

position between LBs and GCIs have not yet be clarified, at present we have no reasonable explanation for these empirical differences. One possibility is that a difference in the  $\alpha$ -synuclein molecule itself, or its modification, leads to a conformational state specific to LBs or GCIs, thereby exhibiting distinct argyrophilic property, affinity to TR and ultrastructure. As we reported previously, the argyrophilic properties of tau-positive deposits are linked to its isoform; tau-positive deposits containing mainly 4R tau, as seen in CBD/PSP [21] and AGs [22], are labeled with GB but not with CS, whereas those containing mainly 3R tau, as seen in Pick bodies, exhibit argyrophilia with CS but not with GB [23]. Because deposits containing 3R and 4R tau exhibit argyrophilia with both CS and GB, it is likely that those containing 3R tau are linked to argyrophilia with CS and those containing 4R tau deposits are linked to GB. Thus, it is possible that molecules associated with  $\alpha$ -synuclein may differ and yield different staining properties.

Although silver staining methods are useful tools in the diagnosis of neurodegenerative diseases [20], little is known regarding the mechanism of argyrophilia [8, 10]. It is interesting that the lack of argyrophilia with GB, as seen in LBs, is shared with Pick bodies [23]. Moreover, colocalization of  $\alpha$ -synuclein and tau epitopes is frequent in various degenerative processes [1], and these two proteins may interact during the formation of aggregates [9]. It is then possible that tau and synuclein undergo similar conformational changes to be detected with CS but not with GB, as seen in Pick bodies and LBs. Even though, the empirical distinction based on these argyrophilic profiles is of help in the histological diagnosis of synucleinopathies, the mechanism responsible for these changes in vivo still need to be determined. Another advantage of these silver stainings is that they will give, at lower cost, more consistent results than immunohistochemistry, especially when dealing with old archival sections [15]. Furthermore, identities of LBs and GCIs are frequently confounded in experimental paradigms by grouping them as synuclein-positive aggregates without discriminating them. Although the molecular identities of LBs and of GCIs remain to be clarified, defining these inclusions based on various methods, such as with silver staining, is of great advantage because other biochemical or immunohistochemical features fail to discriminate these two distinct  $\alpha$ -synuclein-positive inclusions. It is obvious that further studies are needed to identify possible differences in the molecular composition of LBs and GCIs. At present, silver staining profiles, possibly distinctive and representative of each type of inclusions, provide a unique method of classifying not only tau-related but also  $\alpha$ -synuclein-related deposits, which may be helpful in diagnosing and understanding synucleinopathies and tauopathies.

**Acknowledgements** Supported in part by the grant from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (grant in aid for scientific research B15300118) to T.U.

## References

1. Arima K, Hirai S, Sunohara N, Aoto K, Izumiyama Y, Ueda K, Ikeda K, Kawai M (1999) Cellular co-localization of phosphorylated tau- and NACP/alpha-synuclein-epitopes in Lewy bodies in sporadic Parkinson's disease and in dementia with Lewy bodies. *Brain Res* 843:53–61
2. Braak H, Braak E (1999) Silver staining method for demonstrating Lewy bodies in Parkinson's disease and argyrophilic oligodendrocytes in multiple system atrophy. *J Neurosci Methods* 87:111–115
3. Braak H, Braak E, Ohm TG, Bohl J (1988) Silver impregnation of Alzheimer's neurofibrillary changes counterstained for basophilic material and lipofuscin pigment. *Stain Technol* 63:197–200
4. Campbell SK, Switzer RC, Martin TL (1987) Alzheimer's plaques and tangles: a controlled and enhanced silver staining method. *Soc Neurosci Abstr* 13:67
5. Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, Kawashima A, Masliah E, Goldberg MS, Shen J, Takio K, Iwatsubo T (2002) alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol* 4:160–164
6. Gallyas F (1971) Silver staining of Alzheimer's neurofibrillary changes by means of physical development. *Acta Morphol Acad Scient Hung* 19:1–8
7. Galvin JE, Lee VM, Trojanowski JQ (2001) Synucleinopathies: clinical and pathological implications. *Arch Neurol* 58:186–190
8. Gambetti P, Autilio-Gambetti L, Papasozomenos SC (1981) Bodian's silver method stains neurofilament polypeptides. *Science* 213:1521–1522
9. Giasson BI, Forman MS, Higuchi M, Golbe LI, Graves CL, Kotzbauer PT, Trojanowski JQ, Lee VM (2003) Initiation and synergistic fibrillization of tau and alpha-synuclein. *Science* 300:636–640
10. Iqbal K, Braak E, Braak H, Zaidi T, Grundke-Iqbal I (1991) A silver impregnation method for labeling both Alzheimer paired helical filaments and their polypeptides separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Neurobiol Aging* 12:357–361
11. Jakes R, Crowther RA, Lee VM, Trojanowski JQ, Iwatsubo T, Goedert M (1999) Epitope mapping of LB509, a monoclonal antibody directed against human alpha-synuclein. *Neurosci Lett* 269:13–16
12. Nakazato Y, Yamazaki H, Hirato J, Ishida Y, Yamaguchi H (1990) Oligodendroglial microtubular tangles in olivopontocerebellar atrophy. *J Neuropathol Exp Neurol* 49:521–530
13. Papp MI, Kahn JE, Lantos PL (1989) Glial cytoplasmic inclusions in the CNS of patients with multiple system atrophy (striatonigral degeneration, olivopontocerebellar atrophy and Shy-Drager syndrome). *J Neurol Sci* 94:79–100
14. Sakamoto M, Uchiyama T, Hayashi M, Nakamura A, Kikuchi E, Mizutani T, Mizusawa H, Hirai S (2002) Heterogeneity of nigral and cortical Lewy bodies differentiated by amplified triple-labeling for alpha-synuclein, ubiquitin, and thiazin red. *Exp Neurol* 177:88–94
15. Sandmann-Keil D, Braak H, Okochi M, Haass C, Braak E (1999) Alpha-synuclein immunoreactive Lewy bodies and Lewy neurites in Parkinson's disease are detectable by an advanced silver-staining technique. *Acta Neuropathol* 98:461–464
16. Switzer RC III (1993) Silver staining methods: their role in detecting neurotoxicity. *Ann NY Acad Sci* 679:341–348
17. Uchiyama T, Nakamura A, Yamazaki M, Mori O (2000) Tau-positive neurons in corticobasal degeneration and Alzheimer disease—Distinction by thiazin red and silver impregnation. *Acta Neuropathol* 100:385–389
18. Uchiyama T, Nakamura A, Yamazaki M, Mori O (2001) Evolution from pretangle neurons to neurofibrillary tangles monitored by thiazin red combined with Gallyas method and double immunofluorescence. *Acta Neuropathol* 101:535–539

19. Uchihara T, Nakamura A, Yamazaki M, Mori O, Ikeda K, Tsuchiya K (2001) Different conformation of neuronal tau deposits distinguished by double immunofluorescence with AT8 and thiazin red combined with Gallyas method. *Acta Neuropathol* 102:462–466
20. Uchihara T, Ikeda K, Tsuchiya K (2003) Pick body disease and Pick syndrome. *Neuropathology* 23:318–326
21. Uchihara T, Shibuya K, Nakamura A, Yagishita S (2005) Silver stains distinguish tau-positive structures in corticobasal degeneration/progressive supranuclear palsy and in Alzheimer's disease—Comparison between Gallyas and Campbell-Switzer methods. *Acta Neuropathol* 109:299–305
22. Uchihara T, Tsuchiya K, Nakamura A, Akiyama H (in press) Argyrophilic grains are not always argyrophilic—Distinction from neurofibrillary tangles of diffuse neurofibrillary tangles with calcification revealed by comparison between Gallyas and Campbell-Switzer methods-. *Acta Neuropathol* DOI: 10.1007/s00401-005-1031-7
23. Uchihara T, Tsuchiya K, Nakamura A, Akiyama H (2005) Silver staining profiles distinguish Pick bodies from neurofibrillary tangles of Alzheimer type—Comparison between Gallyas and Campbell-Switzer methods. *Acta Neuropathol* 109:483–489

Neurological CPC - 116

著しい中心前回の萎縮と注目すべき組織学的所見を伴う  
多系統萎縮症

山岡由美子	平井 健	川田 明広	磯崎 英治
板東 充秋	望月 葉子	小森 隆司	内原 俊記
小柳 清光	水谷 俊雄	林 秀明	

脳 と 神 経

第57巻 第3号 別刷

2005年3月1日 発行

医学書院

## 著しい中心前回の萎縮と注目すべき組織学的所見を伴う 多系統萎縮症\*

山岡 由美子<sup>1)</sup> 平井 健<sup>1)</sup> 川田 明 広<sup>1)</sup>  
磯崎 英 治<sup>1)</sup> 板東 充 秋<sup>1)</sup> 望月 葉 子<sup>2,5)</sup>  
小森 隆 司<sup>3)</sup> 内原 俊 記<sup>4)</sup> 小柳 清 光<sup>5)</sup>  
水谷 俊 雄<sup>2)</sup> 林 秀 明<sup>1)</sup>

**Key words :** multiple system atrophy, progressive supranuclear palsy, corticobasal degeneration, precentral cortex, frontal lobe atrophy

### 症例呈示

司会(神経内科 川田) 今日臨床的に多系統萎縮症(MSA)と診断された症例を取り上げます。それでは早速、主治医の山岡先生、症例の呈示をお願いします。

主治医(神経内科 山岡) 症例は死亡時65歳の女性です。65歳で急性胆嚢炎に罹患した既往があります。家族歴には特記すべきことはありません。現病歴ですが、1995年2月、つまずき易さで発症し、5月、左手の振戦、7月、呂律不良と立ちくらみ、8月、歩行時のふらつきが出現したため、当科外来を受診されました。同年9月、第1回入院し、左優位のparkinsonism、小脳失調、深部腱反射亢進、頭部MRI所見(橋横走線維の変性、小脳脳幹の萎縮、右優位の被殻の萎縮)から、MSAと診断されました。TRH(甲状腺刺激ホルモン)は無効でした。翌1996年、家事が困難となり、8月第2回の入院となりました。排尿検査で detrusor- (external) sphincter dyssynergia (DSD) 陽性、無抑制膀胱と診断されました。抗Parkinson病薬は無効で、杖歩行で退院されました。1998年、無動、構音障害、排尿障害などの悪化と夜間のいびきで同年4月第3回目の入院をされました。咽頭鏡(diazepam 負荷なし)で声帯麻痺はみられませんでした。この時は

車椅子を使用していました。

2000年、嚥下障害が進行し、1月、第4回入院。経管栄養が開始されました。この後、膀胱カテーテルが留置されました。唾液や痰の吸引が頻繁になり、同年9月、第5回入院時に喉頭気管分離/食道喉頭吻合術を施行し、これによってミキサー食の経口摂取が可能となりました。術後の安静臥床によって両下肢は著明な屈曲拘縮となりました。また、覚醒時にも声門狭窄がみられました。2002年5月、発熱のため第6回入院。低Na血症(119 mEq/l)が判明し加療しました。

2003年、夜間の無呼吸と嚥下障害が増強したため6月入院。その時、仮面様顔貌、顔脂、強迫泣きがありました。ごく単純な内容に限って、時に表情が変わることがありましたが、実質的な意思疎通は困難でした。呼吸は浅く、数秒の無呼吸が頻繁に出現するため、酸素0.5 l/分を使用し、動脈血酸素飽和度95%前後に保ちました。酸素を中止すると酸素飽和度90%以上を維持できない状況でした。無動が強く、笑い顔になる時以外の自発的な運動は消失していました。首は後屈、両上肢は屈曲拘縮、両下肢は伸展位でした。上肢は cog-wheel rigidity、下肢と頸部は rigidospastic でした。Rhythmic myoclonus (静止時<姿勢時、上肢優位かつ左優位)が認められました。Jaw jerk は陽性、snout reflex も陽性でした。四肢深部腱反射は亢進していま

