

200834005A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

新規抗パーキンソン病薬ゾニサミドの 神経保護作用に関する臨床研究班

平成20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 村田 美穂
国立精神・神経センター病院神経内科

平成21(2009)年 3月

目 次

I.	主任総括研究報告		
	新規抗パーキンソン病薬ゾニサミドの神経保護作用に関する臨床研究班		
	国立精神・神経センター病院神経内科	村田 美穂	1
II.	分担研究報告		
	実験的パーキンソン病振戦モデルに対するゾニサミドの効果		
	和歌山県立医科大学神経内科	近藤 智善	7
	パーキンソン病治療におけるゾニサミドの長期効果—9年間までの follow up		
	国立精神・神経センター病院 神経内科	村田 美穂	9
	パーキンソン病の遺伝子多型と発症リスクおよびゾニサミドの薬剤効果の研究		
	大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝学	戸田 達史	12
	喘息患者における restless legs syndrome についての検討		
	国立病院機構相模原病院神経内科	堀内 恵美子	13
	ゾニサミドの神経保護作用の可能性について		
	—コモンマーマセット黒質神経細胞の免疫組織学的検討—		
	愛媛大学大学院病態治療内科	チャウドリー・ムハメド	17
	ゾニサミドの神経保護作用—遺伝子改変パーキンソン病モデルマウスによる検討—		
	生理学研究所・生体システム研究部門	南部 篤	20
	Zonisamide の神経細胞保護機構についての検討		
	順天堂大学医学部脳神経内科	服部信孝	22
	ゾニサミドのアストログリアの増殖促進作用の発現機序ならびにパーキンソン病モデルにおけるドパミン神経保護効果		
	岡山大学大学院医歯薬学総合研究所脳神経制御講座神経情報学	浅沼幹人	23
III.	開催会議		31
IV.	班構成員名簿		33
V.	研究成果の発刊に関する一覧		35

新規抗パーキンソン病薬ゾニサミドの神経保護作用に関する臨床研究班

主任研究者 村田 美穂 国立精神・神経センター病院神経内科

研究要旨:ゾニサミドの神経保護作用の確認とその作用機序の解明を多面的に進めた。今年度は、①これまでにZNSが強力なキノン体生成抑制、グルタチオン増加作用により神経保護作用をin vivo, in vitroで示し、このグルタチオン増加作用は非活性型アストログリアの増殖及びアストログリアでのシスチン取り込み増加作用によることを明らかにしてきたことを受けて、ZNSがS100 β 分泌を介して非活性型アストログリアの増殖作用を示すことを明らかにした。さらに6OHDAによる障害の進行を6OHDA投与後3週及び4週と比較し、これに対するZNSの作用をみることにより、実際に進行しているドパミン細胞脱落をZNSが保護することを示した。②ZNSはPIP3/Akt系を活性化し、FKHRL1の活性化を介し著明なMnSOD発現増加作用をもつことを明らかにしてきたが、この作用がZNSの濃度及び時間に依存すること、またZNSはcaspase 3, 9の発現抑制を介してstaurosporineにより誘発されるapoptosisを強く抑制することを示した。これらの結果はZNSが複数の作用点に強力に作用して神経保護効果を発揮することを示し、同時にZNSがPDのみならず多くの神経変性疾患に対し、神経保護効果を期待できることを示唆している。さらに③転写因子Engrailedの変異マウス(パーキンソン自然発症モデル)を用いてZNSがドパミン神経脱落進行を強く抑制すること、④ZNSがMPTPコモンマセットの黒質細胞脱落を抑制すること、⑤振戦モデルにおけるZNSの効果を示し、同時に脳内各部位のc-fos発現を検索し、ZNSが大脳皮質及び基底核の神経活動を抑制的に制御することを明らかにした。⑥9年間までのZNSの抗パーキンソン作用の経過を検討し、ZNSが長期的な効果を得られること、ZNS非投与の進行期患者に比較すると比較的良好的経過をとる傾向にあり、進行を遅らせている(神経保護作用)可能性を示した。⑦SNP chipを用いて、疾患感受性遺伝子を明らかにするとともにZNSの効果を決定する因子となる遺伝子多型の同定を進め、候補遺伝子を得た。⑧ZNSのrestless leg syndrome(RLS)に対する効果を示し、RLSの有病率の検索を進めた。

