

厚生労働科学研究費補助金

こころの健康科学研究事業

筋萎縮性側索硬化症に対する特異的治療法の開発

平成18年度 総括研究報告書

主任研究者 郭 伸

平成19（2007）年3月

目 次

I. 総括研究報告

筋萎縮性側索硬化症に対する特異治療法の開発に関する研究 ----- 1
郭 伸

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 4

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 7

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
（総括）研究報告書

筋萎縮性側索硬化症に対する特異的治療法の開発に関する研究

（主任）研究者 郭 伸 東京大学助教授
東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻 神経内科学助教授

〔研究趣旨〕

孤発性ALSの運動ニューロンで疾患特異的、部位選択的分子変化として我々が見出したGluR2 Q/R 部位のRNA編集異常は、神経細胞死を引き起こす一次原因であり、この分子異常を正常化することにより神経細胞死が抑制できることが報告されている。GluR2 Q/R 部位のRNA編集は、特異的RNA編集酵素adenosine deaminase acting on RNA type2 (ADAR2) により触媒されることよりADAR2活性が低下していると考えられ、ADAR2 活性の賦活によりGluR2 Q/R 部位のRNA編集が正常化し、孤発性ALSの神経細胞死を抑制する効果が期待される。本年度の研究において、ADAR2 活性賦活作用をもつ物質を選び出すためのシステムを、培養細胞、モデルマウスで開発した。

分担研究者氏名・所属機関名及び所属機関における職名

相澤仁志 旭川医科大学 講師

A. 研究目的

我々は孤発性ALS脊髄運動ニューロンにおいてグルタミン酸受容体であるAMPA受容体のGluR2サブユニットmRNA におけるRNA編集が低下していること、これがALS運動ニューロンに疾患特異的かつ細胞選択的な変化であることを報告した(1, 2)。この GluR2 Q/R部位は、RNA編集酵素ADAR2 (adenosine deaminase acting on RNA type 2) により特異的に編集され、ADAR2のノックアウト動物は幼弱期に死亡する(3)。孤発性ALSの脊髄前角組織では、ADAR2mRNA 発現レベルが低下しており、上記のことから、ADAR2活性低下がGluR2 Q/R 部位のRNA編集異常を引き起こし、AMPA受容体のCa²⁺透過性を亢進させることを通じて神経細胞死を引き起こしていると考えられる。したがって、ADAR2活性を上げることができれば運動ニューロン死を阻止し、孤発性ALSを治療することが可能であると考えられる。本研究では、孤発性ALSの特異治療法の開発のため、ADAR2活性賦活を測定するためのin vitroおよびin vivoシステムを立ち上げる。

B. 研究方法

in vitroにおけるスクリーニングシステム開発のため、ヒト由来Hela細胞、HEK293細胞、グリオーマ細胞、神経芽細胞などを用いて、ADAR2の活性変化と共に編集率が変化する基質mRNA を安定して発現するか如何かを検討した。これらの培養細胞より総RNAを抽出し、RT-PCRと特異的制限酵素処理により、ADAR2 基質mRNA編集部位の編集率を検討した。GluR2 Q/R 部位のRNA編集率を特異的に測定するため、GluR2 遺伝子の編集部位を含むミニ人工遺伝子をHela細胞に遺伝子導入したセルラインを構築した。

In vivo系のスクリーニングシステムとしては、我々が開発したADAR2遺伝子コンディショナルノックアウトマウスにおいて、ADAR2活性異常による細胞死を検討した。

（倫理面への配慮）

遺伝子操作に関しては、第二種使用等拡散防止措置における承認を得、全ての遺伝子操作は本学DNA組換え実験指診に従い行った。また動物実験については、東京大学医学部動物委員会の承認を得、実験方法については同動物実験指針に従い動物愛護面に十分配慮した。

C. 研究結果及び考察

GluR2 Q/R 部位を始めとしたADAR2の基質となる各種編集部位の編集率、編集部位を持つRNAの発現

量は、細胞種により異なっていた。この中で、ヒト神経芽細胞では、安定してGluR2 mRNA を発現し、しかもそのQ/R 部位におけるRNA編集率は概ね40-60%であった。ミニ人工遺伝子を導入したHela細胞の発現する転写産物のRNA編集率は30-50%であり、ADAR2 mRNA のノックダウンにより0%に低下することが確認された。したがって、以上2系列の培養細胞系は、ADAR2活性を測定する系として適当であることが示された。

二系統のADAR2^{fllox/+}/VChT-Cre マウスは、ADAR2を運動ニューロンで発現しない。これらのマウスは進行性の運動ニューロン死を呈し、いずれもGluR2 Q/R 部位の編集率低下を示した。したがって、ADAR2の活性低下は神経細胞死を引き起こすこと、孤発性ALS運動ニューロンに見られるGluR2 Q/R 部位のRNA編集異常は、ADAR2活性低下であることが示され、ADAR2活性の賦活により孤発性ALSの治療が可能になると考えられる。

D. 結論

ADAR2活性低下が神経細胞死を引き起こすことを明らかにし、孤発性ALS運動ニューロンで低下しているADAR2活性を評価するシステムを開発した。

(文献)

1. Kawahara, Y *et al.*, *Nature* **427**, 801 (2004).
2. Kawahara, Y *et al.*, *Neurosci Res* **54**, 11-15 (2006).
3. Higuchi, M *et al.*, *Nature* **406**, 78-81 (2000).

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- Kwak S, Weiss JH: Calcium permeable AMPA channel in neurodegenerative disease and ischemia. *Current Opinion Neurobiology* 16:281-287, 2006
- Kawahara Y, Sun H, Ito K, Hideyama T, Aoki M, Sobue G, Tsuji S, Kwak S: Underediting of GluR2 mRNA, a neuronal death-causing molecular change in sporadic ALS, does not occur in motor neurons in SBMA patients or SOD1 transgenic rats. *Neurosci Res* 54:11-15, 2006

- Sun H, Kawahara Y, Ito K, Kanazawa I, Kwak S: Slow and selective death of spinal motor neurons in vivo by intrathecal infusion of kainic acid: implications for AMPA receptor-mediated excitotoxicity in ALS. *J Neurochem* 98:782-791, 2006.

- Hideyama T, Momose T, Shimizu J, Tsuji S, Kwak S: A PET study on the role of nigral lesions in parkinsonism in patients with ALS. *Arch Neurol* 63:1719-1722, 2006.

他16編

2. 学会発表

- 澤田 潤, 相澤仁志, 油川陽子, 榎本 雪, 菊池健次郎, 郭 伸. 培養細胞での薬物負荷によるグルタミン酸受容体遺伝子の編集率変化に関する検討. 第47回日本神経学会総会、東京、2006年5月11-13日
- 齋藤 司, 相澤仁志, 榎本 雪, 油川陽子, 澤田 潤, 菊池健次郎. 急性期脳卒中患者の発症から受診までの時間に及ぼす要因の検討. 第47回日本神経学会総会、東京、2006年5月11-13日
- 日出山拓人, 郭 伸: 運動ニューロン病における RNA 編集異常の検討、第 47 回日本神経学会総会、東京、2006 年 5 月 11-13 日
- 井原涼子, 清水潤, 郭 伸, 辻省次: 下位運動ニューロン徴候が明らかでない運動ニューロン病の臨床的特徴、第 47 回日本神経学会総会、東京、2006 年 5 月 11-13 日
- 澤田潤, 相澤仁志, 郭 伸: 培養細胞での薬物負荷によるグルタミン酸受容体遺伝子の編集率変化に関する検討、第47回日本神経学会総会、東京、2006年5月11-13日
- 相澤仁志, 木村 隆, 箭原 修, 菊池健次郎. 筋強直性ジストロフィーの嗅球病変。日本神経病理学会総会、岡山、2006年5月24-26日
- 澤田潤 相澤仁志 齋藤司 油川陽子 榎本(中谷)雪 菊池健次郎, 木村隆 箭原修. Spinocerebellar ataxia type 1の3剖検例。日本神経病理学会総会、岡山、2006年5月24-26日
- 相澤仁志, 澤田 潤, 油川陽子, 郭 伸, 河原行郎, 日出山拓人, 伊藤杏子. 孤発性筋萎縮性側索硬化症の病態。第33回日本脳科学会、旭川、2006年6月2-3日
- 榎本(中谷)雪, 相澤仁志, 菊池健次郎. パーキンソン病の振戦に対するレボドパの内服効果の検討。第48回日本老年医学会学術集会、金沢、2006年6月7-9日

- 郭 伸：ALS の運動ニューロン死の分子メカニズム、旭川神経疾患勉強会 MGH, 旭川, 2006 年 6 月 9 日
- 郭 伸：教育講演「多系統萎縮症」、第 4 回神経難病とケアを考える会、東京星陵会館、2006 年 6 月 24 日
- 相澤仁志、油川陽子、箭原 修、菊池健次郎。カベルゴリンによるrestless legs syndromeの治療の試み。第24回神経治療学会総会、横浜、2006年7月13-14日
- 郭 伸：孤発性 ALS の病因- glutamate 受容体と神経細胞死、平成 18 年度『筋萎縮性側索硬化症の画期的診断・治療法に関する研究』班ワークショップ『ALS の克服に向けて』東京 砂防会館、祖父江元班長、2006 年 7 月 28 日
- Pan W-D, Ohashi K, Yamamoto Y, Kwak S: Fractal analyses of parkinsonism by wearable accelerometer. *The 10th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders*, Kyoto, 2006年10月28日-11月2日
- 郭 伸、山本義春、Struzik, Zbigniew R、相馬りか、大橋恭子：電気的前庭神経刺激による神経疾患の治療、シンポジウムII「神経疾患の電磁気刺激による診断と治療」第 65 回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会、東京学術総合センター・学士会館、加我君孝会長、2006 年 11 月 16-17 日
- Hideyama T, Kawahara Y, Ito K, Nishimoto Y, Tsuji S, Kwak S: RNA editing in sporadic ALS and other motor neuron diseases. *The 17th International Symposium on MND/ALS*. Yokohama, 2006年 11月30日-12月2日
- Kwak S: ADAR2 underediting and death of motor neurons in ALS. *the Gordon Research Conference on RNA Editing*, Ventura, California, 2007年1月15-19日
- 只見知恵子、木村大輔、伊藤杏子、山下雄也、鈴木岳之、郭 伸：グリオーマ細胞における AMPA 受容体サブユニット GluR2 の RNA 編集率の検討、第80回薬理学会年会、2007年3月 14-16日
- 齋藤 司、相澤仁志、油川陽子、澤田 潤、牧田圭弘、菊池健次郎、齋藤仁十、安栄良悟、國本雅之、程塚 明。当院における脳卒中の診療実績とその検討。第32回日本脳卒中学会総会、福岡、2007年3月22-23日