\* Multiple System Atrophy Characterized by Precentral Atrophy and Remarkable Histological Findings

<sup>1)</sup> 東京都立神経病院神経内科 <sup>2)</sup> 同 検査科病理診断部門 <sup>3)</sup> 東京都神経科学総合研究所臨床神経病理部門 <sup>4)</sup> 同 神経病理部門 <sup>5)</sup> 東京都北療育医療センター内科

[連絡先] 水谷俊雄: 東京都立神経病院検査科病理診断部門(〒183-0042 東京都府中市武蔵台 2-6-1)

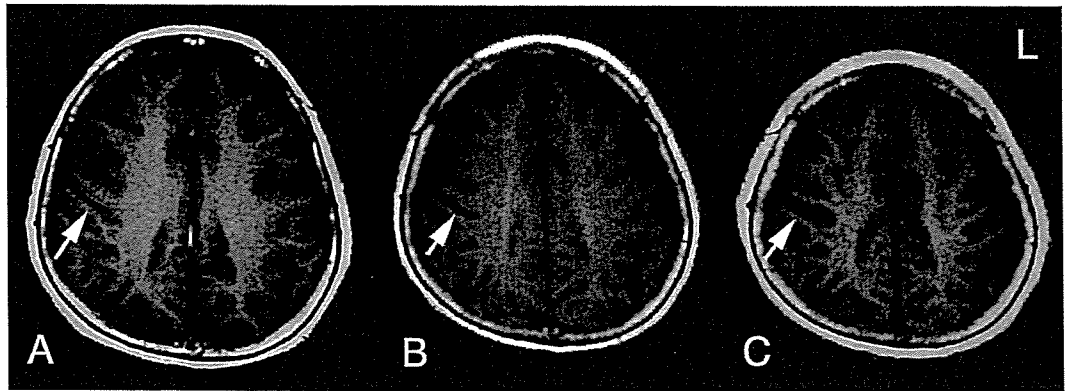


図1 中心前回のMRI画像 A:発症3年目(1998年),B:発症5年目(2000年),C:発症8年目(2003年)。  
Lは左側,矢印は中心溝。

したが、palmomental, Hoffmann, Babinskiの各反射は陰性、強制把握は両側陽性でした。喉頭気管分離/食道喉頭吻合術後状態で、経管栄養を行いました。6月12日、経皮的内視鏡的胃瘻造設術を行いました。その後、急性胆嚢炎を併発したためSBT/CPZで加療し治癒しました。7月16日退院となりました(退院時Na 131 mEq/l, 経管食に食塩3g/日を添加)。

しかし、2003年7月28日から37°C台の発熱が出現し、無呼吸が増加しました。同月31日、突然酸素飽和度が60%に低下したため、酸素投与下で補助呼吸を施行しつつ府中病院に救急搬送されました。診察中、全身痙攣が出現し、diazepam静注施行後、当院ICUに第7回目の入院となりました。

入院時は呼吸停止状態でした。その後も左向き共同偏視を伴う右優位の全身痙攣が2回あり、除皮質硬直様肢位をとっていました。その後、微弱な自発呼吸と無呼吸を繰り返していましたが、17時頃から補助呼吸は不要となりました。低Na血症(115 mEq/l)による全身痙攣と考え、乳酸リンゲル液1,000 ml/日とdiazepam座薬を使用して様子を見ましたところ、呼吸状態がさらに回復し安定したため、9月22日退院となりました。

その後、発熱などのトラブルはありませんでしたが、2003年10月28日から無呼吸が増え、11月3日夜から呼吸が粗く不規則になり、11月5日午後から酸素飽和度が徐々に低下しました。家庭医が補助呼吸すると容易に酸素飽和度は正常化しましたが、翌日早朝から再び酸素飽和度が低下しまして、同日午前7時5分、家庭医により死亡が確認され、当院にて病理解剖が行われました。全経過約8年9カ月でした。

司会 続いて画像を説明していただけますか。

主治医 1995年の<sup>99m</sup>Tc-ECD SPECTですが、すでに中心溝領域に左優位に血流の低下の所見があります。1996年9月、発症1年7カ月のMRI所見です。これは1995年の所見と同じですが、既にT2強調画像で橋横走線維の変性、十字サインが認められています。それから、T2強調画像で両側被殻後方外側域の低信号と右側ではその外側に線状の高信号域がみられます。少し中心前回の信号強度が上がっているようにもみられますが、明確な萎縮はありません。被殻の変化は冠状断でより明確に認められています。次が1998年、発症3年目の所見です。小脳、脳幹の萎縮は進行し、十字サインや両側被殻の萎縮もより明確になっています。T2強調画像で中心溝の開大がはっきり認められます(図1A)。実質の信号強度の変化についてはequivocalと思われま。前頭葉の萎縮についてははっきりしませんが、側頭葉は若干萎縮傾向があると思います。T2強調画像の矢状断では脳幹全体の萎縮は認められますが、中脳被蓋の萎縮はないと思います。次は2000年、発症5年目のMRIでは、小脳脳幹の萎縮はより進行しています。被殻はかなり萎縮していて、側頭葉の萎縮もはっきりしてきています。中心溝も開大しています(図1B)。矢状断では脳幹の萎縮がより進行していますが、中脳被蓋の萎縮はとれるかとれないかというところ。2002年、発症から7年目のMRIでは、より一層小脳脳幹の萎縮が進み、大脳の萎縮も進行して脳室が拡大してきています。被殻は線状になっています。大脳の萎縮は側頭葉優位、前頭葉は軽度で、中心溝は開大しています。中脳被蓋の萎縮ははっきりしません。同時期の2002年の<sup>99m</sup>Tc-ECD SPECTでは、中心溝領域の脳血流低下域が前頭葉方向に広がってきていると思われま。そし

て2003年、8年目のMRIでは、先ほどからお示している所見がより高度となっております(図1C)。以上です。

司会 ありがとうございます。以上が臨床経過と主な検査結果で、だいたい全ての臨床を呈示していただいたと思います。

### 鑑別診断

内原(神経研) 眼球運動障害があったようですが、疾患を鑑別できるような所見がありましたか。

主治医 眼球運動障害に関しては、最初に記載があったのは発症5年目で、垂直方向に上下とも3/5ということです。それ以前では、上方向に4/5という記載がたまにあります、fullという記載が多かったです。次の入院の7年目はもう眼球が追視できないということで、oculocephalic reflexについては所見の記載がなかったのですが、上下方向の動きについては評価が困難な状況にあったということです。Oculocephalic reflexがみられていない状況で核性、核下性、核上性の区別は難しいかもしれません。それから、どの程度のattentionを払って上下に追視したかという問題もあるかと思いますが、カルテ上、一応、発症5年半後の2000年から記載があります。

内原 Babinski 徴候の記載が1回だけありますね。MSAでは比較的陽性になる方が多いのかと思っていますが、この方の場合には他の錐体路徴候が早い時期にはっきりしているし、Babinski 徴候だけがずっと陰性なのでしょうか。大脳皮質に病変がある症例はやはり錐体路徴候も起こり方が違うのか、といったことも考えたりするんですが、記載上ではどうなっていますか。

主治医 ずっとマイナスです。ただし、非常に痙性が強くて足指が硬いので、マスクされた可能性は否定できません。

司会 私も以前亡くなったMSAの患者さん37例くらいの方の経過をretrospectiveに追ったことがあるんですが、四肢深部腱反射の亢進はMCA-C型で84%でしたが、Babinski 徴候の頻度はMCA-C型で89%、MCA-P型で84%と若干低いですね。また、経過中にBabinski 徴候が陽性に出るという記載は確かにあるんですけど、その後消失したり、判定が困難になる場合が多くみられます。

内原 最後のほうでけいれんがみられていますが、そのetiologyというか、MSAに関連したものと考えてよいかどうか、ということをお尋ねしたいのですが。

主治医 全身けいれんについては低Na血症で説明可能かと思っております。その理由はNaを補正する

と消失するというに基づきます。

内原 けいれんも低Na血症で説明できるかもしれないけど、MSAでもありうるのでしょうか。

磯崎 反射性ミオクローヌスが重畳し、statusの状態になるとけいれん発作のようにみえることはあります。しかし、本当の意味のseizureというのは多くないと思います。一般的とは思えません。文献的にもあまり言われていないと思いますが、川田先生いかがですか。

司会 ほとんど文献上での記載はないと思います。

望月 この方ではrhythmic myoclonusが出現していますが、これについてはどうでしょうか。

磯崎 Rhythmic myoclonusは表面筋電図で初めて分かるわけですが、見た目はですね、Parkinson病(PD)のtremorとまったく同じなんです。それらとreflex myoclonus、すなわちstartle responseとは症候学的には全然違います。もちろん両方伴っている方もいますが、どちらが多いとか少ないかという目ではあまりみていません。機序はまだよく分かっていません。いずれにしても寝たきりになってくると出てくる症候には間違いないと思います。

司会 そうしますと、臨床経過と画像所見を併せて、特徴的なMSAの所見はあったと思いますけど、それ以外に当初から中心溝付近で血流が低下したこととか、その後それより前のほうの血流が低下していったこと、それから中脳被蓋あたりの萎縮についても言及されたわけですが、それらについてどう考えていたのでしょうか。

主治医 私が直接拝見しているのは2003年からです。この前のことについてはカルテおよびサマリーを読むことしか情報としてはないのですが、全体の経過からみても、左優位のparkinsonismと小脳失調がかなり初期から高度で、失行とか失認という記載はありませんでした。そういうことで、中心溝の血流低下の意味は分かりませんが、MSAの典型的な像を呈しながらも、左優位の左右差がはっきりあったということで、これは少し変わっているなという印象を代々の主治医は持っていたようです。

院長 無動という表現がありますが、これはrigidityによって動きがとれないということですか、それともakinesiaですか。

主治医 Rigidityは初期から左優位に3/4くらいに認められていて、頸もかなり早い時期に4/4の記載がありますので、rigidityとakinesia両方による無動だと思って理解していました。

司会 この症例はretrocollisのような感じがあった

のですが、磯崎先生、他のMSAの患者さんの体験ではどうでしょうか。

磯崎 Retrocollisはnonspecificというか、起こっておかしくないとは思いますが。画像をみると徐々に変な角度で撮られており、だんだんOM lineに平行には撮れなくなってきている。ああいう画像をみるとやはり大なり小なりですね、retrocollisの傾向が出てくるんだと思います。

院長 Postureの変化がどこに起因しているかということですが、初めは安静臥床で両下肢は著明な屈曲拘縮となり、後になると両上肢屈曲、両下肢は伸展位に変わっているんですね。

主治医 最初は上肢屈曲、下肢伸展位で、術後のみ四肢屈曲位となり、その後術前の肢位に戻ったという経過です。

院長 2003年では頸が後に曲がって、両上肢屈曲で両下肢伸展位はその後、最後まであるんですね。

主治医 はい、ありました。

院長 両上肢の屈曲拘縮は後の除皮質硬直様肢位とイコールですか？

主治医 振り返ってみますと、除皮質硬直様肢位というより両側性のWernicke-Mann肢位という印象です。

院長 Cortical atrophyなどMRIの経過を丁寧にみてくれていますので、posturalの変化がどこのlesionに関わりがあるのかと思いました。それから、嚥下障害と無呼吸の関係です。私はMSAでは呼吸と嚥下障害とは密接に関わりがあり、呼吸に関する障害は嚥下障害の進行に関わっている気がしていました。この方の場合、嚥下障害はかなり早くから進行していて、いびきはあるが声帯麻痺はないんですね。そうすると、全体的には嚥下障害が先行していて、後に呼吸障害が加わり、最終的にはapneicで亡くなったということでしょう。