分担研究者

浅沼幹人 岡山大学大学院・准教授
近藤智善 和歌山県立医大・教授
戸田達史 大阪大学大学院・教授

南部 篤 生理学研究所・教授
野元正弘 愛媛大学医学部・教授
長谷川一子 NHO 相模原病院・医長
服部信孝 順天堂大学医学部・教授

A. 研究目的

主任研究者が抗パーキンソン病(PD)作用を発見したゾニサミド(ZNS)について、これまでに我々は抗PD効果の確認とその作用機序を解明を続けてきた。さらにZNSがin vitro, in vivoで神経保護作用をもつことを見出し、この作用機序を明らかにし、臨床的に意味のある神経保護作用であることを示すために研究を進めた。具体的には、1)ZNSがL-dopaによるキノン体生成増加を強力に抑制すること、脳

内グルタチオン(GSH)を著明に増加させること、さらにPDモデルで障害側黒質線条体系のドパミン神経の脱落を有意に抑制すること、さらにZNSがアストログリア増殖を促進し、また、アストログリア上のシスチン/グルタミン酸トランスポーター(xCT)の発現誘導を引き起こし、アストログリアでのシスチン取り込みを増加させることにより、神経細胞でのGSH量を増加させることを明らかにしたことから、ZNSのアストログリア増殖のメカニズムを明らかにする。

また、進行中のドパミン変性を抑制する作用について確認する。2) ZNS の apoptosis 抑制作用を示し、PIP3/Akt 系を介する神経保護作用のメカニズムを明らかにする。3) MPTP マーモセットにおける ZNS の黒質ドパミン神経の保護作用を明らかにする。4) PD 自然発症マウスを用いて in vivo での ZNS の神経保護作用を明らかにする。5) 9年間までの ZNS の長期効果を明らかにする。6) 500K SNP chip を用いて、ZNS の効果判定 SNP を明らかにする。7) 実験的パーキンソン病振戦モデルに対する ZNS の効果を明らかにする。8) ZNS の適応拡大の一つとしての Restless Leg Syndrome (RLS) への効果を評価するために、RLS の有病率を明らかにする、などを目的に多面的に研究を進めた。

(倫理面の配慮)

それぞれの研究は各施設の倫理委員会および、動物実験倫理委員会、組み換え DNA 実験安全委員会での承認のもと、該当指針に基づいて施行された。

1) グルタミン酸増加作用を介する神経保護作用(in vivo & in vitro)(浅沼)

B.方法

昨年までに ZNS のグルタミン酸合成増加作用について、アストログリアの増殖促進作用と xCT 発現誘導作用を明らかにしたことから、ZNS のアストログリア増殖作用の機序を明らかにするために、

① ZNS の培養アストログリアの増殖及びグルタミン酸量への作用

ラット由来アストログリア C6 細胞及び、ラット退治由来線条体初代培養アストログリアを用い、継代 24 時間後に ZNS(1-100 μ M)を添加し、24 時間後に、グルタミン酸量の定量と、総アストログリア数の Hoechst 染色にて評価した。

② 片側パーキンソン病の出るマウスでのドパミン神経障害に対する ZNS 連日投与の保護効果

正常雄性 ICR マウスの片側線条体に 6OHDA を投与し3週後に1群は還流固定、残り群の2群は L-dopa/carbidopa(50/5 mg/kg, i.p.)または ZNSNa (30mg/kg, i.p.)7 日間投与後に還流固定後凍結脳切片を作成し、チロシン水酸化酵素 (TH)、ドパミントランスポーター

(DAT)及び総アストログリアの指標である S100 β の免疫染色を行った。

6OHDA 投与3週後のサンプルと4週後(ZNS(+))または(-)のサンプルとを比較することで PD モデルでのドパミン神経障害に対する ZNS の保護効果について、組織学的に検討した。