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル 名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
日出山拓人、 郭 伸	髄液細胞数・蛋 白・糖	中井利昭	検査値のみか た改訂3版	中外医学 社	東京	2006	790-796
相澤 仁志	中毒性疾患	楠進	臨床病態学 1、脳・神経 系疾患	ヌーヴェ ルヒロカ ワ	東京	2006	211-221

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kawahara Y, Sun H, Ito K, Hideyama T, Aoki M, Sobue G, Tsuji S, <u>Kwak S</u>	Underediting of GluR2 mRNA, a neuronal death-causing molecular change in sporadic ALS, does not occur in motor neurons in SBMA patients or SOD1 transgenic rats.	<i>Neurosci Res</i>	54	11-14	2006
Sun H, Kawahara Y, Ito K, Kanazawa I, <u>Kwak S</u>	Slow and selective death of spinal motor neurons in vivo by intrathecal infusion of kainic acid: implications for AMPA receptor-mediated excitotoxicity inALS	<i>J Neurochem</i>	98	782- 791	2006
Hideyama T, Momose T, Shimizu J, Tsuji S, <u>Kwak S</u>	A PET study on the role of nigral lesions in parkinsonism in patients with ALS.	<i>Arch Neurol</i>	63	1719- 1722	2006

<u>Kwak S</u> , Weiss JH	Calcium permeable AMPA channel in neurodegenerative disease and ischemia.	<i>Curr Opin Neurobiol</i>	16	281-287	2006
Struzik ZR, Hayano J, Soma R, <u>Kwak S</u> , Yamamoto Y	Aging of complex heart rate dynamics.	<i>IEEE Transaction of Biomedical Engineering</i>	53	89-94	2006
Pan W, Ohashi K, Yamamoto <u>Kwak S</u>	Power-law temporal autocorrelation of activity reflects severity of parkinsonism	<i>Mov Disord</i>		印刷中	
Mizuno Y, Amari M, Takatama M, <u>Aizawa H</u> , Mihara B, Okamoto K.	Transferrin localizes in Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis.	<i>Acta Neuropathol (Berl)</i>	112	597-603	2006
Kobayashi H, Ngato T, Sato K, Aoki N, Kimura S, Tanaka Y, <u>Aizawa H</u> , Tateno M, Celis E.	In vitro peptide immunization of target tax protein human T-cell leukemia virus type 1-specific CD4+ helper T lymphocytes.	<i>Clin Cancer Res</i>	12 (12)	3814-3822	2006
<u>Aizawa H</u> , Aburakawa Y, Suzuki Y, Enomoto H, Makita Y, Kikuchi K, Kimura T, Yahara O.	Treatment of Asian restless legs syndrome patients with cabergoline. - An open clinical preliminary trial- ,	<i>Intern Med,</i>	45	453-455	2006
<u>Aizawa H</u> , Makita Y, Sumitomo K, Aburakawa Y, Katayama T, Nakatani-Enomoto S, Suzuki Y, Fujiwara K, Enomoto H, Kuroda K, Kimura T, Yahara O, Koyama S, Maruyama J, Nakamura M, Hasebe N, Kikuchi K.	Edaravone diminishes free radicals from circulating neutrophils in patients with ischemic brain attack.	<i>Intern Med</i>	45	1-4	2006

Mizuno Y, Amari M, Takatama M, <u>Aizawa H</u> , Mihara B, Okamoto K	Immunoreactivities of p62, an ubiquitin-binding protein, in the spinal anterior horn cells of patients with amyotrophic lateral sclerosis.	<i>J Neurol Sci</i>	249	13-18	2006
西本祥仁、日出山拓人、 河原行郎、 <u>郭 伸</u>	AMPA受容体サブユニットGluR2 のRNA編集とALSにおける神経細胞死	Clinical Neuroscience	24	222-225	2006
<u>郭 伸</u>	ALSの運動ニューロン死とグルタミン酸受容体の分子変化	神経研究の進歩	50	902-911	2006
<u>郭 伸</u>	家族性 ALS の特徴	医事新報	4296	87-88	2006
<u>相澤仁志</u> 、 <u>榎本雪</u>	帯状疱疹痛に対するガバペンチンの使用	神経内科	66	210	2007

224. 髄液細胞数・蛋白・糖

基準値

髄液細胞数	5個以下/mm ³ すべてリンパ球
蛋白	15~45 mg/dl
糖	50~75 mg/dl 血糖値の1/2~2/3
外觀	無色透明

検体採取条件と測定法

検査前に頸部CTで頭蓋内占拠性病変がないこと、眼底検査にてうつ血乳頭のないこと、出血傾向のないこと、局所麻酔アレルギーのないことを確認する。患者の同意を得た後に側臥位で頸部前屈の上、knee-chest position をとり、両腸骨稜の最上端を結んだ Jacoby 線 (L4の棘突起) を目印に L4/5 あるいは L3/4 から局所麻酔下にて、穿刺を行う。穿刺針は 21 G (場合により 23 G、細い方が穿刺後頭痛の頻度が減るが採取時間がかかる)、圧棒はデイスボーザールとし、すべて清潔操作で行う。まず、初圧を測定するが、このとき、頸部前屈を解き、下肢も屈曲位を緩めた姿勢で患者に深呼吸をしてもらって圧棒内の髄液が上下すること、そのとき一定値に落ち着くのを待って初圧とする。採取は自然滴下法で行い、採取時には髄液圧の初圧、Queckenstedt test、終圧測定、髄液の肉眼的性状を観

察する。採取項目に応じて 3~10 ml 採取し、終了後は 60 分以上の腹臥位での安静および当日は十分な水分摂取にて髄液の漏出による低髄液圧症候群の発症に留意する。禁忌となるのは頭蓋内圧亢進症状により脳ヘルニアをきたす危険性がある場合、穿刺部付近の瘻瘻や感染を認める場合、出血傾向、患者の協力が得られない場合である。

■細胞数: Fuchs-Rosenthal 計算盤法

髄液の最初の部分を用いて、採取後速やかに行う (1 時間以内)。長く放置すると試験管壁に細胞が付着したり壊れたりするので正確な数、形態の判断が困難になる。細胞の種類をみるには通常、遠沈後 May-Griental-Giensa 染色をし、単核球、多核白血球別に数える。

■蛋白: ピロガロールビッド法

■糖: 酵素法

いずれも速やかに行うことが望ましい (4 日以内)。とくに糖は室温で放置しておくこと細胞増多がある場合、速やかに減少してしまふ。生化学的検査は遠心上清を用いる。

どういいう検査か

脳脊髄液は、側脳室、第 3 脳室の脈絡叢で 1 日約 500 ml 産生され、脳・脊髄のくも膜下腔を満たし、総量は 100~150 ml であるため 1 日 3~4 回入れ替わる計算となる。傍矢状静脈洞に集まり、くも膜顆粒のフイラーを通じて静脈洞に流入し、体循環に吸収される。機械的衝撃からの保護、浸透圧平衡の維

持、代謝された老廃物の除去、脳の内部環境の恒常性の維持、免疫反応などの役目をはたしている。そのため、髄液は中枢神経組織、脳脊髄神経、脳髄膜の状態に何らかの障害が起これば、その状態を反映し、診断に重要な手がかりを与えてくれる。

■細胞数: 病原微生物が無菌状態の髄液内に直接あるいは血行性に侵入すると血中から白血球が動員される。脳出血や白血病、脳腫瘍の浸潤でも細胞は増加する。

■蛋白: 濃度勾配があり、腰椎部で濃く脳室に行くほど薄くなる。髄液蛋白の増加する機序には、

- 1) 感染などの炎症により血液脳関門 (blood-brain barrier) の透過性亢進、
- 2) 脳出血などの中枢神経系組織の破壊性病変に伴い、くも膜下腔への出血により血液中の蛋白が流入する場合、
- 3) 脱髄や腫瘍などで中枢神経内で反応性蛋白、主として免疫グロブリン合成が増加した場合、
- 4) 髄液の流れ、あるいは吸収が阻害される圧迫性病変、くも膜下腔の閉塞のようなものが存在する場合があげられる。

■糖: 髄液糖は血糖値に依存し、約 1.5~4 時間間の血糖値を反映する。そのため、4 時間は絶食の状態で髄液を採取し、同時に血糖を測定することが望ましい。髄液糖は髄液内の細胞や細菌、酵素の酵糖作用で消費される。

どんなとき検査するか

検査の適応としては、第一に中枢神経系感染症の診断であり、急性あるいは亜急性の発熱、嘔気・嘔吐、頭痛が認められ、髄膜炎、脳炎が疑われる患者に対して速やかに施行されるべきである。また、くも膜下出血 (SAH)

を積極的に疑う臨床経過であるが、頸部CTで異常がないときに施行する。その他には診断の一助として、中枢神経系の悪性腫瘍、転移性腫瘍などの腫瘍性疾患、多発性硬化症に代表される脱髄性疾患、Guillain-Barre 症候群 (GBS)、Fisher 症候群、慢性炎症性脱髄性神経根炎 (CIDP) など特異的髄液所見を示す疾患で行われる。検査を成功させるポイントとしては、正しい体位の保持、正しい椎間と穿刺部位、十分に声をかけながら患者の不安をできるだけ減らすこと、約 20% で認められる腰椎穿刺後頭痛の予防があげられる。

異常値を呈する疾患 (病態)

髄液細胞増多、蛋白増多、糖低下の場合に問題となり、鑑別が必要な疾患を表 1 にあげた。また髄液圧上昇は脳圧亢進を伴う疾患に多くみられるが、圧のみの変化として、上昇する場合、良性頭蓋内圧亢進症、硬膜動静脈瘻、低下する場合、低髄液圧症候群などが留意点である。