主治医 その通りだと思います。

院長 開口の具合はどうでしたか。Jaw jerk亢進していますけど、これは初めからあったのでしょうか。いつもMSAの場合、議論されるのですが、口が開けにくいという理由の病理的背景を知るために、臨床的な確認をしたいのです。この方は口が開けられなくなったのはいつ頃からでしょうか。経過が長いから分からないでしょうか。口が開く、開かないという開口障害の記載はいつ頃からか分かりますか。嚥下障害が始まった頃でしょうか。

主治医 入院時にはjaw jerk(-)の記載です。口が開けられたから検査できたんだと思います。

小柳(神経研) 痴呆が緩徐に進行したとありますが、どういう症状が進行したのでしょうか。

主治医 コミュニケーションの障害が進行したということだと思います。筋萎縮性側索硬化症(ALS)の患者さんでは、身体の動きが悪くても瞬きとかジェスチャーである程度意思表示が出来る方もおられることと比べると、そういうことがどんどん出来なくなるといって痴呆が進行した可能性を歴代の主治医たちはみていたというふうに理解しています。ただし、カルテ上、本人や家族からは物忘れなどの痴呆を示唆するような訴えは少なく、病初期にはありませんでした。

司会 MSAの患者さんでは、コミュニケーションできないような状態というのは進行した状態ではかなり経験することではないかと思いますが、これについては大脳萎縮との関連で磯崎先生からコメントをいただきたいと思います。

磯崎 MSAでは、長期間経過すると大脳も萎縮してくることがすでに言われています。当院でも20年を超えるような長期経過の患者さんがおられますが、そうした例での大脳萎縮や知的レベルはどの程度なのか、またそれ以外にもどのような臨床徴候が新たに出現してくるのか、などは以前から興味を持っておりましたので、この機会に少しまとめてみました。

そこで、まず大脳萎縮の程度を評価するため、頭部CTフィルムから前角指数(大脳萎縮の程度を示す指標で、前角外側の最長幅から前角内側の最長幅を減じ、それを頭蓋骨内板の最大径で除し、100倍した値。正常範囲は12以下)を算出し、それを経時的にプロットしてみますと、全体的には経過年数とともに徐々に大脳萎縮は進行しますが、中等度の萎縮に至るまでに10年以下と比較的短い例もあれば、25年という長期を要する例もあり、進行速度は様々です。大脳萎縮の強い群と軽い群という二つのグループがあるということではなく、むしろ様々な例がある、と解釈したほうがよいように思います。

次に、MSAの大脳萎縮に関連して、コミュニケーションがとれない状態を単に痴呆と表現してよいのか、という点についても疑問がわいてきます。以下に述べる例は、私が十数年前に受け持った患者さんで、話をしていた何かが「かみ合わない」という印象をもった例です。51歳のときに右下肢のひきずりおよび前傾・前屈姿勢にて発症し、発症4年目に当院にて線条体黒質変性症(SND)と診断されました。その1年後には嚥下障害が進行したため再入院しましたが、以下はその時のカルテ記載を抜粋したものです。「長谷川式簡易痴呆スケール(HDS)では29点と良く保たれているが、

話をしているどうも会話が食い違ったり、突然その場にそぐわないことを言ったり、また現実吟味能力が低い印象あり。将来に対する不安や危機感が感じられない」とあります。さらに、リハビリ訓練士の記載でも、「訓練内容はなかなか覚えられない、判断力の低下が疑われる」とありました。この当時患者さんは56歳であり、老年性とも考えられないため高次脳機能をチェックしました。その結果、「慶應式臨床知能検査法(KIP)は48/100点で、即時記憶力、判断力、計算力の低下を認める。WAISでは、動作障害の影響受けにくい課題でも低得点であり、全体的な知的能力の低下」が示唆されました。そしてHDSとのギャップについては、「知識や理解、積み木問題など一般的な知能が多少よいためにHDSではよくでるのかもしれない。検査場面では熱心に課題に取り組み、質問に対する返答も一応的を射た内容であったが、話を通じにくくなると伝える努力を放棄することがある。病識はあるが、身体症状に対しては楽天的な印象を受ける。」という心理評価の結果でした。この時点での頭部CTでは、小脳萎縮は軽度あるものの、大脳についてはほぼ年齢相当と考えられました。この患者さんはこの検査を受けたわずか4カ月後に、声帯外転麻痺の悪化のために突然死されました。剖検では、SND 優位のMSAに合致した所見でした。もちろん、こうした所見がMSAのみみられる一般的な認知障害のパターンとは限らず、自発語が減少したり、抑うつ的になったりすることもあれば、全く知的異常を感じない例など、varietyがあると思われる。

MSAにおける大脳萎縮および痴呆を含めた認知障害について、少し文献にあたってみました<sup>2,12)</sup>。そもそも1900年のDejerineらの報告において、脳重が1,020gという記載があり<sup>3)</sup>、1960年のShyらの報告でも前頭葉皮質の神経細胞脱落が指摘されています<sup>13)</sup>。つまり、テント上にも明らかに萎縮があることが既に以前から指摘されていたわけです。日本では小長谷らが精力的にこの問題に取り組んでおり、28例中17例に進行性の前頭葉の萎縮があり、早期から萎縮が強い例あるいは長期間経過後に出現する例がある、と報告しています<sup>6)</sup>。そして、しばしば言語理解が保たれたまま寡黙状態に陥ることから、緩徐進行性の運動性失語と解釈しているようです。Robbinsらは16例の高次脳機能評価を行った結果、最も目立つ所見は思考の遅延化であり、前頭葉性の障害を示したと報告し、その病変主座をfronto-subcortical (fronto-striatal) pathwayに求めています<sup>10)</sup>。一方、平均罹病期間が8.9年と長めにもかかわらず、16例中大脳萎縮を示した例はなかった

という報告もあります<sup>14)</sup>。さらに、Mecoらは、Mini-Mental State Examination (MMSE)が平均25.7と比較的保たれているMSA-P 11例において種々な前頭葉機能検査を行った結果、PDと同様大部分の項目で低下していましたが、とくに注意力の障害(Stroop testにて)がMSAではより顕著であったといっています<sup>9)</sup>。多数例の臨床例を検討したWenningの報告では、24%に痴呆を認め、大部分は軽度であったといっています<sup>17)</sup>。しかし、それらの平均罹病期間は比較的短い点に注意する必要があります。本邦からは、Wakabayashiらが全経過14年で、死亡10年前から痴呆があり、5年前からはまったくコミュニケーションがとれず、追視もできなかった例を報告しています<sup>16)</sup>。一方、Horimotoらは、MRIでの検討を行い、age-matched controlと比べますとやはり進行性に大脳萎縮がありますが、病型(MSAのP型、C型)や性差間での相関はなく、罹病期間と相関したといっています<sup>4)</sup>。さらに、Shibuyaらは、病初期から物忘れと見当識障害があり、12年後に死亡した例を報告し、病理学的に左右差のある側頭葉の萎縮を認め、海馬を中心にPick球とは異なるinclusionを認めた例を報告しています<sup>11)</sup>。Suらは、7例の剖検例全例(中には脳重が950gという例も含まれる)で、motor & supplementary motor areaなどの皮質、白質におけるGCIの出現や小～中等度の錐体細胞の減少を認めています<sup>14)</sup>。彼らによれば、motor cortexの変性はMSAにおける好発障害部位のひとつであり、黒質線条体系の障害とともにmotor loop degenerationの一部をなすと述べています。このほかにもMSAでは、記憶力や“higher order”の認知障害がみられたり<sup>1)</sup>、前頭・側頭葉に萎縮を認めるものの、MSAの病型間では大脳萎縮に有意差を認めないとする報告があります。このように、MSAにおける認知障害については最近注目されるようになり、glial cytoplasmic inclusions(GCI)の分布が広範囲に及ぶことからその責任病巣についてようやく検討されるようになってきたところですが、したがって、まだ定説はないようです。

司会 磯崎先生、ありがとうございました。この点について板東先生、ご意見がありましたら追加していただけますか。

板東(神経内科) 発症から10年くらいの症例が30~40例くらいですが、そのデータでは経過年数と認知障害は平行しない、初期と10年くらい経った時であまり変わらないという所見になっています。それから、年齢ともやはり関係しないということになっています。ただ、磯崎先生が引用された文献にもありますが、機能障害があってもうまくそれを捉えきれていな



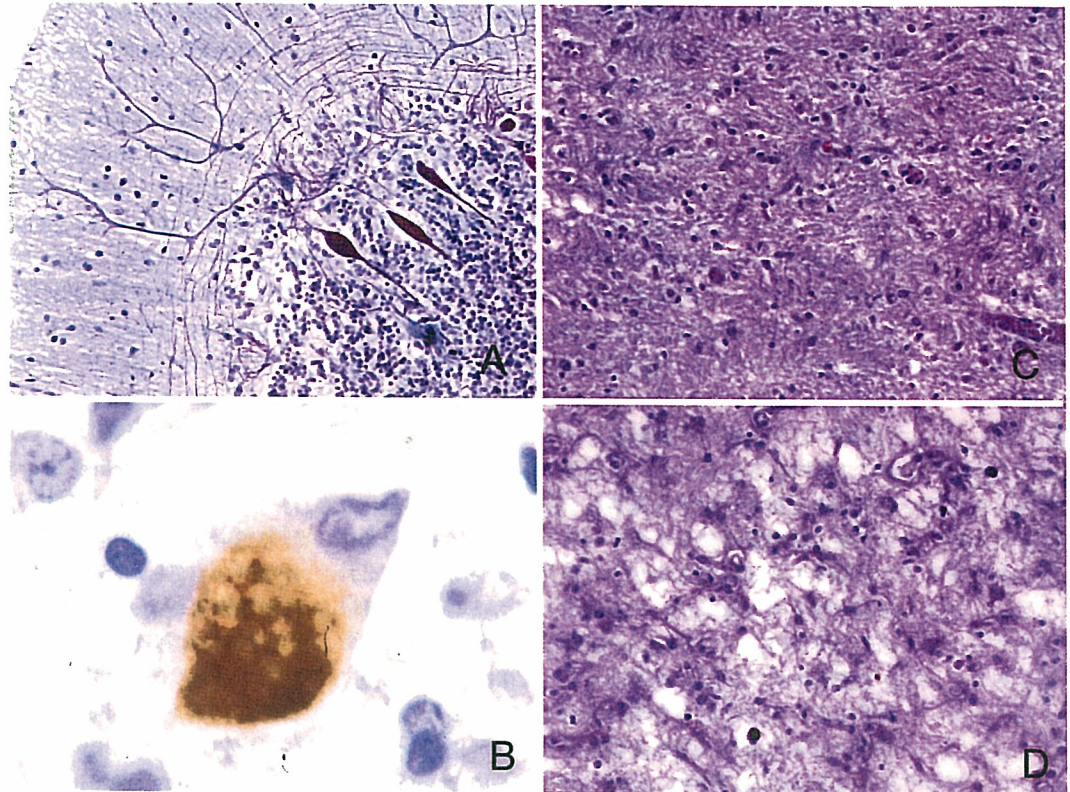


図2 多系統萎縮症 A:小脳皮質,全罹病期間8.8年にしては多数のtorpedoが散在(Bodian染色),B:残存した橋核神経細胞にみられた抗tau抗体陽性の封入体,C:著しい神経細胞の脱落とneuropilの粗鬆化を呈する黒質(HE染色),D:微細海綿状態を示す被殻(HE染色)。

いというところがありまして、日本の文献でも研究者によってまちまちです。知的低下に関しては当院の症例では半数くらいに知的低下がありますが、あまり強いものではない。しかし、症例毎に検査の種類が異なったりしていますので、もう少し経過をみる必要があると思いますので、これからの課題ではないかと思えます。