C.結果

① 培養アストログリアの増殖及びグルタミン酸への ZNS の作用

ZNS(100 μ M)により、C6 細胞、初代培養アストロサイトとも細胞増殖を伴う GSH 量の増加を認め、この増殖効果は抗 S100 β 抗体の添加により抑制された。

② 片側パーキンソン病の出るマウスでのドパミン神経障害に対する ZNS 連日投与の保護効果

マウスに ZNSNa(30mg/kg, i.p.)を連日投与により、線条体内の S100 β 陽性アストログリアの増殖を認めた。

6OHDA 注入後3週後には障害側黒質緻密層の TH 陽性のドパミン神経細胞の著明な脱落ならびに障害側線条体の TH, DAT 陽性シグナルの著明な減少が認められ、4 週後においても維持され、あるいはむしろ増悪していたが、これらの黒質線条体系のドパミン神経の脱落は 6-OHDA 注入 3 週後からの ZNSNa (30 mg/kg, i.p.) 1 週間連日投与により抑制された。

D. 考察

ZNS の持続添加によりアストログリア C6 細胞及び線条体初代培養アストログリアにおいて細胞増殖を伴った GSH 量の増加が認められた。さらに、ZNS による C6 細胞の増殖効果は、抗 S100 β 抗体の添加により抑制された。S100 β 蛋白は主にアストログリアから分泌され、autocrine 的にアストログリアの増殖を促進させることが知られている。

これらの研究結果から、ZNS が、アストログリアからの S100 β 蛋白分泌を介して非活性型アストログリアの増殖を促進し、あるいは活性型アストログリア上の xCT の発現誘導を引き起こすことによって、アストログリアでのグルタミン酸合成の基質になるシステインの取り込みを増加させ、結果的に神経細胞での GSH 量を

増加させるというメカニズムを明らかにできた。

一昨年度、片側 PD モデルへの ZNS 連日投与により、黒質線条体系のドパミン神経の脱落を有意に抑制できることを明らかにした。ZNS 投与は 6-OHDA 注入 3 週間後から開始していることから、ZNS は 6-OHDA 自体の急性期のキノン化、ラジカル生成を抑制しているのではなく、むしろミトコンドリア呼吸鎖障害などにより惹起される持続性の酸化ストレスに対して保護効果を発揮していると考えられた。しかし、6-OHDA 注入 PD モデルでは 1-2 ヶ月後にドパミン神経障害は快復する。そこで、ZNS 連日投与の神経保護効果を再確認するために、今回 ZNS 投与前後の障害の程度を比較した。6-OHDA 注入 3 週間後の黒質ならびに線条体系のドパミン神経細胞の著明な脱落と障害は、4 週間においても維持されおり、あるいはむしろ増悪しており、少なくとも 3-4 週間後に快復傾向は認められなかった。そして、これらの黒質線条体系のドパミン神経の障害は 6-OHDA 注入 3 週間からの ZNS の 1 週間連日投与により抑制されることを確認できた。この ZNS のドパミン神経保護効果に GSH 増加作用が関与していることも考えられる。

今後、ZNS のアストログリアの増殖作用と GSH 合成に関わるアミノ酸取り込みの神経・アストログリア連関の修飾能に着目して、アストログリアからの S100 β 蛋白の分泌を促進させる因子、xCT の発現増加にかかわる因子に対する ZNS の作用の有無について検討を行う。また、これらにはたらく薬剤を明らかにすることで、さらに新たなパーキンソン病治療薬、方策の開発を期待できる。

2) DA, MPP+ による神経細胞毒性に対する ZNS の神経保護作用 (in vitro) (服部)

B. 方法

昨年までに ZNS が PI3K/Akt 系を介して MnSOD の発現を著明に増加させることを示した。今年度は MnSOD 発現増加に対する ZNS の容量依存性、時間依存性について検討した。さらに staurosporine を用いて apoptosis を誘導し、これに対する ZNS の作用を検討した。