異常値とその他の診断プロセス

表 1 のような異常値が出た場合には、髄液細胞増多の有無、蛋白増多の有無、糖低下の有無といった組み合わせ、および以下のよう検査を合わせて総合的に病態を判断する。髄膜炎では表 2 のような髄液所見となり、治療方針を立てる際に抗菌剤の選択に重要である。髄膜炎は急性疾患であり、細胞数増加で髄膜炎と診断後、エンピリカルに治療を始めることが一般的である。しかし、耐性菌の発生や医療費高騰を抑えるためには、直ちにグラム染色により起炎菌を同定することが必須である。髄液をスピンドザンし、グラム染色で検鏡する。検鏡ができない施設では、ラテックス凝集反応などを利用したキット (髄液中

表 1 異常値

項目	増加	減少
髄液細胞数	<p>軽度増加 (5~50 個)</p> <p>多発性硬化症 膠原病類縁疾患 (サルコイドーシス, Behçet 病など)</p> <p>脳腫瘍</p> <p>亜急性硬化性全脳炎</p> <p>中等度増加 (50~500 個)</p> <p>リンパ球優位</p> <p>ウイルス性髄膜炎</p> <p>真菌性髄膜炎</p> <p>結核性髄膜炎</p> <p>梅毒性髄膜炎</p> <p>多核球優位</p> <p>ウイルス性髄膜炎初期</p> <p>細菌性髄膜炎</p> <p>髄膜炎</p> <p>髄膜下腫瘍</p> <p>高度増加 (500 個以上)</p> <p>細菌性髄膜炎 (多核球優位)</p> <p>急性散在性脳脊髄炎 (ADEM)</p> <p>Rasmussen 脳炎</p>	<p>軽度減少 (40~50 mg/dl)</p> <p>サルコイドーシス, SLE</p> <p>中等度減少 (20~40 mg/dl)</p> <p>結核性髄膜炎</p> <p>真菌性髄膜炎</p> <p>癌性髄膜炎</p> <p>高度減少 (<20 mg/dl)</p> <p>細菌性髄膜炎</p>
蛋白	<p>軽度増加 (45~100 mg/dl)</p> <p>ウイルス性髄膜炎</p> <p>Guillain-Barré 症候群, Fisher 症候群, CIDP</p> <p>頸椎症, 腰椎症</p> <p>糖尿症</p> <p>ニューロパチー</p> <p>多発性硬化症</p> <p>甲状腺機能低下症</p> <p>中等度増加 (101~400 mg/dl)</p> <p>結核性髄膜炎</p> <p>真菌性髄膜炎</p> <p>ウイルス性髄膜炎</p> <p>脳腫瘍</p> <p>脳出血</p> <p>CIDP (101 mg/dl 以上のこともある)</p> <p>高度増加 (401 mg/dl 以上)</p> <p>細菌性髄膜炎</p> <p>結核性髄膜炎 (401 mg/dl 以上のこともある)</p> <p>脊髄腫瘍</p>	<p>低染濁</p> <p>髄液腫</p> <p>良性頸蓋内圧亢進症</p> <p>甲状腺機能亢進症</p> <p>水中毒</p> <p>1~2 歳児</p>
糖	<p>糖尿症, 高血糖</p> <p>脳出血</p> <p>脳腫瘍</p> <p>日本脳炎, ポリオ</p>	<p>軽度減少 (40~50 mg/dl)</p> <p>サルコイドーシス, SLE</p> <p>中等度減少 (20~40 mg/dl)</p> <p>結核性髄膜炎</p> <p>真菌性髄膜炎</p> <p>癌性髄膜炎</p> <p>高度減少 (<20 mg/dl)</p> <p>細菌性髄膜炎</p>

表 2 髄液検査と疾患

項目	外観	圧	細胞数 /mm ³	蛋白 mg/dl	糖 mg/dl	その他
正常	水様透明	50~180	5 以下	15~45	50~80 mg/dl, 血糖値の 1/2~3/2 分の正常	
毒性	膿性, 混濁	200~600	50~1000 多核白血球優位	100~500	0~20	乳酸増加, 37°C 保存 (髄膜炎菌は低温で死滅) し, スピンタウソングラム染色, ラテックス凝集反応や ELISA 法による迅速診断が可能
ウイルス性	水様透明, 時に日光微塵	100~300	30~500, リンパ球優位	20~100	50~80	ウイルス分離 (コクサツキ, エコー, ポリオ, エコー, ムンプス, HSV, VZV) 2 週間以上で抗体価の 4 倍以上の上昇 (OF) や抗原特異性 IgM 抗体の上昇, 感度の高い ELISA 抗体
毒性	水様透明, キサンチンロミー	200~600	50~100 リンパ球, 単球優位	100~200	<40	ADA 上昇, チール・ニルセン染色, 培養, TB-PCR
毒性	水様透明, キサンチンロミー	200~600	50~500 リンパ球, 単球優位	100 前後	<40	墨汁染色, PAS 染色 ラテックス凝集反応でクリプトコッカス抗原測定 サフロウ培地
注	水様透明 ~混濁	200~600	0~500, 単核球優位, 腫瘍細胞の出現	正常~1000	<40	スピンタウソングラム染色, 腫瘍マーカー (CEA など), サイトカイン, LDH ↑, 繰り返し細胞診
毒性	時に混濁	200~400	500 前後で単核球優位	100 前後	正常~軽度減少	FTA-ABS テスト STS, TPHA
ウイルス性	水様透明	60~180	0~100 で単核球優位	50~200	正常~時に軽度減少	ACE, リゾチーム
メチルコリン	一般髄液検査正常に加え, Tau 蛋白 (Alzheimer 病における神経原性線維変化に関連する蛋白) 増加, アミロイド β 1-42 の減少およびアミロイド β 1-40/β 1-42 比の増加 (老人斑) による組み合わせは早期診断に有効					
主要化症	細胞数正常, 蛋白軽度上昇, IgG 増加, IgG index 増加, MBP 増加率, オリゴクローナルバンド陽性率は日本人では低く, 前者は髄鞘構成蛋白で MS の経過観察には用いられるが脳炎, 脳梗塞でも上昇し, 後者は膠原病, 梅毒, ポリオウイルス感染, SSPE でもみられ, 特異性に乏しい,					
Ziefeldt-Jakob	14-3-3 蛋白 ↑, NSE ↑					
Gin-Barré 症	細胞数は正常から軽度増加 (<10/mm ³) であるが, 蛋白が増加 (通常 <100 mg/dl) する蛋白細胞溶解症が有名である. 血清中の抗カンダグリアオンチド抗体陽性					
Behçet, CNS Sjøgren 症	HTLV-1 抗体陽性					

抗体: complement fixation (補体結合抗体), ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay
 A: adenosine deaminase; 正常値 0~9 U/l, SPE: subacute sclerosing panencephalitis
 E: neuron specific enolase, HAM: HTLV-1 associated myelopathy
 S: central nervous system
 index = (髄液 IgG/血清 IgG) / (髄液アルブミン/血清アルブミン) (正常値: 0.34~0.85):
 中枢神経系での γ グロブリン産生の指標
 軽度髄液では IgG は血清由来である. 髄液中 IgG の増加は骨髄腫や炎症性疾患などにより血清免疫グロブリンが増加した場合と血液脳関門の破壊による増加, 中枢神経系での免疫グロブリン産生による IgG 増加による。

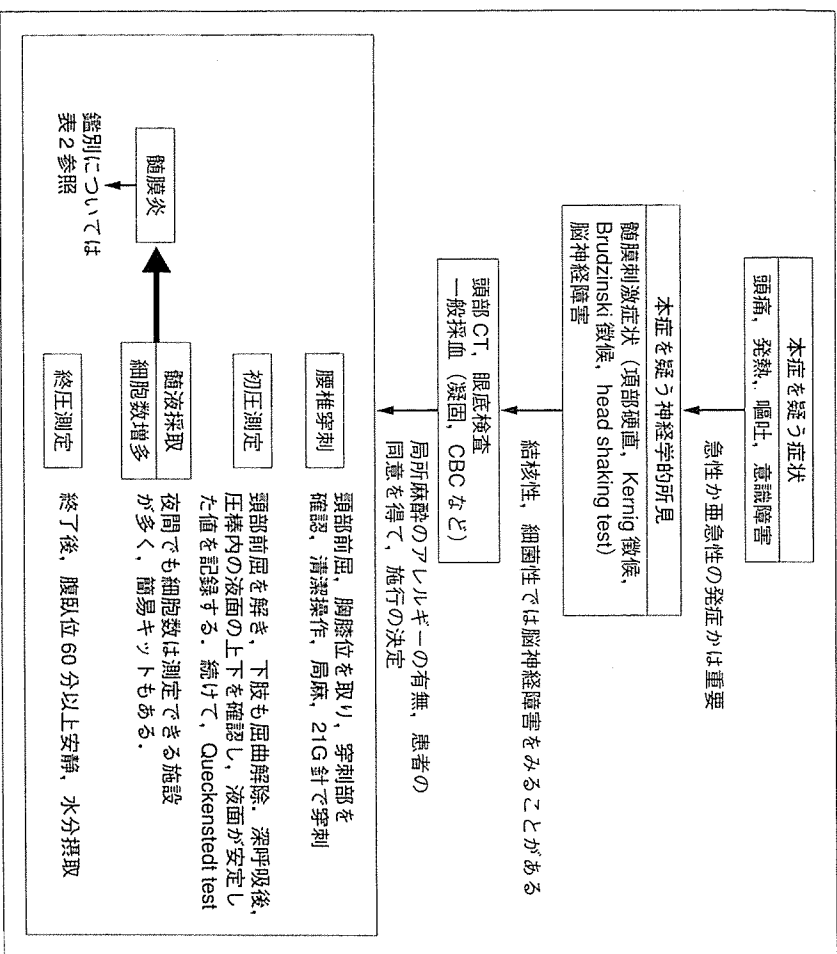


図 1 髄膜炎の診断プロセス

肺炎球菌抗原、ヘモフィルスインフルエンザ
菌 A 群抗原、B 群溶連菌抗原、髄膜炎菌抗原、クリ
プトコッカス抗原など）も市販されているの
で積極的に利用されたい。また、PCR がウイ
ルス（単純ヘルペスウイルス-1・2、水痘-帯
状疱疹ウイルス、サイトメガロウイルス、
Epstein-Barr ウイルス、JC ウイルス、日本
脳炎ウイルス、mumps virus など）、結核菌、
トキソプラズマ感染症の診断に有効である。
また、トピックとして、Alzheimer 病に
おけるタウ蛋白の増加や Creutzfeldt-Jakob
病 (CJD) の 14-3-3 蛋白の検出、膠原病、と