司会 ありがとうございます。その他にございますか。

小森(神経研病理) 中心前回の萎縮はあったと思いますが、古い症例ではCTは難しいでしょうけれど、MRIをご覧になって中心前回の萎縮がないか、目立つという症例は臨床的にはないと思うのですが、いかがでしょう。

磯崎 FLAIR画像でちょうど中心前回のところにわずかに高輝度の所見がみえることがあります。しかし、そういう病初期にあったものが5年、10年経つとひどくなるかというそうはならないんです。したがって、それらは病変ではないのではないかという気

がします。中心前回の萎縮についてはそういう目でみれば、そうかなと思うものが確かにあるんですが、常にといいわけではないのではないかと思います。

司会 ありがとうございます。MSAもいろんな経過をとってくるし、長期にみるといろんなバリエーションがあって、この患者さんが今問題になっている画像所見を含めてMSAの範疇で捉えられるかどうか、という点がどうなのかなと思います。それでは病理の呈示をお願い致します。

#### 病理所見

水谷(検査科病理) 一般臓器では直接死因につながる所見がございません。中枢性の呼吸麻痺が一番考えられると思います。

平井(神経内科) 脳重は1,228gです。小脳・橋底部の萎縮、黒質の脱色素、線条体の萎縮がみられまして、MSAとして問題ありませんが、ご覧のように、両側の中心前回の幅が極端に狭くなっています(図3A)。

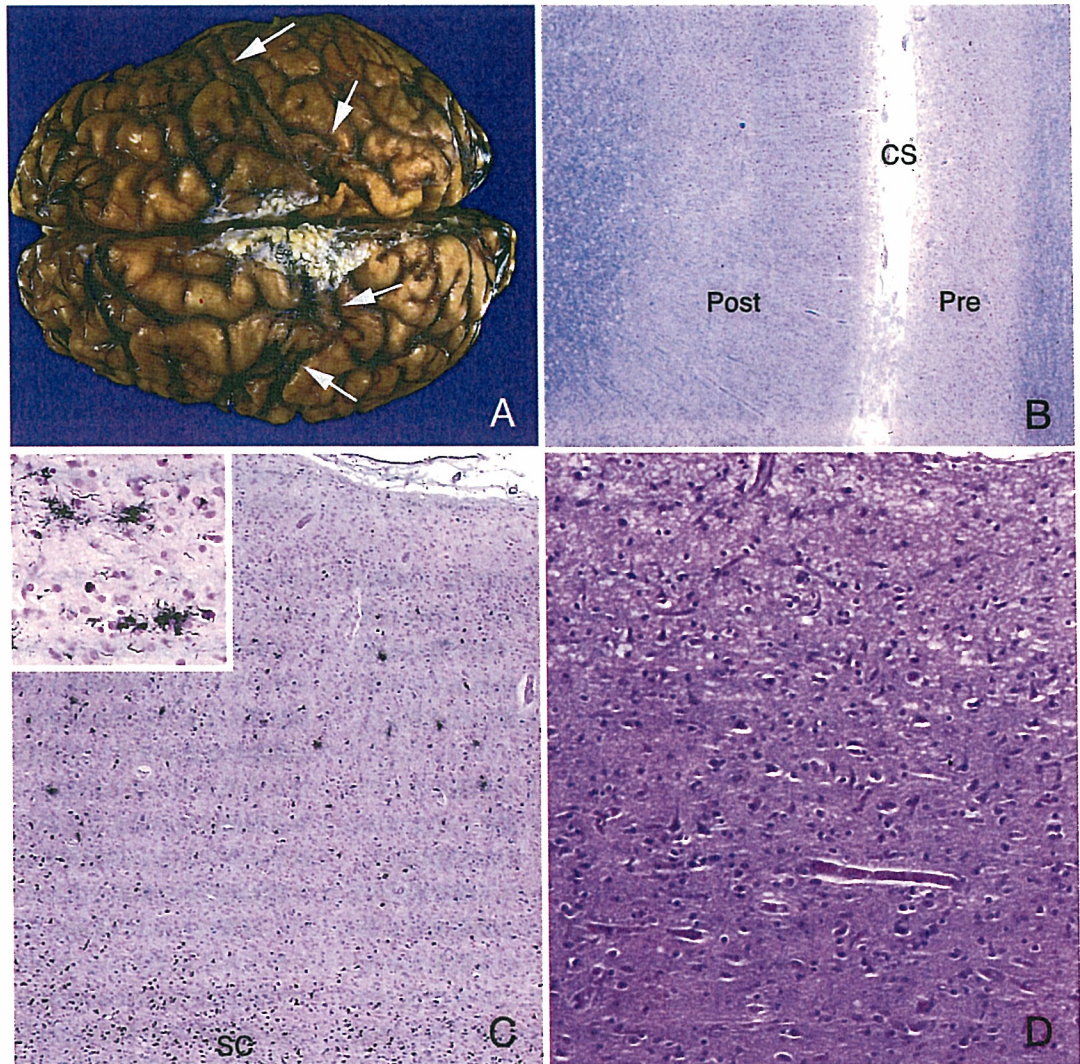


図3 中心前回 A: 両側中心前回の著しい萎縮(矢印), B: 中心溝(CS)を挟んで中心前回(Pre)が中心後回(Post)の半分以下の厚さになっている(K-B染色), C: 皮質に tuft-shaped astrocytes(左上の挿入写真)が層状に分布している。皮質下白質(SC)には無数のGCIがみられる(Gallyas染色), D: 皮質の菲薄化とともに神経細胞が高度に脱落している場所が中心前回の一部に認められる(HE染色)。

組織所見もMSAとしてcompatibleですが、小脳皮質では、顆粒細胞層に多数のtorpedoがみられたことが注目されます(図2A)。また、歯状核の神経細胞は比較的保たれていましたが、NFTが1個認められました。白質内にGCIが軽度認められました。橋底部では横走線維の脱落が非常に強く、橋核神経細胞は高度に脱落していましたが、残存神経細胞にcentral chromatolysis様変化を呈するものが多く観察されました。また、抗リン酸化tau抗体で胞体が陽性に染まる細胞もありました(図2B)。縦束線維の脱落は横走

線維より軽度でしたが、内側の前頭橋路の変性は中等度ないし高度でした。GCIは横走線維よりも縦束内に多数出現していました。下オリーブ核の神経細胞脱落は橋核に比べて軽度でした。

左右の被殻全体が微細海綿状変化を示しており、神経細胞は高度に脱落しています。アストログリアの増殖も高度です(図2D)。さらに、同様の変化は尾状核腹側部にもみられました。しかし、線条体のGCIはわずかでした。中脳黒質では、色素神経細胞、非色素神経細胞ともに高度に脱落し、基質は粗鬆化していま

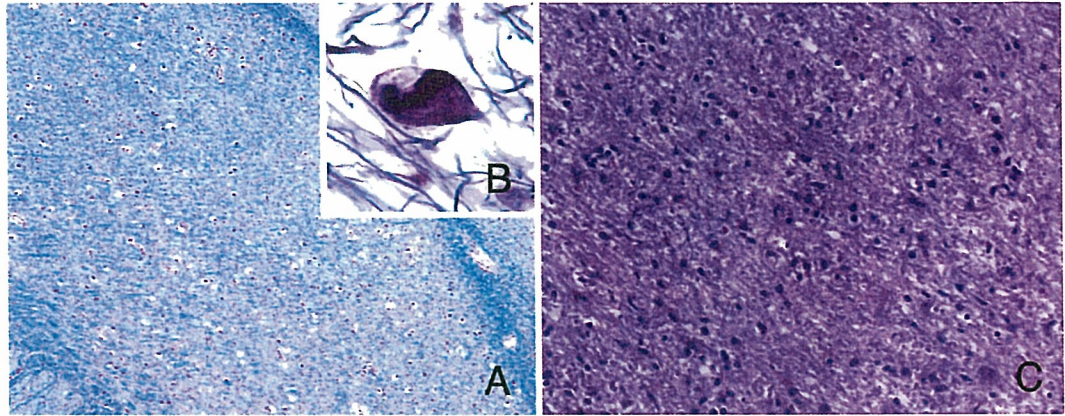


図4 皮質下核 A:視床下核のボリュームは比較的良好に保たれ、神経細胞の脱落はほとんど認められない(K-B染色), B:視床下核ではNFTをもった神経細胞がみられる(Bodian染色), C:淡蒼球では被殻病変の二次変性のみとはいえない変性とアストログリアの増殖がある(HE染色)。

した(図2C)。GCIが多数認められましたが、Gallyas染色で少量ながら tuft-shaped astrocyte, coiled bodies がありました。赤核の髄鞘構築と神経細胞は保たれていましたが、GCIよりも tuft-shaped astrocytes, coiled bodies が多くみられました。動眼神経核はよく保たれていました。

中心前回はその幅が正常の半分ほどに萎縮して(図3B)、皮質の細胞構築には異常は認められませんでした。皮質第2層から3層上部に海綿状態があり、アストログリアのびまん性増殖が第5, 6層で顕著でした。同側の中心前回でも神経細胞の脱落が非常に高度な場所(図3D)と比較的よく残っている場所があり(図3C)、前者では Betz 細胞も脱落していますが、後者では神経細胞の密度が非常に高くなっていて、Betz 細胞は萎縮していますが残っていました。Ballooned neurons はありませんでした。同様の変化は、中心前回より前方の上前頭回にもみられました。さらに、これらの皮質に tuft-shaped astrocyte が第3層上部を中心に層状に出現していました(図3C)。これらはまた AT8 染色に陽性でした。中心後回の萎縮は認められませんでした。tuft-shaped astrocyte が第3層下部、第4層の上部に多数みられました。中心溝を挟むこれらの領域の皮質下白質から深部白質には無数のGCIが出現し、その多くは抗リン酸化 tau 抗体染色陽性でした。さらに、GCIに加えて、少数ながら coiled bodies が観察されました。しかし、前頭葉前部、側頭葉、頭頂葉、後頭葉ではごく少数のGCIと coiled bodies が散見される程度で、中心溝付近とは著しく異なっていました。海馬傍回内嗅領皮質の pre- $\alpha$  neurons には少数のNFTがみられましたが、tuft-shaped astro-

cytes などは見当たりませんでした。アンモン角にもNFTはみられませんでした。

その他の皮質下核では前障の基質が粗髪化して、アストログリアが軽度増殖していました。GCIも多数出現していました。淡蒼球では基質の粗髪化が強く、神経細胞の脱落があり、線維形成型アストログリアの増殖が高度かつびまん性にみられました(図4C)。有髄線維の減少は内節よりも外節に強いようですが、GCIはわずかでした。視床では明らかな神経細胞の脱落、有髄線維構築の乱れなどはないのですが、GCIはすべての亜核にみられLP核、DM核、CM核および内髄板核でみられました。とくにCM核および内髄板核では視床亜核のなかで最も多く、tuft-shaped astrocytes も観察されました。視床下核の神経細胞は保たれていましたが(図4A)、アストログリアの増殖が著明で、NFTをもった神経細胞も散見されました(図4B)。しかし、GCIは認められませんでした。

脊髄では、両側外側皮質脊髄路の変性が著明で、左前皮質脊髄路にも変性が認められました。しかし、脊髄小脳路には明らかな変性はありませんでした。

司会 ありがとうございます。非常に興味ある所見を呈示していただきましたが、病理所見に関してご討論をお願いします。

小柳 MSAの病変をまとめると、平井先生が指摘されているように、torpedo がたくさんあり(図2A)、Purkinje 細胞が決して消失しているわけではなく burnt-out していない病変です。オリーブ核の病変も決して burnt-out してない。ところが黒質と被殻をみると相当病変が強いという(図2C&D)、こういう色合いが残った症例だと思いました。