SH-SY5Y 細胞をレチノイン酸により分化誘導後、ZNS 50-200 μ M、添加時間 12-48 時間により MnSOD の発現について検討した。また、staurosporine 添加後 TUNEL 法にて、細胞生

存能を判定した。さらに、western blot 法にて ZNS 添加後の caspase 3,9 の変化を検討した。

C. 結果

ZNS は MnSOD の発現を容量依存的及び時間依存的に増加させた。また、ZNS は staurosporine による apoptosis に対し、細胞保護的に作用し、同時に caspase 3,9 の発現を低下させた。

なお、ZNS の活性化される Akt は autophagy にも関与するが、ZNS は autophagy には関与していなかった。

D. 考察

ZNS は PIP3/Akt 経路を活性化し、さらにその下流の転写因子である FKHL1 のリン酸化修飾を促進した。FKHL1 は酸化ストレスに対する survival factor として注目されており、MnSOD の転写を促進することが知られている。実際、今回、我々は ZNS が容量依存的及び時間依存的に MnSOD の発現を著明に増加させることを明らかにした。また、staurosporine による apoptosis 誘発に対しても caspase 3,9 の発現を低下させ、細胞死を抑制することを明らかにした。以上の結果は ZNS が、PTEN, PIP3/Akt, FKHL1, MnSOD の一連の系を強く活性化することを示し、これが DA, MPP+ の神経毒性からの神経保護作用の作用機序であることを明らかにした。これは ZNS が PD のみならず他の神経変性疾患に対する神経保護薬としても有望であることを示唆している。

3) ZNS の MPTP コモンマーモセット黒質細胞に対する保護効果 (in vivo) (野元)

B. 方法

コモンマーモセットに ZNS(40mg/kg)の前投与を伴う MPTP 投与を 3 日間施行し、2 週間後に TH 抗体を用い、中脳黒質ドパミン細胞の変化を検索した。

C. 結果

黒質ドパミン細胞数は MPTP 投与により正常の 12.6%まで減少していたが、ZNS 投与群は 25.2%、セレギリン群は 47.1%、黒質 Th 陽性細胞面積は MPTP 投与で正常の 37.3%であったが、ZNS 投与群は 64.3%、セレギリン 75.2%であった。

D. 考察

ZNS はセレギリンよりは弱い MPTP による黒質ドパミン神経細胞障害を抑制した。

4) パーキンソン病自然発症モデルマウスでの ZNS の神経保護効果の検討 (南部)

B. 方法

転写因子 Engrailed-1 (En1) と Engrailed-2 (En2) のダブルミュータントマウス En1(+/-), En2(-/-) は出生時は正常であるが、生後3ヶ月ごろまで DA ニューロンの減少が続き、パーキンソン病自然発症モデルと考えられている (Sgado, et al. 2006)。本モデルマウスに、生後3週後より2ヶ月間毎日、ZNS (2, 20, 100 mg/kg, i.p.) 投与を行い、中脳ドパミン神経細胞および線条体ドパミン神経終末について評価した。

C. 結果

En1(+/-), En2(-/-) で、中脳ドパミン作動性ニューロンの減少を確認した。行動変化は生後8ヶ月後以降出現するため、今回はまだ評価できなかった。ZNS により中脳ドパミンニューロンおよび線条体のドパミン陽性線維の減少は明らかに抑制され、特に線条体では野生型に近いレベルまで抑制された。

D. 考察

疾患モデルマウスで高い ZNS の神経保護作用を示した。今後、この作用機序を明らかにしていく予定である。

5) 実験的パーキンソン病振戦モデルに対する ZNS の効果 (近藤)

B. 方法

パーキンソン病振戦のモデルである、タクリン誘発振戦 (TJMs) での ZNS の効果の作用機序を明らかにするために、ZNS (5, 50 mg/kg) または生食を腹腔内投与後タクリン 5 mg/kg を全身投与し、TJMs の計測及び還流固定後、大脳、脳幹各部位の c-Fos 蛋白発現を免疫染色にて解析した。