くは神経 Behçet 病での IL-6 上昇などが現
在診断の際に有用なツールとなっている。

検査値ピットフォール

①血液混入: SAH, traumatic tap
とくに、traumatic tap と SAH による出血
の鑑別が重要である。SAH では圧が上昇し
ていることが多い。また、清潔な試験管に 3 本
ずつ少量ずつ順次採取する (three-tube
test)。Traumatic tap であれば、徐々に薄く
なるが、SAH の場合には不変である。また、
白血球:赤血球比が血液の 500~1000:1 に

近いほど traumatic tap の可能性が高く、採
取した髄液が血栓化することが多い。さらに
髄液を遠心分離すると、その上清は出血後
7~8 時間経過していれば透明橙黄色調
(xanthochromia) を呈するが、traumatic tap
では透明である。xanthochromia の鑑別とし
ては、髄液蛋白量が 150 mg/dl 以上の場合、
高ビリルビン血症、カロチン過剰摂取、リフア
ンピソン内服中でも髄液上清が黄色がかつて
みえるが、吸光度測定などにより真の xantho-
chromia と鑑別できる。

ヘルペス脳炎では壊死性病変を引き起こす
ことがあり、血性髄液、xanthochromia が認
められることもある。診断は臨床経過から明
らかであることが多いが、意識障害で臨床経
過がわからない場合にはこの髄液所見以外に
髄液や頭部 CT、MRI (FLAIR 画像) による
前頭側頭葉病変の確認が有用である。

なお、traumatic tap の場合には細胞数の
正確な測定ができないが、以下の簡易式でお
よその本来の白血球細胞数が計算できる。

本来の髄液中白血球数 = 髄液中全白血球
数 - 末梢血中白血球数 × 髄液中赤血球数
÷ 末梢血中赤血球数

またはヘマトクリットを利用したキャピラ
リー遠心による赤血球算定より簡便に可能で
ある。

②髄液糖

血糖値との比較が重要であり、髄液糖の数
値が 50~74 mg/dl の一般的な成書に書かれ
ている数値内にあっても高血糖の場合には低
値と考える必要がある。

③蛋白

一般的に細胞数が増加すると蛋白も増加す
るが、細胞数が増加せずに蛋白が増加するこ
とを蛋白細胞解離といい、GBS, Fisher 症候
群、CIDP でみられ、診断の一助となる。

④細胞数

初期にはウイルス性髄膜炎でも好中球優位
のことがあり、また抗生剤を投与されていた
場合には細菌性髄膜炎でもリンパ球優位のこ
とがあり、問診が重要である。リンパ球優位
な場合はウイルス性髄膜炎が多いが、リステ
リア感染でもリンパ球優位な髄液所見が認め
られる。リステリア感染は、人畜共通感染症
であり、インフルエンザと同時にみられる
ことが多いのでインフルエンザ流行期ではイ
ンフルエンザとの鑑別が必要で、免疫不全患
者、高齢者、妊婦の場合、注意する必要がある。
臨床症状、諸検査からは鑑別が困難であ
るが、アンピシリンが効果を示すためエンピ
リカルに投与することも検討する。

細菌性髄膜炎や結核性髄膜炎が疑われた場
合には、治療が遅れると予後不良であるため、
年齢、随伴症状などの臨床経過とグラム染色
に基づいて速やかに治療を開始する。とくに
結核性髄膜炎は診断が困難なことが少なく
いたため、否定できない場合には原則的に抗結
核剤を投与する。同時並行で治療効果、髄液
の再検、PCR、細菌のキット、培養で適切な
感染原因の細菌、ウイルスを決定し、常に治
療方針の適正化をはかる。

細胞数増多があるが培養でも起炎菌の同定
ができない場合、多くは無菌性髄膜炎であり、
ほとんどが self-limiting に症状が改善し、培
養や PCR、抗体価などで同定できないことが
多い。一方で、起炎菌が同定できず、症状が
改善しない場合、HIV 感染、癌性髄膜炎や寄
生虫感染、膠原病である可能性も考慮した検
査計画を立てる必要がある。髄液検査では、
May-Grünwald-Giemsa 染色の際に花冠状
の核をした異型白血球がみられることがあ
り、HAM (HTLV-I associated myelopathy)
やリンパ腫の診断に役立つ。中枢神経器性リ

ノン腫での可溶性 IL-2 レセプター, IL-10, LDH, β_2 ミクログロブリンの増加などが有用である。また, 腫瘍細胞の検索には Papanicolaou 染色, 腫瘍マーカー (CEA, AFP, S-100 蛋白など) が有用である。また, 海外渡航歴のある場合, その地域の流行感染症の状況をチェックする必要があり, 国内では経験しないヒストプラズマ感染症やアメーバ, 寄生虫感染症を考慮する必要がある。また, 神経 Behçet 病での IL-6 上昇も有用である。

⑤培養

髄膜炎菌は低温で死滅するので 37°C で保存するか速やかに検査する。細胞数, 細胞診, 糖も速やかに行わないと正確な結果が得られない。

⑥CT値・MR値

①髄液圧高値 (>200 mmH₂O)

髄液圧高値の場合には腰椎穿刺で髄液を採取することで脳ヘルニアを起こして死亡する場合があるため, 必ず実施前に頭部 CT で頭蓋内占拠性病変のチェック, 眼底でうつ血乳頭を確認することが重要である。施行中に高値であった場合には, それ以上髄液を採取せずに圧室内の髄液を検査用とし, 速やかに腰椎穿刺を中止し, その後のバイタルサインをこまめにチェックするようにする。頭蓋内圧亢進症状が脳ヘルニアを起こすリスクが高い場合には抗浮腫療法としてグリセロール, ステロイド投与, 低体温, バルビツレート, 過換気, 必要に応じて外科的減圧術を検討する。

このような病態が疑われず, 髄液圧高値の場合には緊張や息こらえをしていたり, 不自然な体位になっていることがあるのでこれらを正常に戻すようにする。

髄液圧は正常になることが多い。

②髄液白濁

細胞数が 1000 個/mm³以上のことが多く, 細菌性髄膜炎が疑われる。とにかく迅速に適切な抗生剤の投与を行う。

③血性髄液

前述したが, SAH が疑われる場合には, 再破裂が起こらぬように不要な刺激を与えぬように血圧管理を行いながら迅速に脳外科医に指示を仰ぐ。

④蛋白細胞解離

臨床経過で先行感染があり, 数日の経過で下肢から始まる四肢の筋力低下, 四肢腱反射低下があり, 髄液蛋白細胞解離が認められる場合, GBS が疑われる。失調, 眼球運動障害, 腱反射低下があれば, この重型の Fisher 症候群が疑われ, 慢性的な経過で繰り返される症状であれば CIDP が疑われる。GBS では急性の経過で呼吸筋麻痺に至り人工呼吸器管理が必要になることもあり, 経過が速い場合, 呼吸状態に異常がある場合 (たとえば呼吸数の増加), 血圧の急激な変動, 起立性低血圧といった自律神経症状をみるときは, 血漿交換療法, 大量 γ グロブリン療法を直ちに施行し, 慎重に経過を観察する。

文献

- 1) 日山山拓人, 他. 日本内科学会誌第 94 巻, 2005: p. 2552.
 - 2) 宮地隆史, 他. In: Medical Practice 編集委員会編. 臨床検査ガイド 2005-2006. 初版. 東京: 文芸堂; 2005. p. 942.
 - 3) 眞重文子. In: 高久史郎, 編. 臨床検査データベース 2001-2002. 初版. 東京: 医学書院; 549.
- <日山山拓人 郭 伸>

B₁₂などの多栄養因子欠乏による神経症といえる。

(3) 症状、診断

ペラグラの臨床徴候として、古典的な3Dの皮膚炎 (dermatitis)、下痢 (diarrhea)、認知症 (dementia) 4徴候、さらに未治療の場合には死亡 (death) が知られ、4D症候群として知られてきた。発症は緩徐で、食欲不振、下痢の脱力、無関心、いらいらするなどを訴え、発初期には神経衰弱的なほかの疾患と誤られることも少なくない。粗雑がまず唇周囲に出現し、次第に赤褐色調に変化し、一息やけどのときの皮膚のようにみえる。精神・神経症状は初期が進行と出現し、ペラグラ脳症、ペラグラ精神病として知られる。一方、骨髄症状としては紅血球破壊を認め、髄液反射低下、筋力低下の程度は軽く、骨髄障害により隠されてしまうこともある。これらの精神・神経症状は皮膚炎症の出現前に先行してみられることもある。こうした臨床的徴候に注意して臨床的診断ができる例が多いが、最終的にはチアミンの定量が重要である。

(4) 治療

診断早期に300～500mgのチアミンの投与を行う。重症例には1000～1500mgの大量投与をする。また、チアミンのみならず、ほかのビタミンを総合的に補給することが大切である。ペラグラは早期診断、適切な治療により、劇的な改善が期待し得る疾患である。

3) ビタミンB₁₂欠乏症

ビタミンB₁₂欠乏症は血液精神神経系、胃腸系などに症状を起す。大部分は胃切除後に発症する。このビタミンの吸収には内因子が必要であるが、遺伝的因子欠損症は日本では稀である。神経症状としては、亜急性性脊髓連合変性症 (subacute combined degeneration of spinal cord) が知られる。50～60歳代の胃切除術後の患者に発症する。足の異常感覚、次いで腰部知覚障害を呈して感覚性運動失調をきたす。Romberg徴候が陽性となる。また、下腹筋力低下、本指神経障害、踵作路障害も合併する。本指神経障害は軸索型障害を呈する。精神症状として抑鬱に対する過敏性、パノニア、苛達、記憶障害を認めることが多い。