司会 院長先生、どうぞ。

院長 MSAでGCIが中心前回を含め出現することは前から言われていました。私はMSAとALSとでは一般的に逆の病変分布をするなど思っていたのですが、MSAのこのGCIの分布だけは仲良しなのでいつも引かかっています。この例の中心前回のGCIが非常に多いという分布と、中心前回が半分に萎縮しているということとの関係をお聞きしたい。ALSのようにというのが引かかかるとは、一般的にはMSAではBetz細胞が落ちないのか、あまり目立たない。これがMSAの病変とすると、オリゴデンドログリアのGCIのinvolvementから二次的にneuronが落ちてきたのですか。

小森 林先生がおっしゃるようにALS的な落ち方をしていますよね、Betz細胞が落ちている。数個しか残っていないかと思えます。MSAだけの病変ではこれほどBetz細胞は落ちない。

水谷 皆さん中心前回のBetz細胞が脱落しているとおっしゃるけど、もちろん神経細胞は脱落しています。しかし、もう少しよくみていただきたいのですが、表層は海綿状態があったりしますが、深層はかなり神経細胞と神経細胞の間が狭まっているんです。つまり非常にneuropilが減少しているわけです。ですから、神経細胞の脱落だけではないと思えます。やはり、neuropilが減少するような事態が起きているのだと思えますし、その原因の中には中心前回に入力する神経線維も問題ではないでしょうか。

司会 オリゴデンドログリアと神経細胞脱落の関係について、水谷先生いかがですか。

水谷 GCIとneuronal lossの関係は非常に重要ですね。GCIがneuron全体を脱落させるプロセスなのか、そうではないのか、という話ですから、本質的な問題を突きつけられているわけです。確かにGCIは非常に注目されますが、全体の病理像を考えればやはりneuronが脱落するほうが先ではないでしょうか。その過程でGCIができてくるのではないのでしょうか。

小森 これだけ中心前回に萎縮がある症例を私はあまり見たことがないですね<sup>5)</sup>。それからMSAの場合、もちろん淡蒼球は二次的にやられるのですが(図4C)、視床下核は保たれるのが普通だと思います。しかし、この例の細胞脱落は非常に軽いのですが、明瞭にグリオースがある。それはちょっとMSAだけでは説明つかなくて、やはり軽いけども視床下核にも1+の病変をとっていいんじゃないかと思えます(図4A)。さらに、Alzheimer神経原線維変化(NFT)が視床下核と黒質に少量ですけどございました(図4B)。それか

ら進行性核上性麻痺(PSP)としてもちょっと合わないのは、全体として歯状核はよく保たれていることです。NFTも一つか二つ、それくらいしかないと思います。歯状核がPSPでやられなくてもいいという説もありますけど、私、個人的にはかなり重要な所見だと思っています。グリアの病変についてみますと、GCIは白質優位で、かつ中心前回に相対的に優位であるというのは文献的によく知られたことですが、通常は先ほど申し上げたように中心前回が痩せてくるということはないわけです。そこで、この症例では多くのtuft-shaped astrocytesが中心前回にある、それ以外にも被殻は焼け跡になっているので見にくいのですが、尾状核をみると多数のtuft-shaped astrocytesがあつて、GCIも共存している。それから視床下核にはNFTに加えてcoiled bodiesがある。そして小脳は白質の病変が主で、これはMSAの特徴でそこにGCIがあるということになりますので、最終診断が臨床病理診断ということになればMSAが主体であることに間違いはないと思えますが、これだけ中心前回がやられた症例がないということをお考え併せますとやはりプラス $\alpha$ の病変、PSP的な病変があつたのではないかと思えます。

内原 視床下核とか黒質にもtau pathologyがあるというご指摘ですが、脳幹以下をみるとそのPSPでみるようなはっきりしたtangleが出ている病変は少なくともないんじゃないか。で、PDでもPSPでもそうですけど、脳幹にしっかりした病変があつて、それに大脳病変があるという捉え方で病理は進んできたと思うのです。PSPの場合は脳幹になくて大脳皮質病変があるというのはいないんじゃないか。どうでしょう。つまり、基本病変として脳幹にはっきりしたNFTを作る病変があるというのがPSPの概念であつて、もしこの例からMSAの病理所見を除いたとしたら、こういうPSPがあるのでしょうか。本例の大脳皮質のglia pathologyについてはPSPに類似の所見があるという言い方だろうと思えます。むしろ、なぜ脳幹のほうに出ないのかということが問題になると思うんですけど。

小森 あくまで細胞レベルでみれば、synucleopathyが主体にあつて、そこに間違いのないtauopathyがあつて、それは従来知られている範囲では、PSPとして矛盾がない。グリアの病理もPSPとして矛盾がないけれども、診断基準を満たすには無理があると思えます。先生がおっしゃられるようにMSAとPSPの合併というのはもちろん避けたほうがいいと思えます。ただし、先ほどお話ししたように中心前回の変化が病理をみる限りでは一番強く、それをなぜかと考えたときにそこにtauopathyがあるわけだから、やはり中心

前回の変化が強調された原因の一つとして tauopathy を無視するわけにはいかないと思います。それから、CPC のレポートに PSP と CBD の部分症状と書いてありますが、CBD の所見はまったくないと思いますけど。

水谷 確かに ballooned neuron はありませんね。しかし、CBD で最も重要な所見は中心溝を挟む領域が選択的に萎縮することです。なぜ、CBD では中心前回を含む領域が変性・萎縮するのか、そこが CBD の最も本質的な変化です。そして、その所見が本例にあるのです。さらに申し上げるならば、PSP でもこの領域に変性が強調される症例があるのはご存知だと思います。つまり、本例は MSA, PSP, CBD の非常に重要な病変が中心前回に会合しているといえるのではないのでしょうか。

司会 では、小柳先生。

小柳 私はちょっと違う見方をしました。本例の所見をみても  $\alpha$  synuclein と tau というのは仲がいいんだなあと感じた次第です。 $\alpha$  synuclein と tau の immunohistochemistry が出てきて初めて、実は Alzheimer 病と Lewy 小体病がお互い相互乗り入れがあるということが分かりました。Alzheimer 病だけではなくて tangle しか出てこない Guam 島の Parkinsonism-dementia でも扁桃体で1個の細胞の中に  $\alpha$  synuclein と tau が同居するのです。 $\alpha$  synuclein と tau の topography には若干違いがあったりしますが、同じ一つの脳という大きな目でみれば仲がいいということ、私たちは Alzheimer 病や痴呆を伴う Parkinson 病、Lewy 小体病、MSA などで最近になって知りました。過去に、PSP と MSA の合併例があるそうですが、本例がそうであるかという検討は不可欠でしょうが、見方を変えてこんな  $\alpha$  synuclein と tau の合併例があるということをお聞きしたんだと思います。で、あるいは今後、こういうような症例の  $\alpha$  synuclein と tau の仲のいい症例というのが出てくる可能性がある、その皮切りのような症例なのか、という気がしました。

司会 望月先生、本例に病理学的に類似した症例に関して文献的にはどうなのでしょう。

望月 若林先生の症例<sup>16)</sup>と小長谷先生の症例<sup>7,8)</sup>に前頭葉の萎縮があったと記載されていますが、本例のように中心前回に強調されるような萎縮ではありません。その両例ともやはり運動関連領域、中心前回と上前頭回に皮質の変性があり、やはり皮質の幅が薄くなって、深層にグリアが増殖していて、神経細胞脱落があるということで、その点に関しては、本例と共通しています。変性部位に GCI がでてくるということで

MSA に関連したものということです。さらに、若林先生の症例では白質にも変化が強くて、より広範囲に GCI があるということで、白質にも primary な病変があるのではないかと記載されています。しかし、小長谷先生の症例では MRI で3年目くらいに萎縮が捉えられているので、なかには早くから萎縮した例があるのではないかとされています。MSA で tuft-shaped astrocytes があったという報告は高梨先生だけで<sup>15)</sup>、そこでは MSA と PSP の合併として記載されています。

水谷 当院の MSA 剖検例のうち、無酸素脳症の病変がある患者さんを除きますと、38例の大脳皮質を評価できます。それで、マクロ的に中心前回が萎縮している3例では、組織学的には中心前回の病変は本例と非常によく似ています。ですから、けいれんによる派生的な病変が修飾しているのではなくて、恐らく本質的な病変だろうと思います。それから、経過が長い症例ほど前頭葉も中心前回も萎縮していますが、本例の8.8年というのは当院では短いほうですから、必ずしも罹病期間が長いから萎縮するというものではないと思います。もう一つは、前頭葉の萎縮との関係ですが、中心前回だけがとくに強調されているわけではない例と、本例のように中心前回が非常に強調されている場合の2種類あるようです。ですから、中心前回が萎縮するプロセスと前頭葉全体が萎縮するのは違うのではないかと、というような視点も必要かと思えます。

院長 臨床的な面からみえますと、いわゆる P 型 MSA の眼球運動障害は PSP に類似しています。SND の parkinson 症状に vertical から involve される眼球運動が加わって、症候学的に PSP に類似した面を持っているという気がしています。しかし、今までこの臨床面での類似性は病理学的には別の疾患ということで、非常に離れているところがあったように思います。そういう視点では MSA と PSP、とくに SND と PSP との連続性はこのような病理像を介してつながりが確かめられたのではないかと思いました。今後、病理という視点を超えて、これらの疾患間に共通する機能構造が何か detect できれば面白いと思います。

司会 ありがとうございます。本例は臨床的には MSA-P 型に近い経過であったと思いますが、MRI や脳血流シンチで捉えられた中心前回に強調された前頭葉萎縮が病理学的にも証明されました。また、病理学的に中心溝を挟む領域に MSA の GCI と、PSP の tuft-shaped astrocytes が共存しており、病巣形成を考えると非常に興味ある貴重な症例だと考えられました。まだ、ご意見があるとは思いますが、かなり時間が押していますので、このあたりで CPC を終わり

