慶應大学精神神経科

研究要旨 Unified Huntington's disease rating scale (UHDRS) は 1996 年 movement disorders society の Huntington Study Group によって作成されたハンチントン病 (HD) 重症度を診断する際に用いられる評価尺度である (1999 年に改訂). 我が国では汎用されているとはいえ、日本語版についての信頼性は未だ検討されていない. 我々は臨床的に実際に UHDRS 原版を用いて HD 患者を診察し、scale 自体の問題点について検討を行った. 方法は Unified Huntington's Disease Rating Scale (原版 *Movement Disorders*; 136-142, 1996) を用いて、実際に HD 患者の診察を行い、主に motor assessment と cognitive assessment についての問題点を検討した. その結果、以下の項目が明らかとなった. 1. 罹病期間に比例して、Motor assessment は high score となり、cognitive assessment は low score となる傾向を示し、罹病期間と重症度を反映し得る評価尺度だと考えられた. 2. 患者、医師間でラ・ポールがとれた状態だとしても患者の精神的な緊張により、運動症状は顕著な増悪を示した. また、この評価尺度では、chorea score や dystonia score に関して、maximal の状態で評価するが、診察の仕方を統一しないと検者間で評価がばらつく可能性があることも示唆された. 3. Cognitive assessment については、日本語版も存在するが、評価フォームの入手も含めて日本人用に整備されているとはいえ、現段階での臨床での使用は困難と考えられた. わが国でも UHDRS 日本語版を作成し、その信頼性を評価しようという動きがあるが、以上のような問題点をクリアにしたうえでより汎用性の高い評価尺度が作成されることが望まれる. ことに、HD はパーキンソン病よりも精神障害の頻度が高く、精神症状により運動症状の評価が変化する可能性もあるため、この点に十分な配慮が必要と考える.

はじめに

Unified Huntington's disease rating scale (UHDRS) は 1996 年、movement disorders society の Huntington Study Group によって作成されたハンチントン病 (HD) の臨床的な評価尺度であり¹⁾ (1999 年に改訂²⁾ されたが未出版である. 1999 年度版は共同研究者の武藤を通じて入手した. なお、'99 年版は武藤による翻訳版も存在する³⁾, motor assessment, cognitive assessment, behavioral assessment, functional assessment, independence scale, functional capacity の 6 項目で構成されている. 欧米ではすでに HD に対する amantadine⁴⁻⁶⁾, riluzol⁷⁾, minocycline⁸⁾ などの薬剤の効果を判定する目的で頻繁に使用されているが、わが国では汎用されているとはいえ、日本語版⁹⁻¹²⁾ についての信頼性は未だ検討されていない. 我々は臨床的に実際に UHDRS 原版を用いて HD 患者を診察し、主に motor assessment と cognitive assessment についての問題点を中心に

scale 自体の問題点について検討した.

対象及び方法

Unified Huntington's Disease Rating Scale (原版 *Movement Disorders*; 136-142, 1996) を用いて、実際に罹病期間 2 年から 15 年までの HD 患者 5 人に対し、実際に診察を行った. Motor assessment の評価に関しては、付録のビデオテープを参考にした.

以下に UHDRS, '96 年版の概略を示す. 全体は 6 章に分けられ、それぞれについて検討項目が数項目あり、それぞれ評価点数が決められている. cognition 以外は障害が大きくなるほど点数が高く、cognition のみ点数が低いほど障害が強い. このため、各パートごとの評価をすることとなる. 以下に各項目について列記する.

1. motor assessment: 15 項目, 31 項 (各 0-4 点で評価) 最高点は 124 点
2. cognitive assessment

表 1. UHDRS を行った HD 症例の概略と independence scale

| | 罹患期間 (年) | 服用薬剤 (mg) | Independence Scale |
|----------------|-------------|---|---------------------|
| 症例 1 (49/F) | 2 | Am (150), AMO(75), THP (6), amy (30), CBZ (400) | 090 |
| 症例 2 (33/M) | 3 | Amy (300), CZP (3), Sul (800), RIS (3), CBZ (400) | 060 (rigid type) |
| 症例 3 (55/F) | 7 | Am (300), Sul (600), RIS(4), HPD(1), CBZ (200) | 050 |
| 症例 4 (60/M) | 8 | Am (150), RIS (6), CLM(25), THP (6), CBZ (200) | 050 |
| 症例 5 (60/F) | 15 | Am (150), LPZ (50), Sul (500), CBZ (200) | 010 |

Am: amantadine, AMO: amoxiapine, amy: amytriptyline, CBZ: carbamazepine, CLM: clomiplamine, CZP: clonazepam, HPD: haloperidola, LPZ: levopepromazine, RIS: risperidon, Sul: sulpiride, THP: trihexyphenidyl

3. behavioral assessment: 11 項目 22 項を 0-4 点で評価し, 5 項目を Yes=1/No=2 で解答する.

4. functional assessment: 24 項目を Yes=1/No=2 で解答する.

5. independence scale: 10 段階評価

6. HD functional capacity: 5 項目を 0-3 点で評価する.

満点 (90 秒), Stroop Interference Test (SIT) は 72 点満点 (各 45 秒間) で, 1~3 の項目は 17 歳以上に使用可能で日本語版 (日本失語症学会) があり, 協同研究者の加藤より提供された. 3. については日本語版と英語版で評価のために必要な色のカラムの大きさが異なっていた. 本研究では日本語版を用いた.

なお, UHDRS は 1999 年に minor change が行われ, 欧米では 1999 年改定版が現在, 使用されている.

次に, motor assessment と cognitive assessment の項目を列記する.

1) Motor assessment: (括弧内は評価点数の最低 0 から最高 124 点を示す)

1. oculomotor: (0-24), 2. bradykinesia/fine motor: (0-44) {dysarthria, tongue protrusion, finger taps, pronate/spinate-hands, LURIA, bradykinesia body, retro pulsion, tandem walk, gait}, 3. rigidity-arms (0-8), 4. maximal dystonia (0-20) 四肢と体幹, 5. maximal chorea (0-28) {四肢, 顔面, 頬, 口腔, 舌, 体幹}

2) Cognitive assessment:

1. verbal fluency test: VFT, 2. Symbol digit modalities test: SDMT, 3. Stroop Interference Test (SIT) の 3 項目で構成される.

verbal fluency test (VFT) は粗点を用い, 英語版は (F-A-S), 日本語版は (し-い-れ) で始まる単語を各 1 分間で解答し, 単語数が得点となる.

Symbol Digit Modalities Test (SDMT) は 110 点

結果

実際に診察した HD 患者の臨床的な特徴について表 1 に示す. UHDRS を適応した結果について以下に項目別に述べる.

1. 臨床像からみた UHDRS

罹病期間が長くなるほど, Motor assessment は high score, cognitive assessment では low score となる傾向が認められ, UHDRS は罹病期間や重症度を反映し得る評価尺度だと考えられた. しかし, 患者-医師間でラ・ポールがとれた状態においても, 患者の検査などに対する精神的な緊張により, 運動症状は顕著な増悪を示し, 通常の病態を反映し難い側面も明らかであった.

2. Motor assessment

評価法について文面のみでは理解しがたく, 1996 年度版を紹介する雑誌付録のビデオテープを参考にしなければ施行できない項目 (LURIA) も存在した. また chorea score や dystonia score に関して, maximal の状態で評価することとされているが, 診察の仕方を統一しないと検者間で評価が変動する可能性があることも示唆された.

3. cognitive assessment