4) 葉酸欠乏症

葉酸 (folic acid) はほうれん草や豆腐などに含まれ、核酸や赤たんぱく質の合成に関与している。成人男子の葉酸必要量は、50mgで、正常血清濃度は2.4～9.8ng/mlである。葉酸欠乏症は摂食障害、小腸腸管形成やスプレーなどの小腸疾患による吸収障害、妊娠や早産阻害能丸進症などの薬物の介入、メトトレキサートなどの薬剤によって起こる。

葉酸欠乏による巨赤芽球性貧血、舌炎、消化器障害はよく知られ、神経症状は稀とされてきたが、脳腫瘍または軸索障害による感覚神経線維の末梢神経障害、ビタミンB₁₂欠乏症に類似し、骨髄液赤血球を呈する骨髄障害、認知神経病状をきたす。葉酸はもとより細胞分裂や成熟に不可欠なビタミンで、最近ではアルツハイマー病との関係で重要性が唱えられている。

葉酸欠乏の治療は、血清葉酸濃度が正常化するまで5～15mg/日の葉酸を経口投与する。

5) ビタミンE欠乏症

成人のビタミンE必要量は8～11mg/日で、正常血中濃度は10～15ng/mlであり、通常食

期間にわたる欠乏状態で発症する。ビタミンE欠乏症は肝や消化管疾患による脂肪吸収障害、脂肪運搬障害、α-トコフェロール (α-tocopherol) 転移たんぱく遺伝子異常によって生じることが知られている。脂肪吸収障害には胆汁分泌の低下による脂肪の消化障害があるものと、ビタミンEの吸収部位である空腸に器質的な障害がある場合がある。胆汁うつ滞をきたす先天性胆道症では、小腸内の胆汁酸濃度低下のための胆汁のビタミンE吸収障害がみられる。

運動性神経症では、先天性に腓骨外分泌能が障害され、ビタミンEの欠乏をともなう。また、小腸スプレー病、クローン病などで小腸を切除した例、悪性腫瘍で腹部に放射線療法を行った例や慢性肺炎も吸収障害を呈する。脂肪運搬障害は先天性にアポたんぱくBが欠損する無βリポたんぱく血症があげられる。

ビタミンE欠乏症の神経症状としては、構音障害、眼振、腰部知覚障害の後索性運動失調、踵反射消失、筋力低下、本指神経障害がみられ、骨髄小脳変性症に類似した症状を呈し、フリースタートヒ運動失調症と誤診される可能性がある。

(1) 治療

脂酸トコフェロールを200～600mg/日経口投与し、血中濃度と臨床症状をみて改善がなければ、高用量、または100～200mg/日の脂酸内投与を行う。

(2) 予後

ビタミンE欠乏症の一般的予後は、いかに早い段階で診断、治療が行われるかによって予後は大きく異なる。いずれにしても適切な診断と早期の治療開始は予後を大きく改善させる。後遺症が残る場合もあるが、治療によりかなりの改善が期待できる。

(3) 経過・合併症

治療により神経学的所見は一般的に改善が期待できるが、ビタミンB₁₂欠乏症のように重症の場合は他の神経をともなう場合もあり得る。迅速な診断と適切な治療が最も重要である。

(4) 患者指導、ケアのポイント

ビタミンE欠乏をきたした患者の食生活や日常生活の問題点を明らかにし、その改善法を指導する。ビタミンB₁₂やB₆の欠乏症のように患者の知的レベルの障害がある場合は、一般の認知症患者と同様な看護上の注意を要する。

【参考文献】

1. 水野真太郎編、西澤正徳 (2000) 神経内科ハンドブック、p617-p621、中外医学社

II その他の疾患

1 中毒性疾患

(1) 概要

外界から消化器、呼吸器、皮膚、注射などの経路を介して体内に吸収された毒物により、生体機能が障害される状態を中毒という。神経系は中毒によって障害されやすい臓器の一つであり、特に急性中毒においては、初期治療が極めて重要である。

急性中毒は少量で毒物の高いものの摂取あるいは睡眠により生じる場合と、通常は毒物のない

ものでも過量に摂取することにより中毒になる場合がある。少量では毒性の高い阿としてモソリ
ス又毒素、ふくみ、ヒ素、一酸化炭素 (CO)、チリンなどである。過量摂取で呼吸が強く問題と
なるものは睡眠薬・鎮静薬、エナルアルコールなどである (表1-54)。

表1-54 主な中毒性神経疾患の原因

薬物	睡眠薬・鎮静薬、麻酔薬、抗精神薬、 抗うつ薬、抗てんかん薬、抗がん薬
アルコール	エタノール、メタノール
農薬	パラコート、シクロフクトン、有機リン系殺虫剤
炭中毒	木質コークス、炭、すす、母灰の燃 焼ガス
重金属	水銀、鉛、ヒ素、マンガン、タリウム
有機溶剤	n-ヘキサン、トルエン (ベンゼン)
ガス	CO、チリン

(2) 病因・病態生理・発生機序

a 薬物中毒

神経系の障害を引き起こす薬物は少なくない。多くの薬物は中毒することにより可逆的である
が、後遺症を残すこともあるので注意が必要である。睡眠薬・鎮静薬による急性中毒は、自覚的
的の大量服用によることが多い。わが国の急性麻薬中毒の大半は覚醒剤のメタンフェタミンで、
その乱用が女子中高生に拡大し問題となっている。睡眠薬・鎮静薬、麻酔薬・覚醒剤、抗精神薬、
抗うつ薬、抗てんかん薬、抗がん薬などが原因となる。

b 急性アルコール中毒

アルコールの大量摂取により、中枢神経障害をきたす。摂取されたエタノールの25%は胃から
吸収され、残りは上部消化管で吸収される。肝臓ではアルコール脱水素酵素、アルデヒド脱水素
酵素により代謝される。エタノールは神経細胞膜のナミノ酸受容体のオゾンチヤマルに作用し、
細胞内へのカルシウム流入が抑制される。その結果、中枢神経系に対し抑制性効果を発揮する。

c 慢性アルコール中毒

慢性アルコール中毒は、アルコール依存症とはほぼ同義でアルコールの過剰摂取を要めることか
らで、精神のおよび肉体的にアルコールに依存している状態である。慢性のアルコール中毒は
アルコール自体による毒性あるいは随伴する栄養障害・代謝異常による神経系障害とアルコール
糖質に基づく障害に分けられる (表1-55)。

d 農薬中毒

パラコート・シクロフクトンは除草薬として使用されていたが、飲用すると毒性が強くなり、目
あるいは視覚に使用されることがある。シクロフクトンはパラコートより低毒性である。ミトコンドリア
電子伝達系に作用し、細胞膜を傷害する。特に肝・脾・腎臓が強く感受的になることが多い。
有機リン系殺虫剤は急性中毒が主体である。アセチルコリンエステラーゼ阻害作用によりコリ
ン作動性神経刺激状態となる。

e 炭中毒

チリンスス毒は嫌気性グラム陽性菌であるチリンスス菌が産生する外毒素 (A, B, E) であ

表1-55 慢性エタノール中毒による神経系障害

エタノールの慢性中毒は興奮性神経伝達物質 (代謝異常に基づく障害)
1 Wejnicker-Korsakoff症候群
2 Marchiafava-Bignami症候群
3 アルコール性大脳萎縮
4 アルコール性小脳萎縮
5 慢性肝臓病
6 神経障害
7 アルコール性ミオパチー
8 アルコール性多発ニューロパチー
9 アルコール性ミオパチー
アルコール代謝に基づく障害 (遺伝性代謝)
1 急性肝臓病
2 糖尿病 (糖質代謝)
3 虫咬症 (免疫反応)

る。A群の毒性が強い。わが国では、E群が多く、いずれも、チリンスス菌などにおいて免疫バクテ
リアのような嫌気性環境下でチリンスス菌が繁殖し毒素を生成する。毒素は神経筋接合部の伝達を障
害し、毒素摂取後12~24時間で発症する。

ふくみ中毒は主にふくみの毒素、肝臓に含まれるチトクロムタンパクとよばれる神経毒により、舌や
手指のしびれが起こり、さらに重症例では呼吸筋麻痺により死亡することもある。チトクロムタン
パクはコリン作動性神経からアセチルコリンの遊離阻害を起こす。そのためNa⁺チャネルを抑制
し心筋・骨格筋の神経筋活動が遮断される。

わが国では約1500種類以上のきのこのうち、最も頻度のあきのが知られている。死亡例は少
ないが中毒は年間200~400例みられる。多くは中等度の胃腸炎を起こすが、神経毒性を有するも
のがある。

f 重金属中毒

水銀、鉛、ヒ素、マンガン、タリウムなどの中毒により神経系の障害を引き起こす。わが国では
有機水銀中毒による水俣病患者が多数発生した。鉛中毒・マンガン中毒は、鉱山や鉛業・工場な
どで職業病として発生してきた。ヒ素中毒は1988年の相模原ヒ素入りカレー事件などで知られて
いる。タリウムは急性中毒が多い。重金属は神経系に毒性を有し、多様な神経・神経症候群を引き
起こす。ヒ素は細胞内呼吸をさまざまな段階で阻害し、その毒性を発揮することが知られている。

g 有機溶剤中毒

有機溶剤で神経系に毒性をもつものは少なくない。代表的なものにn-ヘキサン、トルエンがあ
る。n-ヘキサンは化学工業分野の溶剤、接着剤、洗剤などに使用され、木相神経障害が特徴で
ある。トルエンはソルナーの主成分で頭脳作用により中枢神経系が強くでるのかが特徴である。

h ガス中毒

一酸化炭素 (CO) は無色、無臭、非刺激性であり呼吸に気づくことが少ない。燃料の不完全燃
焼や自動車排気ガス、火災などの際に発生する。一酸化炭素中毒は中毒による死亡で最も頻度

f 重金属中毒

主な精神・神経症状の特效を表1-59に示した。そのほかの症状としては、鉛中毒では腹部症状が強く毒性の強い鉛痛（鉛痛痛）が有名である。ヒ素中毒では消化器症状に加えショック、血便、尿毒症も呈する。マニガン中毒ではパーキンソン人と精神症状が特徴である。

g 有機溶剤中毒

急性中毒のときは意識障害、精神症状、認知症、痙攣などをきたす。慢性中毒では末梢神経障害を起すものが多い。

表1-57 ふぐ中毒の重症度分類（福田）

重症度	臨床症状
I度	嘔吐、発汗、脱走などのみで、48時間以内の回復を認める
II度	全身の運動障害、呼吸障害の出現、呼吸困難、尿内血便
III度	血性・尿内血便、意識障害