たいと思います。

### 文 献

- 1) Berent S, Giordani B, Gilman S, Trask CL, Little RJ, Johanns JR, Junck L, Klun KJ, Heumann M, Koepp RA : Pattern of neuropsychological performance in multiple system atrophy compared to sporadic and hereditary olivopontocerebellar atrophy. *Brain Cong* 50 : 194-206, 2002
- 2) Cummings JL : Fronto-subcortical circuits and human behavior. *Arch Neurol* 50 : 873-880, 1993
- 3) Dejerine J, Thomas A : L'atrophie olivo-ponto-cerebeleuse. *Nouv Iconog Salpetriere* 13 : 330-370, 1900
- 4) Horimoto Y, Aiba I, Yasuda T, Ohkawa Y, Katayama T, Yokokawa Y, Goto A, Ito Y : Cerebral atrophy in multiple system atrophy by MRI. *J Neurol Sci* 173 : 109-112, 2000
- 5) Ishizawa K, Komori T, Sasaki S, Arai N, Mizutani T, Hirose T : Microglial activation parallels system degeneration in multiple system atrophy. *J Neuropathol Exp Neurol* 63 : 43-52, 2004
- 6) 小長谷正明, 松岡幸彦, 小長谷陽子 : 多系統萎縮症における大脳萎縮経過の MRI における定量的検討. *臨床神経* 42 : 118-125, 2002
- 7) Konagaya M, Konagaya Y, Sakai M, Matsuoka Y, Hashizume Y : Progressive cerebral atrophy in multiple system atrophy. *J Neurol Sci* 195 : 123-127, 2002
- 8) Konagaya M, Sakai M, Matsuoka Y, Konagaya Y, Hashizume Y : Multiple system atrophy with remarkable frontal lobe atrophy. *Acta Neuropathol (Berl)* 97 : 423-428, 1999
- 9) Meco G, Gasparini M, Doricchi F : Attentional functions in multiple system atrophy and Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 60 : 393-398, 1996
- 10) Robbins TW, James M, Lange KW, Owen AM, Quinn NP, Marsden CD : Cognitive performance in multiple system atrophy. *Brain* 115 : 271-291, 1992
- 11) Shibuya K, Nagatomo H, Iwabuchi K, Inoue M, Yagishita S, Itoh Y : Asymmetrical temporal atrophy with massive neuronal inclusions in multiple system atrophy. *J Neurol Sci* 179 (S1-2) : 50-58, 2000
- 12) Schulz JB, Klockgether T, Peterssen D, Jauch M, Muller-Schauenberg W, Spieker S, Voigt K, Dichgans J : Multiple system atrophy : natural history, MRI morphology, and dopamine receptor imaging with 123-IBZM-SPECT. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 57 : 1047-1056, 1994
- 13) Shy GM, Drager GA : A neurological syndrome associated with orthostatic hypotension. *Arch Neurol* 2 : 511-527, 1960
- 14) Su M, Yoshida Y, Hirata Y, Watahiki Y, Nagata K : Primary involvement of the motor area in association with the nigrostriatal pathway in multiple system atrophy : neuropathological and morphometric evaluations. *Acta Neuropathol (Berl)* 101 : 57-64, 2001
- 15) Takanashi M, Ohta S, Matsuoka S, Mori H, Mizuno Y : Mixed multiple system atrophy and progressive supranuclear palsy : a clinical and pathological report of one case. *Acta Neuropathol (Berl)* 103 : 82-87, 2003
- 16) Wakabayashi K, Ikeuchi T, Ishikawa A, Takahashi H : Multiple system atrophy with severe involvement of the motor cortical areas and cerebral white matter. *J Neurol Sci* 156 : 114-117, 1998
- 17) Wenning GK, Jager R, Kendall B, Kingsley D, Daniel SE, Quinn NP : Is cranial computed tomography useful in the diagnosis of multiple system atrophy? *Mov Disord* 9 : 333-336, 1994

## MEDICAL BOOK INFORMATION

医学書院

<シリーズ ケアをひらく>

# 死と身体

コミュニケーションの磁場

内田 樹

●A5 頁248 2004年  
定価2,100円(本体2,000円+税5%)  
[ISBN4-260-33366-6]

コミュニケーションは<ことば>の外にある。病人だ人の前に立つとすぐわかる。身体の声が聞こえるから。ときには死者でさえも語りかけてくるから——。「誰もが感じていて、誰も言わなかったことを、誰にでもわかるように語る」著者の、教科書には絶対出ていないコミュニケーション論。

# Gene Therapy for Laryngeal Paralysis

Akihiro Shiotani, MD, PhD; Koichiro Saito, MD, PhD; Koji Araki, MD;  
Kazuhisa Moro, MD; Kazuhiko Watabe, MD, PhD

**Objectives:** The surgical options for laryngeal paralysis only achieve static changes of vocal fold position. Laryngeal reinnervation procedures have had little impact on the return of dynamic laryngeal function. The development of a new treatment for laryngeal paralysis, aimed at the return of dynamic function and neurologic restoration and regeneration, is necessary.

**Methods:** To assess the possibility of gene therapy for laryngeal paralysis aiming for the return of dynamic laryngeal function, we investigated the therapeutic effects of gene therapy using rat laryngeal paralysis models.

**Results:** In a rat vagal nerve avulsion model, we transferred glial cell line–derived neurotrophic factor (GDNF) gene into the nucleus ambiguus using an adenovirus vector. Two and 4 weeks after the GDNF gene transfer, a significantly larger number of surviving motoneurons was observed. These neuroprotective effects of GDNF gene transfer were enhanced by simultaneous brain-derived neurotrophic factor gene transfer. In a rat recurrent laryngeal nerve crush model, we transferred GDNF gene into recurrent laryngeal nerve fibers after crush injury. Two and 4 weeks after GDNF gene transfer, we observed significantly faster nerve conduction velocity and better vocal fold motion recovery.

**Conclusions:** These results indicate that gene therapy could be a future treatment strategy for laryngeal paralysis. Further studies will be necessary to demonstrate the safety of the vector before clinical application.

**Key Words:** BDNF, brain-derived neurotrophic factor, functional recovery, GDNF, gene therapy, glial cell line–derived neurotrophic factor, motoneuron loss, nerve conduction velocity.

## INTRODUCTION

Current treatment of recurrent laryngeal nerve (RLN) paralysis focuses on static repair of vocal fold position, rather than on restoration of movement of the paralyzed vocal fold. The results of surgery are accordingly often less than satisfactory. In particular, in patients with bilateral vocal fold paralysis, preserving both airway and voice quality is difficult, and a choice must be made between closing the tracheostomy and better voice quality. Surgery to restore innervation by nerve suturing or transplantation, with the goal of improving dynamic function, is generally ineffective in restoring vocal fold mobility. Therefore, novel therapies must be developed from the neurologic perspective of treating RLN paralysis as a motor nerve paralysis. This requires research aimed at restoring vocal fold mobility.

Several neurologic problems may occur with denervation (Fig 1). Injury of the RLN can cause 1) loss of motoneurons in the nucleus ambiguus, 2) degeneration and poor regeneration of nerve fibers and

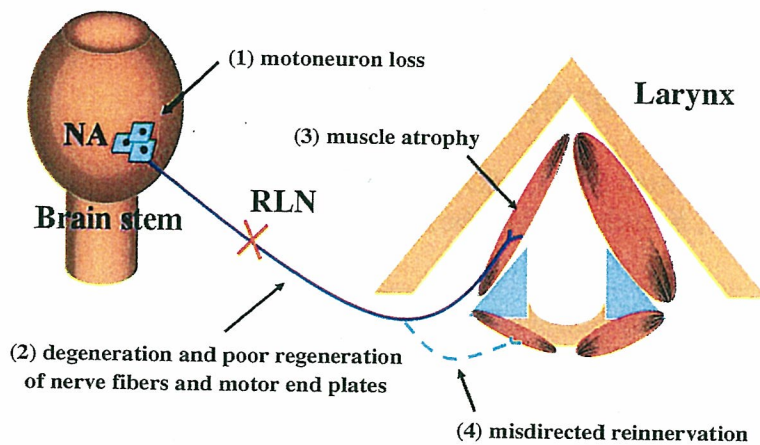
motor end plates, and 3) laryngeal muscle atrophy. Each of these problems needs to be addressed for restoration of RLN motor function. Furthermore, nonselective regeneration can lead to (4) faulty innervation after nerve regeneration, in which the wrong neurons may innervate other laryngeal muscles (misdirected reinnervation), so that even if innervation is reestablished, proper motor function is not restored (synkinesis).

Although clinicians are aware of each of these problems, definitive therapy has not been available. However, recent advances in neurology have led to the discovery of several neurotrophic factors with potent trophic effects on myoneural function (ie, affecting motoneurons, motor nerve fibers, motor end plates, and muscle tissue), including regenerative and protective effects.<sup>1</sup> They include nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor (BDNF), glial cell line–derived neurotrophic factor (GDNF), fibroblast growth factor, ciliary neurotrophic factor, and insulin-like growth factor I (IGF-I). These neurotrophic factors may be useful in treating RLN paralysis.

From the Department of Otolaryngology–Head and Neck Surgery, National Defense Medical College, Saitama (Shiotani), and the Department of Otolaryngology–Head and Neck Surgery, Keio University School of Medicine (Shiotani, Saito, Araki, Moro), and the Department of Molecular Neuropathology, Tokyo Metropolitan Institute for Neuroscience (Watabe), Tokyo, Japan.

Presented at the meeting of the American Broncho-Esophagological Association, Chicago, Illinois, May 19-20, 2006.

**Correspondence:** Akihiro Shiotani, MD, PhD, Dept of Otolaryngology–Head and Neck Surgery, National Defense Medical College, 3-2 Namiki, Tokorozawa, Saitama 3598513, Japan.



**Fig 1.** Neurologic problems after injury of recurrent laryngeal nerve (RLN). (1) — loss of motoneurons in nucleus ambiguus (NA); (2) — degeneration and poor regeneration of nerve fibers and motor end plates; (3) — laryngeal muscle atrophy; (4) — misdirected reinnervation (synkinesis). These problems need to be solved for return of vocal fold movement.

For the clinical application of neurotrophic factors, the most convenient route of administration is direct injection of neurotrophic factor proteins into atrophied laryngeal muscle or injured RLN fibers. However, for these neurotrophic factors to have an effect, certain concentrations must be maintained over time. Once they are injected, these neurotrophic factor proteins are rapidly absorbed and eliminated; thus, several injections per day over a long period are required. Systemic administration is also an option, but carries an increased risk of adverse reactions. This is where gene transfer (gene therapy) can be useful.

Gene therapy can be used as a specific type of drug delivery system. Instead of injecting the protein drug (in this case, the neurotrophic factor), the gene (DNA) encoding the protein can be transferred into human cells via a gene carrier (vector), and the proteins can then be made in the cells. Once the vector is injected, proteins will be expressed in high concentration at the delivery site for a few weeks up to 1 month. If an extrachromosomal vector for gene transfer is selected, gene expression will spontaneously decrease, so the risk of expression for longer than required is avoided. In addition, local gene expression carries a lower risk of adverse reactions than systemic administration. Taking the above into consideration, we embarked on research toward the clinical application of gene therapy in RLN paralysis.

With respect to neurologic problems to be solved in the restoration of vocal fold mobility, as shown in Fig 1, the therapeutic effects for muscle atrophy have already been demonstrated with IGF-I gene. Insulin-like growth factor I has potent trophic effects on both myocytes and neurons. Insulin-like growth factor I gene transfer using a formulated plasmid containing a skeletal muscle-specific actin promoter into the rat thyroarytenoid muscle after transection of the RLN<sup>2-4</sup> prevented muscle atrophy. Four

weeks after gene transfer, the gene therapy group, as compared to a control group, exhibited a significant increase in muscle fiber diameter and less muscle atrophy. In addition, the gene therapy group exhibited a significant improvement in peripheral nerve regeneration and protection of motor end plates. These findings showed that IGF-I gene therapy in RLN paralysis was effective in preventing laryngeal muscle atrophy and enhancing peripheral nerve regeneration. Moreover, similar effects were confirmed in a chronic model at 1 month after nerve transection.<sup>5</sup> Myosin heavy chain subunits in laryngeal muscle are known to undergo various changes in composition due to biological demands. IGF-I gene therapy can prevent these denervation-related changes and promote their normalization.<sup>6</sup>

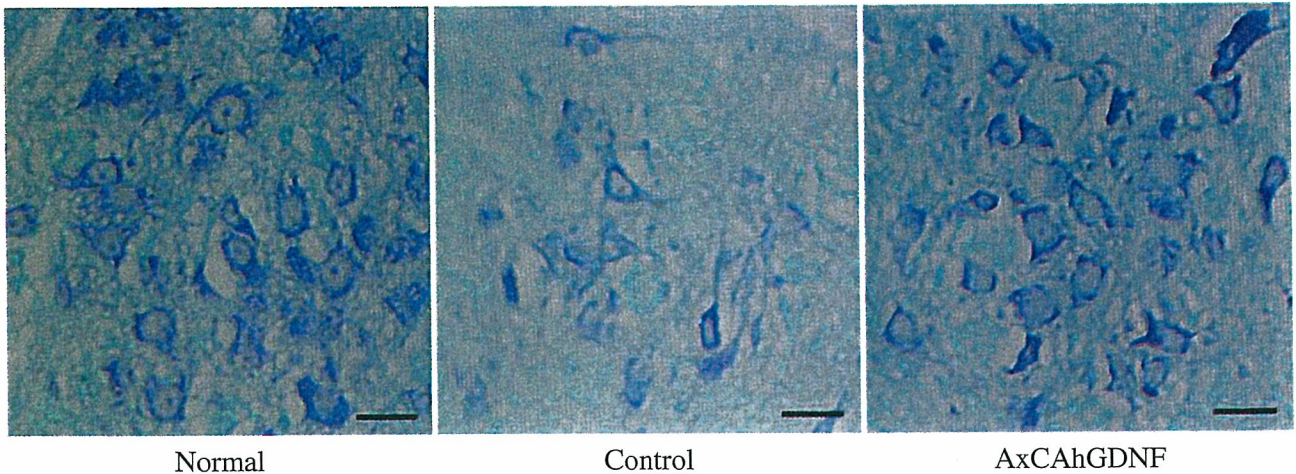
Glial cell line-derived neurotrophic factor offers powerful survival-promoting effects on motoneurons in vitro and in vivo, and promotes nerve regeneration after injury.<sup>7-10</sup> Overexpression of GDNF produces hyperinnervation of neuromuscular junctions,<sup>11</sup> and expression of endogenous GDNF is increased early after peripheral nerve injury.<sup>12</sup> The use of GDNF and other neurotrophic factors may prove beneficial for the treatment of peripheral nerve injuries.

Brain-derived neurotrophic factor has been shown to promote the survival of developing motoneurons in vitro and to rescue motoneurons from axotomy-induced cell death in vivo, and its effects are mediated via 2 classes of receptors (trkB and p75).<sup>13,14</sup>

In adult rodents, administration of BDNF and GDNF proteins has been reported to prevent the loss of spinal motoneurons after spinal root avulsion.<sup>8,15-17</sup> And following avulsion of a spinal ventral root, an adeno-associated viral vector-mediated BDNF and GDNF gene transfer prevents the loss of spinal motoneurons.<sup>18</sup>

In the present article, to assess the neurologic problems to be solved in the restoration of vocal fold





**Fig 2.** Vagal motoneurons in nucleus ambiguus 4 weeks after vagal nerve avulsion (toluidine-blue stain). Photomicrographs show nucleus ambiguus on contralateral (Normal) or ipsilateral side after avulsion and treatment with phosphate-buffered saline solution (Control) or glial cell line–derived neurotrophic factor (GDNF) gene transfer (AxCAhGDNF). GDNF gene expression offers strong protective effect against motoneuron loss. Bars — 50  $\mu$ m.

mobility (Fig 1) and the possibility of gene therapy for motoneuron loss and functional recovery after vagal nerve or RLN injury, we examined the neuroprotective effect of adenoviral GDNF and BDNF gene transfer using rat laryngeal paralysis models.

#### METHODS AND RESULTS

*Gene Therapy for Motoneuron Loss in Nucleus Ambiguus.* We evaluated the effects of GDNF gene therapy on prevention of denervation-related motoneuron loss in the nucleus ambiguus by injecting GDNF into nucleus ambiguus motoneurons.<sup>19</sup> First, we created a model of induced motoneuron loss in the rat nucleus ambiguus by resection of the vagus nerve at the level of the jugular foramen. Then, using an adenovirus vector (AxCAhGDNF), we selectively delivered the GDNF gene to nucleus ambiguus motoneurons through the jugular foramen. At 2 weeks and 4 weeks after gene transfer, the brain stem tissues were excised, and serial transverse sections were cut at 7  $\mu$ m. Every fifth section (28- $\mu$ m interval) was collected and stained with toluidine blue, and ambiguous motoneurons that had nuclei containing distinct nucleoli on both sides of the nucleus ambiguus were counted in 20 sections. We did not apply any correction factors for data analysis, since the ambiguous neurons have a maximum diameter of  $21.8 \pm 4.96 \mu\text{m}$ ,<sup>20</sup> and these neurons were counted only once in every fifth section at a 28- $\mu$ m interval. The data are expressed as the mean  $\pm$  SD from 4 animals (2 and 4 weeks after operation), and statistical significance was assessed between the groups by the one-factor analysis of variance and a Fisher test ( $n = 4$ ). At 2 weeks and 4 weeks after gene transfer, as compared to a control group, the GDNF gene therapy group demonstrated a significantly lower loss

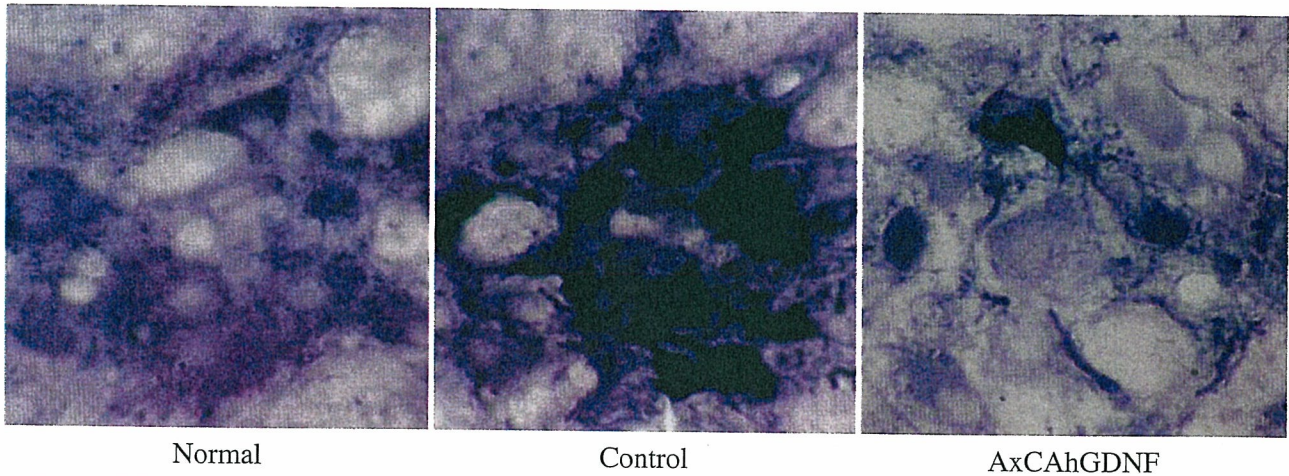
of nucleus ambiguus motoneurons (motoneuron survival rate at 4 weeks,  $72.0\% \pm 8.4\%$  in the GDNF gene therapy group versus  $56.2\% \pm 3.7\%$  in the control group; Fig 2). The GDNF gene therapy group also showed inhibition of expression of nitric oxide synthase, which is induced by nerve injury (Fig 3), and preservation of choline acetyltransferase activity, which decreases rapidly after nerve injury (Fig 4).

With concurrent transfer of the BDNF gene and the GDNF gene, the rate of loss of nucleus ambiguus motoneurons was significantly lower than the rates in both the control group and the GDNF gene therapy–only group (motoneuron survival rate at 4 weeks,  $84.7\% \pm 2.2\%$  in GDNF + BDNF gene therapy group; Fig 5).<sup>21</sup>

These findings demonstrate that GDNF gene therapy and BDNF gene therapy prevented the loss of motoneurons in the nucleus ambiguus associated with nerve transection and also promoted nerve regeneration.

*Gene Therapy to Restore Nerve Function.* The research results described above delineate the morphological effects of gene therapy on laryngeal muscle and the nucleus ambiguus; however, we also need to know to what extent these effects contribute to restoring RLN function. We therefore evaluated the functional effects of GDNF gene therapy in an RLN crush model.<sup>22</sup> Using hemostatic forceps, we crushed the RLN in rats for 60 seconds. After laryngoscopically confirming vocal fold fixation, we injected an adenovirus vector carrying the GDNF gene into the nerve bundle at the crush site.

To assess neurofunctional recovery, we subjected rats at 2 or 4 weeks after operation to measurement



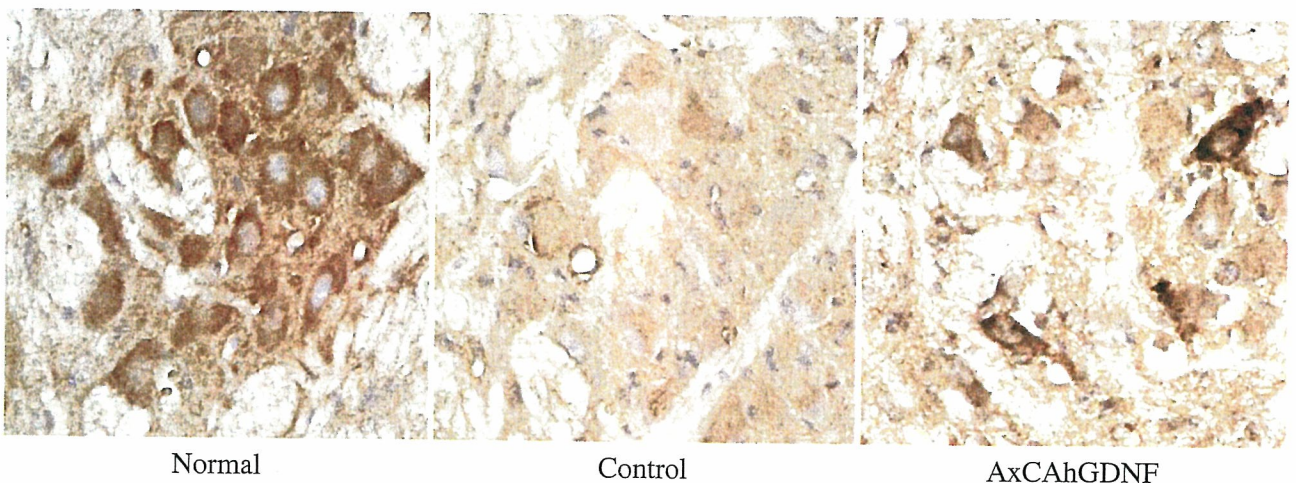
**Fig 3.** NADPH diaphorase histochemistry of nucleus ambiguus, 14 days after vagal nerve avulsion followed by GDNF gene transfer (AxCAhGDNF) or no treatment (Control). Compared to normal contralateral side (Normal), strong expression of nitric oxide synthase was observed on avulsed side in control animals. However, when AxCAhGDNF was inoculated, induction of nitric oxide synthase was suppressed.

of motor nerve conduction velocity (MNCV). The animals were anesthetized, and the left RLN was exposed. The strap muscles were sectioned to expose the larynx, and a laryngeal fissure was made. The left thyroarytenoid muscle was stabbed through the fissure with a needle concentric electrode for recording. To stimulate the left RLN, we placed 2 bipolar hook electrodes and hooked them into the left RLN. One was placed inferior to the left lobe of the thyroid as a distal stimulator, and the other was placed at 16 mm proximal to the distal electrode as a proximal stimulator. The nerve was maximally stimulated, and compound muscle action potentials in the TA muscle were recorded with a Power Lab computer-assisted electromyography machine (AD Instruments, Colorado Springs, Colorado). Maximal stimulation was achieved by increasing current output until no further change in amplitude of the

compound action potential occurred. A current impulse of 0.01-ms duration was delivered. Maximum MNCVs were calculated from the derived latencies and the distance between the 2 stimulating points (16 mm).