表1-58 毒きのご中毒

毒き	摂取経路と摂取量	精神神経症状	その他の症状
ツキヨタケ	30分～2時間	急性脳症（物忘れ）	呼吸、発汗、痙攣
アサギタケ	30分～2時間	チアノーゼ、呼吸困難	痙攣、下痢、発汗
カタタケ	30分～2時間	呼吸障害、発汗、痙攣	白血球↑
ツノシタケ	30分～2時間	呼吸、発汗、痙攣	痙攣、発熱
ムシコシタケ	30分～1時間	痙攣、発汗、痙攣	痙攣、血圧上昇
シロシタケ	30分～2時間	痙攣、発汗、痙攣	発熱
シロシタケ	30分～2時間	痙攣、発汗、痙攣	発熱
クササコ	2～4日	痙攣	呼吸器障害に由来

表1-59 重金属中毒による神経系障害

重金属	精神症状	運動	パーキンソン	小脳	視力	認知	痙攣	末梢神経
鉛	++	+	+	+	+	+	+	++
水銀	+	+	+	+	++	++	+	++
ヒ素	+	+	+	+	+	+	+	++
タリウム	+	+	+	+	+	+	+	++
マニガン	+	+	++	++	+	+	+	++

h ガス中毒

CO中毒の臨床症状と血中COHb濃度は相関する（表1-60）。最終的には呼吸不全、肺水腫、腎不全、四肢筋壊死、脳障害などの多臓器障害を起す。ナリシ中毒では痙攣、気道分泌亢進、不穏、運動失調、構音障害、痙攣、脱力、呼吸筋麻痺をきたす。

(4) 検査と診断

中毒性疾患では原因物質を尿・血液から同定することにより確定診断をつける。また薬物服用歴や毒物曝露歴が重要である。中毒性神経疾患で特徴的な検査所見を表1-61に示す。一般化炭素中毒においては動脈血ガス分析で、代謝性アシドーシスを示すか、酸素飽和度は低下しない。COナリシナリにより血中COHb濃度の測定が可能であるが、時間経過や酸素投与により消失されることに注意する。

表1-60 CO中毒の症状

血中CO-Hb濃度	症状
10%以上	頭痛、めまい
30%	痙攣、脱力感、意識障害
50%	痙攣、脱力感
70%	呼吸停止、心停止

表1-61 中毒と主な検査所見

中毒	検査所見
急性アシルコリン中毒	血中アシルコリン濃度上昇
有機リン系殺虫剤	血中アシルコリン濃度上昇
ホウリウ又又中毒	ホウリウ又又毒物の尿中濃度上昇、尿中ホウリウ又又毒物の尿中濃度上昇
鉛中毒	尿中鉛濃度上昇、血中鉛濃度上昇
鉛ヘキサミン塩中毒	尿中鉛濃度上昇、血中鉛濃度上昇
ナリシ中毒	血中ナリシ濃度上昇
一般化炭素中毒	代謝性アシドーシス
ナリシ	血中ナリシ濃度上昇

(5) 治療

a 急性中毒患者への一般的対応

急性中毒患者が疑われた場合は、ほかの救急疾患と同様に、意識状態、呼吸、脈拍、眼拍、瞳孔などのバイタルサインのチェックを迅速に行う。必要に応じて救急措置を行い、全身管理が必要かどうかを判断する（図1-19）。原因毒物の把握は治療の根本にかかわるので、発見時の状況や目撃者や同居人など周囲の人からも情報を得て毒物を同定することが重要である。毒物に付する処置などの情報は付録で、電話あるいはインターネットで日本中毒情報センターから提供されている。経口摂取の場合、未吸收の毒物を除去するために胃洗浄を行うが、錠剤または顆粒ナリシ中毒では30分以上経過しては胃穿孔の恐れがあるので行わない。意識障害がある場合は誤嚥を防

が強く、日投が半量以上である。COはヘモグロビン(Hb)に対する親和性が酸素の200倍以上であり、カルボキシヘモグロビン(CO-Hb)が生成され、酸素運搬能力がいつくはるしく低下するため、中枢神経や心臓などが侵害される。空気中のCO濃度は0.01%であるが、吸入濃度が1%以上になると即死する。CO中毒では血液は鮮紅色を示す。

サリンは4人の開発研究者の名をとってSARINと名づけられた有機リン系神経剤で、化学兵器としてドイツで開発された。わが国では阪本サリン事件、地下鉄サリン事件で使用され多数の犠牲者が出た。無味、無臭の液体で揮発性が高く、皮膚・気道粘膜から吸収される。治療でコリンエステラーゼに結合しその作用を阻害する。その結果、アセチルコリンが過剰になる。

(3) 症状

a 薬物中毒

急性中毒では意識障害、痙攣などを起こすことが多い。慢性中毒では認知症、パーキンソン病、不随意運動、小脳失調、視神経障害、脊髄障害、末梢神経障害などが知られている。麻薬・覚醒剤では意識障害による抑制状態と高度の興奮状態のことがある。

b 急性アルコール中毒

脳内濃度は血中濃度とはほぼ同じで、血中濃度と中毒症状が相関する。高濃度では生命の危険がある。エタノールには抗利尿ホルモン抑制作用、末梢血管拡張作用、発汗作用があり、脱水や体温低下になりやすい(表1-56)。

表1-56 血中エタノール濃度と症状

血中エタノール濃度 (mg/dl)	症状
5~25	認知障害、協調運動障害、多幸症、能動性
25~50	感覚性障害/主管、判断の障害
50~100	構音障害、運動失調、眩暈、反射時の延長、視野の制限、行動変化
100~150	悪寒、嘔吐、うつれ態、興奮、攻撃的、痙攣、意識不明
150~250	健忘、意識不醒、痙攣、昏倒、低体温、散瞳
約300	昏倒
約400~500	昏倒、呼吸抑制、死亡

c 慢性アルコール中毒

1 Wernicke-Korsakoff症候群

Wernicke症候群は意識障害、眼球振、眼球運動障害、失調性歩行を主徴とする。チアミン(ビタミンB1)欠乏により第3脳室・中脳水道・第4脳室周囲白質・乳頭体に出血などの病理変化がみられる。次いで回復期にKorsakoff症候群として、記憶力低下、作話などをきたす。

2 アルコール性大脳・小脳萎縮

遊走性下、軽度の認知症を示し、大脳の萎縮、脳室の拡大を認める。発症例は十分わかっていない。小脳前葉に限局した萎縮が特徴で、失調歩行を示す。四肢失調や構音障害をときにともなうが聴覚は保たれる。

3 アルコール性エロパナー

慢性脳症を主体とするがビタミンB1欠乏はない。

4 アルコール性多発ニューロパシー

遠位優位の感覚運動多発ニューロパシーをきたす。

5 アルコール性ミオパシー

民間の経験で遠位筋力の萎縮・脱力や下腿に強い。アルコールの大量摂取時に振動筋感解症あるいは脱カリウム性ミオパシーとして発症することがある。

6 アルコール性脳血管障害 (図1-118)

ア 早期脳梗塞発症群：断酒後5~6週間後に発生し、1~2日にピークとなる。交感神経の興奮状態により頭暈、血圧上昇、食欲低下、尿意・嘔吐、易刺激性、不眠、狂戦、発汗、散瞳、視覚・聴覚性の錯覚、幻覚が生じる。症状はエタノール摂取で消失する。治療としてはジアゼパムやプロピロールなどの交感神経節遮断薬を使用する。

イ 経院性群：断酒後約3日以内に起こる全身性強直性間代性痙攣である。1日に1~2回起こり、約2%が重症を起こす。抗痙攣薬とともにWernicke脳症予防のためにチアミン100mgの静注、補液・電解質補正を行う。

ウ 振戦せん妄 (後期脳血管障害)：断酒後5日以内に発症する。症状は早期脳血管障害と同様であるがより重症である。3日以内に80%以上が治まる。治療も早期脳血管障害と同じであるが、十分な補液も必要である。現在でも死亡率が5%あるといわれている。

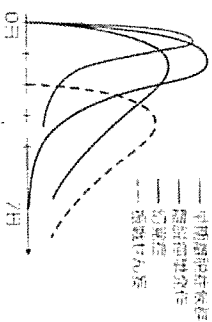


図1-118 アルコール離脱症状の時間経過

d 農薬中毒

パラコート・ジフワクトが原因の場合、初期には口唇、眼瞼、鼻道、胃のびらん・潰瘍、痔瘻、陰下障害、嘔吐をきたす。吐物は青緑色を示すのが特徴である。神経症状として手足のしびれ、痙攣、意識障害をきたし、シヨックに陥る。有機リン系殺虫剤では下痢、流涎、縮瞳、気道分泌物増加、呼吸困難などが出現する。重篤な場合、意識障害、全身痙攣、呼吸筋麻痺がみられる。

e 食中毒

ボツリヌス中毒の初発症状は嘔吐・下痢・腹痛などの食中毒症状で、その後、眼瞼下垂、外眼筋麻痺など重症筋無力症のような症状が出現し、急速に構音・嚥下障害、呼吸筋麻痺、全身の脱力、散瞳、対光反射消失を示す。ふく中筋の初発症状は口唇、舌、指先のしびれや発汗、異常興奮である。真後から初発症状までの時間が短いほど重症で、30~40分以内のときは血度以上の重症度に進展することが多い(表1-57)。毒きのご中毒の主な症状を表1-58に示した。