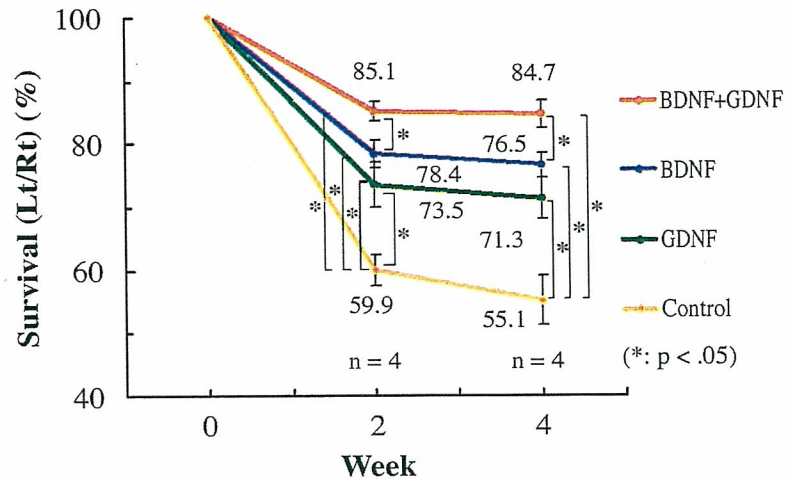
At the time of laryngeal fissure creation, recovery of vocal fold movement was also assessed. Recovery was only considered present when vocal fold movement on the denervated side was observed to be equal to that on the contralateral, non-denervated side. When vocal fold movement on the denervated side was limited (not fixed), recovery was not considered present.

Representative evoked electromyograms obtained by left RLN stimulation are shown in Fig 6. The electromyogram in an AxCAhGDNF-injected rat showed a large action potential wave and a short-



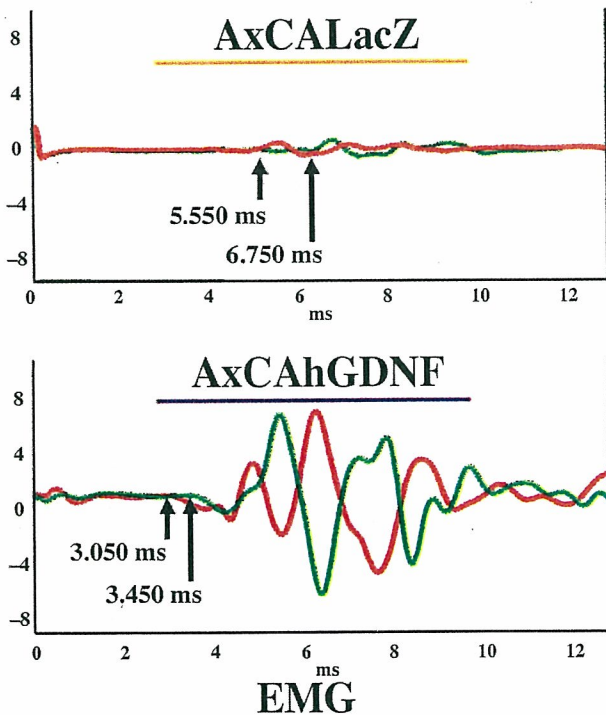
**Fig 4.** Choline acetyltransferase (ChAT) immunohistochemistry of nucleus ambiguus, 7 days after vagal nerve avulsion followed by GDNF gene transfer (AxCAhGDNF) or no treatment (Control). Compared to normal contralateral side (Normal), decrease in ChAT immunoreactivity was observed on avulsed side in control animals (Control). However, when AxCAhGDNF was inoculated, ChAT immunoreactivity was preserved on avulsed side.

**Fig 5.** Time course of motoneuron loss in nucleus ambiguus after operation. Percentages of surviving motoneurons in nucleus ambiguus (treated side/contralateral side) are plotted. Data following vagal nerve avulsion (n = 4) and treatment with phosphate-buffered saline solution, LacZ (control) gene transfer, GDNF gene transfer, brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene transfer, or GDNF and BDNF gene transfer are shown. Data are mean ± SD (bars). Statistical comparisons were done by Fisher test.

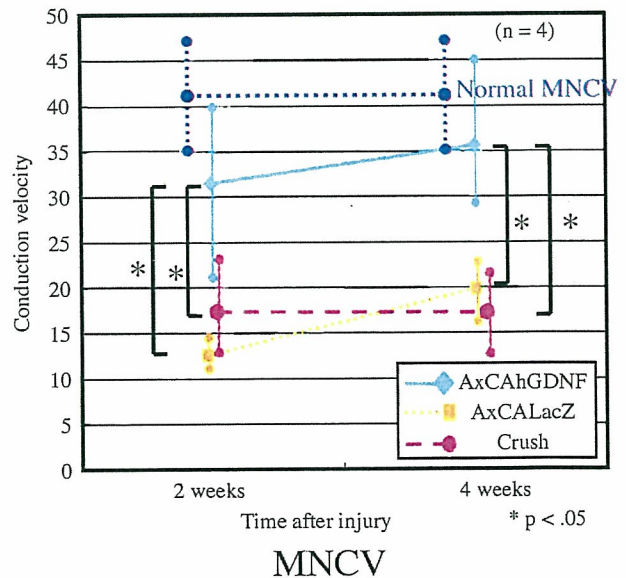


er latency, as compared to that in the control rat (AxCALacZ). At 2 weeks and 4 weeks after gene transfer, the MNCVs of the RLN in the GDNF gene therapy group were  $31.49 \pm 7.03$  m/s and  $35.59 \pm 6.28$  m/s, respectively. Taking into account an RLN conduction velocity of about 40 m/s in normal rats, we concluded that the conduction velocity had almost normalized. In the control group the RLN conduction velocity was less than 20 m/s at 2 weeks

and at 4 weeks. The RLN conduction velocity was thus significantly faster in the GDNF gene therapy group (Fig 7). Concerning vocal fold mobility (see Table), in the control group the degree of restoration of vocal fold mobility at 2 weeks and 4 weeks after gene transfer was 12.5% and 37.5%, respectively. In the GDNF gene therapy group there was 100% restoration at both 2 weeks and 4 weeks. This demonstrated that treatment had a significant effect on restoring vocal fold mobility. Furthermore, the diameters of axons were measured from left RLN sections. Representative cross sections of RLN samples stained with Epon-toluidine blue are shown in



**Fig 6.** Electromyography (EMG) of thyroarytenoid muscle. Representative evoked EMG traces obtained by left recurrent laryngeal nerve stimulation in LacZ gene-transferred (AxCALacZ) animals and GDNF gene-transferred (AxCAhGDNF) animals. EMG in AxCAhGDNF-injected rat revealed large action potential wave and shorter latency. Conversely, EMG in control rat (AxCALacZ) showed small, unclear action potentials and delayed latency.



**Fig 7.** Motor nerve conduction velocity (MNCV) at 2 and 4 weeks after injury (n = 4). Significant differences are apparent between GDNF gene (AxCAhGDNF)-transferred and LacZ gene (AxCALacZ)-transferred animals, and between GDNF gene-transferred and RLN crush animals at 2 and 4 weeks after injury. MNCV in GDNF gene-transferred animals recovered favorably and was comparable to that of normal rat. GDNF gene expression offers strong protective and regenerative effects against motor nerve injury.

## RECOVERY OF VOCAL FOLD MOVEMENT IN EACH GROUP

	2 Weeks	4 Weeks
AxCAhGDNF	4/4	4/4
AxCALacZ	1/4	1/4
Crush	0/4	2/4

Numerators show numbers of animals with vocal fold movement recovery. Denominators show numbers of animals observed. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) gene-transferred (AxCAhGDNF) animals showed significantly better recovery of vocal fold movement than did control animals (AxCALacZ-injected and recurrent laryngeal nerve crush) at 2 and 4 weeks after injury, indicating strong functional recovery following GDNF gene transfer.

\* $p < .05$ .

Fig 8. The mean axon diameter was  $6.28 \pm 0.43 \mu\text{m}$  in normal rats,  $4.76 \pm 0.62 \mu\text{m}$  in the GDNF gene therapy group, and  $2.67 \pm 0.10 \mu\text{m}$  in the control group. The mean axon diameter in the GDNF gene therapy group had recovered to an almost normal level — significantly larger than that in the control group ( $p < .05$ ).

## DISCUSSION

Treatment with GDNF gene transfer significantly prevented the loss of vagal motoneurons in comparison to the control in our study. In BDNF gene-transferred animals, a significantly larger number of surviving motoneurons were observed in the nucleus ambiguus as compared to phosphate-buffered saline solution-treated controls and GDNF gene-transferred animals 2 to 4 weeks after inoculation. In addition, the survival of motoneurons was further improved by treatment with a combination of BDNF and GDNF gene transfer, as compared to treatment with either BDNF gene transfer or GDNF gene transfer.

Neuronal depopulation results in the innervation of a relatively large number of muscle units by the residual neurons and thus is considered to contribute to the development of laryngeal synkinesis after RLN injury.<sup>23,24</sup> Adenoviral BDNF and GDNF gene therapy may be useful not only for preventing motoneuron loss in the nucleus ambiguus, but also for decreasing the risk of laryngeal synkinesis after vagal nerve injury or RLN injury by inoculation of the vector at the injured site of the nerve during head and neck surgery.

Our study also assessed neurofunctional recovery 2 and 4 weeks after injury, demonstrating enhancement of motor nerve recovery according to neurofunctional and laryngeal functional data. The timing of assessment was appropriate for the regenerative process of peripheral nerves, and our results demonstrate that early neurofunctional recovery might preserve good laryngeal function.

Measurement of the MNCV of the injured nerve is a commonly used physiological measure to evaluate peripheral nerve function in the rat nerve injury model.<sup>25-27</sup> In this study, control animals injected with or without AxCALacZ displayed a markedly slowed MNCV that did not change between 2 and 4 weeks after injury. These results are consistent with limited regeneration of the nerve in control animals that had not improved even 4 weeks after injury.

We also demonstrated that GDNF gene-transferred animals showed significant improvements in recovery of vocal fold movement and axonal diameter and myelination compared to control animals. Thickening of axon diameters and enhancement of myelination are considered to contribute to increases in MNCV. These regenerative effects on the nerve

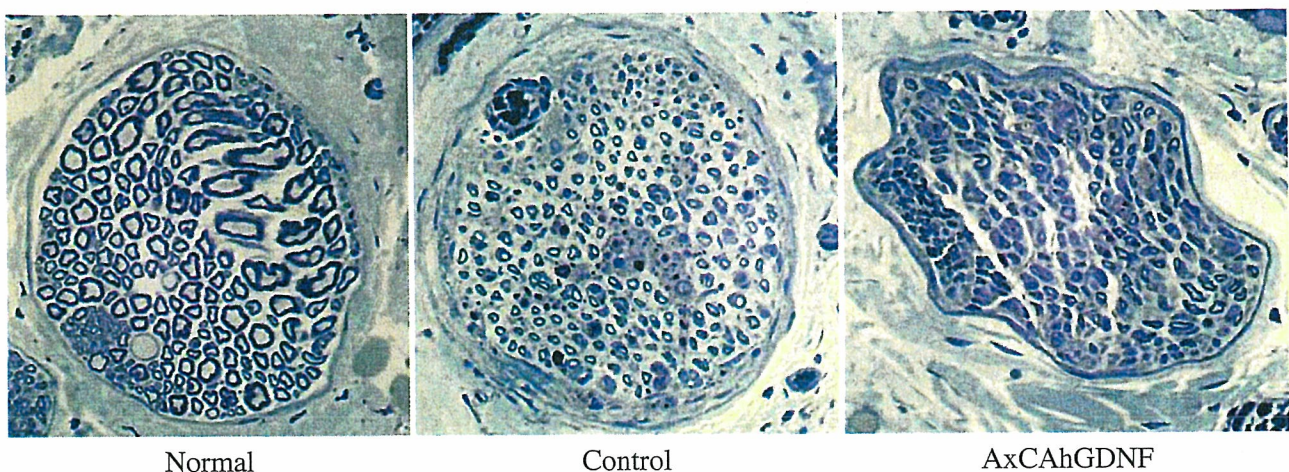


Fig 8. Photomicrographs of sectioned recurrent laryngeal nerve stained with Epon-toluidine blue at 5 mm distal from crush site at 2 weeks after injury. Control animal with crush injury (Control) displays atrophied and demyelinated axons. However, in GDNF gene-transferred (AxCAhGDNF) animal, better myelination and thick axons are observed, comparable to those in normal rat.