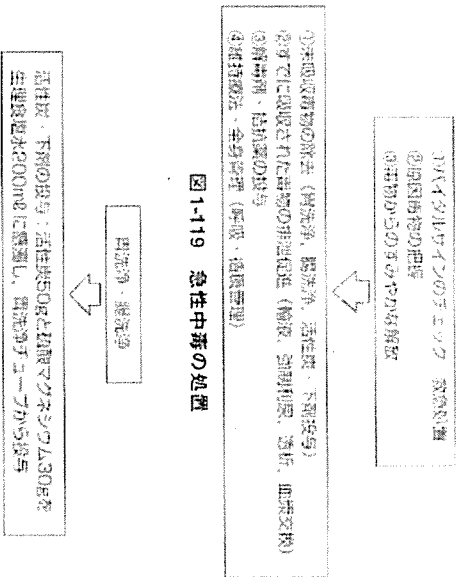


図1-120 未吸収薬物の除去

図1-119 急性中毒の処置

止するため挿管してから胃洗浄を行う。胃洗浄後、活性炭(約50g)を生理食塩水(約200ml)に懸濁し、胃洗浄チューブから投与する。活性炭は消化管内に残存する毒物を吸収する効果があるが、アルコールやシアン化合物には無効である。活性炭と同時に硫酸マグネシウムやソルビトールなどの下剤を投与する(図1-120)。

人量輸液と利尿薬によりすでに吸収された毒物の除去をはかる。電解質・水分のバランスを考慮しながら尿量10~12l/日を目標とする。致死量以上の毒物・薬物摂取や重症な症例には血液透析・吸着や血漿交換なども考慮する。

毒物・薬物に特異的な解毒薬や拮抗薬がある場合は、それを投与する(表1-62)。

b その他の治療とその特徴

1 急性アルコール中毒
程度から中等度では血液のみでよい。意識障害、持睡状態では呼吸管理、血液透析が必要になる。また電解質、アシドーシスの補正をする。

2 パラコート・ゾクワット
一般的な処置に加え、ショック・副腎不全・非水腫子肺のため、大剂量テロイド投与を行う。

3 有機リン系殺虫剤
抗コリン薬である硫酸アトロピンを投与する。また、アセチルコリンエステラーゼの再活性化のためゾリドキシムを前注する。

4 ポピリクス
胃洗浄・腸洗浄により残っている外毒素を排出する。純血量10000単位を前注する。その後再投与するまで毎日50000単位を前注する。また炭酸マグネシウム35~40mg/kgを1日6回経口投与する。必要に応じて呼吸管理を行う。

5 5-α-中毒

表1-62 毒物と解毒薬・拮抗薬

毒物	解毒薬・拮抗薬
一般化炭素	活性炭
重金属	シメチカチオン
有機リン	硫酸アトロピン、ゾリドキシム、ゾリクス
メチルアルコール	エタノール
エタノール	エタノール
シアン化カリウム	亜硝酸アトロピウム
アヘン	ナロキソン
硝酸塩	メチルソルビトール
アセトアミノフェン	アセチルシステイン

投後30~10分で初発症状がみられるときは、重篤化が予測されるので集中治療の可能な施設で治療を行う。投後60分以降に初発症状がみられる場合は血液ルーートを確保し経過観察する。重篤化した場合は人工呼吸管理を行う。かぶ毒は約8~9時間で排泄される。

6 毒さのこ中

消化器症状・精神症状に対する対症療法、利尿を行う。ときに血液透析が必要になる。アセチルコリン、カテカチンはムスカリン作用による症状なので、硫酸アトロピンが有効である。

7 重金属中毒

ヒ素中毒ではすみやかな胃・腸洗浄に加え、シメチカチオンの筋肉注射(キレート療法)、D-ペニシラミンの投与が行われる。鉛中毒にはCaEDTA点滴静注が有効である。

8 有機溶剤中毒

特異的な治療法はない。初期であれば呼吸器からの解放で自然に回復することが多い。

9 一酸化炭素(CO)

COの可及的排出のため高圧酸素療法を行う。また臓器障害に対する全身管理が必要である。代謝性アシドーシスの補正は、炭酸水素塩溶液を右方に移動させ末梢での酸素利用を低下させるため行わない。

10 毒カリウム

硫酸アトロピンの筋肉注射、ゾリドキシムの静注を行う。

(6) 経過・合併症、予後

a 薬物中毒

麻薬・覚醒剤の常習者はHIV、HBV、HCVのキャリアーの頻度が高いので感染に注意が必要である。キノホルム、うつ病に使用するリチウム、抗がん剤のメトトレキサートなどは非可逆性の後遺症を残すことがある。

b 急性アルコール中毒

意識障害をきたしているとき、外傷や脳血管障害、精神症状、低体温、低血糖、薬物中毒などの合併にも注意をする。重症になると死亡することがあるので、早期診断と治療が重要である。

c 慢性アルコール中毒

アルコールの摂取量、臨床症状、はかりの疾患との鑑別により診断する。

d 農薬中毒

1 パラコート・シタラクト
胃不全、尿不全、脱水症をきたす場合、尿量は不良である。
2 有機リン系殺虫剤
重篤なときは死に至る。嘔吐後1週間以上してから「脱神経や運動調節の出現」することがある。

e 食中毒

1 ボツリヌス毒
症状の回復には数週間から数ヶ月かかる。死亡率は10%以下である。

2 ぶどう中毒

嘔吐管理がうまく行えれば脱神経もなく回復することが多い。
3 毒きのこ中毒
神経損傷持続、シヨククに陥り、死に至ることもある。

f 重金属中毒

特記ことは毒性が強く亜ヒ酸100～300mgで死に至る。

g 有機溶剤中毒

トルエン（シンナー）の短時間の吸入で痛め昏倒、性格変化、小脳失調、非特異的脳波がみられ、さらに増加に至る。

h ガス中毒

i CO

急性期の意識障害から一旦回復しても、最末期には脱意、性格変化、意識減退、パーキンソン病様態などが出現することがある。火災が原因のときは脱臼や火傷のやけどにも注意する。頭部CTやMRIで深部核や白質病変が認められるものは予後不良である。

3 中脳ク

嗅覚とれた目が多い場合には死に至る。回復した場合でもめまい、頭痛などの症状が続くことがある。

(7) 患者指導、ケアのポイント

a 一般的注意

急性期には意識障害からできるだけ早期に開放し、バイタルサインをモニタリングする。意識障害が回復するときは病態を「脱」する方向に注意する。

b その他の注意点

1 薬物中毒

麻薬・覚醒剤、一部の抗がん剤は神経性あるいは依存性があるので、心理面のケアプログラムが必要である。特に覚醒剤・覚醒剤は患者の社会生活を脅かす必要がある。

2 アルコール中毒

個人差を容認しない強制戒断などで毎年死亡者がでていて、個人の適量を考慮することが重要である。アルコール症による失禁、家庭内暴力、社会への適応障害など、周囲・社会が積極的に心の援助的対応が求められる。

3 食中毒

ボツリヌス毒やぶどう中毒では適切な治療が提供であり、適切な対応は通常の対応と異なる。

例に、患者が不安をきたさないよう会話や選別にも気を付ける。

1 重金属中毒

急性中毒では早期に疑い、電位を行うのが肝要である。水溶性は有機水素が神経を通過して指先に集積し、神経障害を発生させた。亜鉛中毒は「初期に回復しないので、社会的セパレートのみならず精神的ケアも必要である。

2 有機溶剤中毒

急性中毒の場合、できるだけ早く呼吸器を吸える状態に移動し、皮膚には汚染した場合は大量の石鹸水で洗い、目は流水で十分洗浄する。

3 ガス中毒

CO中毒患者にできるだけ適切なよい酸素に移動させ、バイタルサインを確認後、直ちに高濃度の酸素吸入を行う。一室回復しても、後で脳神経症候群が起り得ることをあらかじめ説明する必要がある。

【参考文献】

1. 堀川雄二 (1982) フラオおよびフアフラ中毒の研究。日本神経科報。No.1494, No.1495

2 他の内科疾患にともなう神経障害

1) 内分泌疾患にともなう神経障害

A 糖尿病

高血糖によるポリニューロパチの活性化、酸化ストレス、非特異的アクリコシ化などにより、神経細胞や血管内皮細胞の障害が起ると考えられている。血管内皮細胞の障害は、糖尿病や末梢神経障害など糖尿病性障害を起しやすいため、神経系合併症の中では糖尿病性ニューロパチ（E-2）を参照。脳血管障害（E-2）参照）の頻度が高い。また糖尿病性神経障害（クアトアブラス、非ケトアシッド症候群）は、血糖低下薬の不適切投与にともなう低血糖による。高血糖、脱水、酸中毒、腎臓障害、意識障害が起ることがある。

B 甲状腺機能亢進症（バセドウ病）

甲状腺機能亢進症では甲状腺ホルモンの過剰分泌による、ミトハチー 筋痛、正位筋力低下、筋萎縮、初期甲状腺炎、アブス人見性にも多く、血清K値の低下ともない（バセドウ）、眼症（眼球突出、外眼筋痛、複視）、不随意運動（手指の細かな振動、振動、舞踏病様運動）、精神症状（興奮、焦燥感、せん妄）などを起す。また、亜急性甲状腺炎の合併も頻りに見られる。甲状腺では中甲状腺ホルモンの上昇、奇明なクアトアブラス病がみられるが、血清CK値は正常である。治療は甲状腺薬による甲状腺機能の正常化、眼症ではステロイド投与や放射線療法が有効である。

C 甲状腺機能低下症（粘液性腫）

多くは慢性甲状腺炎の終末期にみられるが、精神症状、うつ状態、前向き運動減少、認知障害、意識障害、痲痺、ミトハチー、多量ニューロパチー、手指振動、小脳失調などをきたす。舌腫大による嚥下障害、アキレス腱反射の遅延の遅れもみられる。検査では血清甲状腺ホルモンの低下、血清コレステロール、CK値の増加がみられる。治療は甲状腺ホルモンの補充を行う。

Underediting of GluR2 mRNA, a neuronal death inducing molecular change in sporadic ALS, does not occur in motor neurons in ALS1 or SBMA

Yukio Kawahara^{a,1}, Hui Sun^a, Kyoko Ito^a, Takuto Hideyama^a,
Masashi Aoki^b, Gen Sobue^c, Shoji Tsuji^a, Shin Kwak^{a,*}

^a Department of Neurology, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo,
7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan

^b Department of Neurology, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, Japan

^c Department of Neurology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan

Received 7 July 2005; accepted 13 September 2005

Available online 12 October 2005

Abstract

Deficient RNA editing of the AMPA receptor subunit GluR2 at the Q/R site is a primary cause of neuronal death and recently has been reported to be a tightly linked etiological cause of motor neuron death in sporadic amyotrophic lateral sclerosis (ALS). We quantified the RNA editing efficiency of the GluR2 Q/R site in single motor neurons of rats transgenic for mutant human Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD1) as well as patients with spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA), and found that GluR2 mRNA was completely edited in all the motor neurons examined. It seems likely that the death cascade is different among the dying motor neurons in sporadic ALS, familial ALS with mutant SOD1 and SBMA. © 2005 Elsevier Ireland Ltd and the Japan Neuroscience Society. All rights reserved.

Keywords: ALS; SOD1; Spinal and bulbar muscular atrophy; Motor neuron; RNA editing; GluR2; AMPA receptor; Neuronal death

1. Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a progressive neurodegenerative disease with selective loss of both upper and lower motor neurons, and familial cases are rare. The etiology of sporadic ALS remains elusive but recently deficient RNA editing of AMPA receptor subunit GluR2 at the Q/R site is reported in motor neurons in ALS that occurs in a disease-specific and motor neuron-selective manner (Kawahara et al., 2004; Kwak and Kawahara, 2005). Moreover, underediting of the GluR2 Q/R site greatly increases the Ca²⁺ permeability of AMPA receptors (Hume et al., 1991; Verdoorn et al., 1991; Burnashev et al., 1992), which may cause neuronal death due to increased Ca²⁺ influx through the receptor channel, hence mice with RNA editing deficiencies at the GluR2 Q/R site die young (Brusa et al., 1995) and mice transgenic for an artificial Ca²⁺-

permeable GluR2 develop motor neuron disease 12 months after birth (Kuner et al., 2005). Such evidence lends strong support to the close relevance of deficient RNA editing of the GluR2 at the Q/R site to death of motor neurons in sporadic ALS. However, although we and other researchers have demonstrated that dying neurons in several neurodegenerative diseases exhibit edited GluR2 (Kwak and Kawahara, 2005), it has not yet been demonstrated whether the underediting of GluR2 occurs in dying motor neurons in motor neuron diseases other than ALS. Such investigation is of particular importance since it will help clarify whether the molecular mechanism of motor neurons death is common among various subtypes of motor neurons.

ALS associated with the SOD1 mutation (ALS1) is the most frequent familial ALS (Rosen et al., 1993), and mutated human SOD1 transgenic animals have been studied extensively as a disease model of ALS1, yet the etiology of neuronal death in the animals has not been elucidated. Another example of non-ALS motor neuron disease is spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA), which predominantly affects lower motor neurons with a relatively slow clinical course. Since the CAG

* Corresponding author. Tel.: +81 3 5800 8672; fax: +81 3 5800 6548.

E-mail address: kwak-tyk@umin.ac.jp (S. Kwak).

¹ Present address: The Wistar Institute, Philadelphia, PA, USA.

Table 1
RNA editing efficiency of single motor neurons in SBMA

Case	Age at death (year)	Sex	No. of CAG repeats ^a	Postmortem delay (h)	GluR2(+) MN ^b	MN with 100% editing efficiency (% of GluR2(+) MN)
SBMA, case 1	71	M	48	2.5	12	12 (100)
SBMA, case 2	78	M	42	2.5	16	16 (100)
SBMA, case 3	60	M	44	1	16	16 (100)

^a Number of CAG repeats in the androgen receptor gene.

^b Motor neurons in which GluR2 RT-PCR amplifying product was detected.

repeat expansion in the androgen receptor gene has been demonstrated in SBMA (La Spada et al., 1991), and pharmacological castration is therapeutically effective in animal models (Katsuno et al., 2002, 2003), the death cascade responsible for SBMA is likely different from sporadic ALS. In this paper, an investigation is carried out into whether or not the dying mechanism underlying sporadic ALS is the same as ALS1 and SBMA by determining the editing status of the GluR2 Q/R site in single motor neurons.

2. Materials and methods

The animals used in this study were SOD1^{G93A} and SOD1^{H46R} transgenic male rats (Nagai et al., 2001) ($n = 3$ each) that had exhibited progressive neuromuscular weakness with their littermates as the control ($n = 3$ each) (Table 2). The first sign of disease in these rats was weakness of their hindlimbs, mostly exhibited by the dragging of one limb. Onset of motor neuron disease was scored as the first observation of abnormal gait or evidence of limb weakness. The mean age of onset of clinical weakness for the SOD1^{G93A} and SOD1^{H46R} lines was 122.9 ± 14.1 and 144.7 ± 6.4 days, respectively. As the disease progressed, the rats exhibited marked muscle wasting in their hindlimbs, and then in the forelimbs. The mean duration after the clinical expression of the disease in the SOD1^{G93A} and SOD1^{H46R} lines was 8.3 ± 0.7 and 24.2 ± 2.9 days, respectively (Nagai et al., 2001). The rats were killed 3 days and 2 weeks after the onset for the SOD1^{G93A} and SOD1^{H46R} lines, respectively, and we examined their fifth lumbar cord. Animals were handled according to Institutional Animal Care and Use Committee approved protocols that are in line with the Guideline for Animal Care and Use by the National Institute of Health. Spinal cords were isolated after deep pentobarbiturate anesthesia. In addition, spinal cords were obtained at autopsy from three genetically confirmed patients with SBMA (Table 1). Written informed consent was obtained from all subjects prior to death or from their relatives, and the Ethics Committees of Graduate School of Medicine, the University of Nagoya and the University of Tokyo approved the experimental procedures used. Spinal cords were rapidly frozen on dry ice and maintained at -80°C until use.

Table 2
RNA editing efficiency of single motor neurons in mutated human SOD1 transgenic rats

Case (n)	GluR2(+) MN ^a	MN with 100% editing efficiency (% of GluR2(+) MN)
SOD1 ^{G93A} -1	13	13 (100)
SOD1 ^{G93A} -2	21	21 (100)
SOD1 ^{G93A} -3	21	21 (100)
SOD1 ^{H46R} -1	19	19 (100)
SOD1 ^{H46R} -2	23	23 (100)
SOD1 ^{H46R} -3	20	20 (100)
SOD1 ^{G93A} , littermates (3)	22	22 (100)
SOD1 ^{H46R} , littermates (3)	20	20 (100)

^a Motor neurons in which GluR2 RT-PCR amplifying product was detected.

Single motor neurons were isolated and collected into respective single test tubes that contained 200 μl of TRIZOL Reagent (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) using a laser microdissection system as previously described (Kawahara et al., 2003b, 2004) (LMD, Leica Microsystems Ltd., Germany) (Fig. 1a). After extracting total RNA from single neuron tissue, we analyzed the RNA editing efficiency at the GluR2 Q/R site by means of RT-PCR coupled with digestion of the PCR amplified products with a restriction enzyme Bbv-1 (New England BioLabs, Beverly, MA, USA) (Takuma et al., 1999; Kawahara et al., 2003a, 2004), and the editing efficiency was calculated by quantitatively analyzing the digests with a 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), as previously described (Kawahara et al., 2003a). Briefly, after gel purification using Zymoclean Gel DNA Recovery Kit according to the manufacturer's protocol (Zymo Research, Orange, CA, USA), PCR products were quantified using a 2100 Bioanalyser. An aliquot (0.5 μg) was then incubated at 37°C for 12 h with $10 \times$ restriction buffer and 2 U of Bbv-1 in a total volume of 20 μl and inactivated at 65°C for 30 min. The PCR products had one intrinsic Bbv-1 recognition sites, whereas the products originating from unedited GluR2 mRNA had an additional recognition site. Thus, restriction digestion of the PCR products originating from edited rat (278 bp) and human (182 bp) GluR2 mRNA should produce two bands (human GluR2 in parenthesis) at 219 (116) and 59 (66) bp, whereas those originating from unedited GluR2 mRNA should produce three bands at 140 (81), 79 (35), and 59 (66) bp. As the 59 (66) bp band would originate from both edited and unedited mRNA, but the 219 (116) bp band would originate from only edited mRNA, we quantified the molarity of the 219 (116) and 59 (66) bp bands using the 2100 Bioanalyser and calculated the editing efficiency as the ratio of the former to the latter for each sample.

The following primers were used for PCR for rat and human GluR2 (amplified product lengths are also indicated): for rat GluR2 (278 bp): rF (5'-AGCAGATTTAGCCCCCTACGAG-3') and rR (5'-CAGCACTTTCGATGGGAGACAC-3'); for human GluR2, the first PCR (187 bp): hG2F1 (5'-TCTGGTTTTCTTGGGTGCC-3') and hG2R1 (5'-AGATCCTCAGCACTTTCG-3'); for the nested PCR (182 bp): hG2F2 (5'-GGTTTTCTTGGTGCCCTTAT-3') and hG2R2 (5'-ATCCTCAGCACTTTCGATGG-3'). We confirmed that these primer pairs were situated in two distinct exons with an intron between them and did not amplify products originating from other GluR subunits (data not shown). PCR amplification for rat GluR2 was initiated with a denaturation step that was carried out at 95°C for 2 min, followed by 40 cycles of 95°C for 30 s, 62°C for 30 s, and 72°C for 1 min. PCR amplification for human GluR2 began with a 1 min denaturation step at 95°C , followed by 35 cycles of denaturation at 95°C for 10 s, annealing at 64°C for 30 s and extension at 68°C for 60 s. Nested PCR was conducted on 2 μl of the first PCR product under the same conditions with the exception of the annealing temperature (66°C).

3. Results

The number of motor neurons was severely decreased in the spinal cord of SBMA patients, and we analyzed 44 neurons dissected from three cases (12 from case 1, 16 from cases 2 and 3). Restriction digestion of the PCR products yielded only 116 and 66 bp fragments but no 81 or 35 bp fragments as seen in ALS motor neurons in all the SBMA motor neurons examined. Likewise, restriction digestion of the PCR products from motor