C. 結果

TJMs は ZNS の用量依存的に抑制された。

大脳皮質、背側線条体及び側坐核ではタクリン誘発により c-Fos 発現が増加したが、これらも ZNS の用量依存的に抑制された。

D. 考察

すでに ZNS による TJMs 抑制作用はモノアミン枯渇剤及び D2 遮断薬投与により影響を受けないことから、ドパミン系を介さない作用であることを示している。今回の結果から、ZNS による振戦抑制は大脳皮質-基底核系の神経細胞興奮を低下させた結果である可能性が示された。

6) 9 年間までのパーキンソン病における ZNS の長期効果 (村田)

B. 方法

ZNS を投与して 5-9 年間経過観察したパーキンソン病患者 8 例の臨床症状、抗パーキンソン病薬投与の経過について評価し、発症年齢、罹患期間が同等の ZNS 非投与群 (11 例) と比較した。

C. 結果

進行期 PD では ZNS 投与により約 3 年間は投与直後の効果を維持し、4 年目以降薬剤の増量が必要な症例が多かったが、on 時の Yahr 重症度が投与前より悪化したのは 1 例のみであった。ZNS 開始 4 年目以降でも ZNS の中止により症状悪化、あるいは増量効果を認めた。発症早期に ZNS の投与を開始した 2 例では発症 9-10 年目も良好な状態を維持できていた。経過中、重大な副作用は認めなかった。

D. 考察

進行期 ZNS 開始例においては発症後 10-15 年、早期開始例については 5-10 年の症状が ZNS 非併用例に比較して安定して良好な経過をとる傾向があり、ZNS の神経保護作用を示唆している可能性がある。しかし、対照群にも少数ながら良好な経過をとる症例もあり、神経保護効果を評価するには多数例の集積が必要である。

7) パーキンソン病の遺伝子多型と発症リスク及び ZNS の薬剤効果 (戸田)

B. 方法

① 500K SNIP chip を用いた全ゲノム関連解

析によるパーキンソン病の疾患感受性遺伝子及びZNSの薬効に関連するSNP検索

イルミナ Hap550 アレイを用い、Genome Wide Association Study(GWAS)を行った。PD患者 1000 検体、理研コントロール 2500 検体の SNP 型を判定し、疾患対象関連解析を行い、さらに関連を認めた上位 384SNP について別の患者約 900 検体とコントロール約 4000 検体を用いて replication 実験を行った。また、このうち 110 人は ZNS 投与例で、関連解析データ処理により、効果判定マーカーとなる多型を同定した。

②ゴーシェ病の原因遺伝子 GBA 遺伝子変異とPD発症の関連解析

PD患者 534 人対照 544 人の GBA 遺伝子の塩基配列変化の有無を調べ、変異の保有率を両群で比較した。

C. 結果、考察

① 500K SNIP chip を用いた全ゲノム関連解析によるパーキンソン病の疾患感受性遺伝子及びZNSの薬効に関連するSNP検索

最も高い関連を見たのは α -synuclein 領域の SNP($P=6.2 \times 10^{-13}$ (trend model))であった。replication 実験でも α -synuclein 領域は $P=3.5 \times 10^{-16}$ を示したが、それ以外にも有意に関連した領域を得た。

ゾニサミドの薬効に関連するSNPとして、 $P=10^{-5}$ 以下を示すSNPが22個あり、CYP20A1はCアレルをもつと無効例が多いなど、明らかに偏りがあった。

②ゴーシェ病の原因遺伝子 GBA 遺伝子変異とPD発症の関連解析

PDとGBA変異は強く関連していた($p=6.9 \times 10^{-14}$, オッズ比28.0)。GBA変異をもつPD患者の発症年齢(52.5 ± 7.4)は変異を持たないPD患者の発症年齢(58.8 ± 10.7)よりも有意に低かった($p < 0.001$)。

8) 気管支喘息における Restless Leg Syndrome(RLS)の頻度(長谷川)

B. 方法

これまでにZNSがRLSに効果があることを明らかにしたことから、RLSの疫学調査を進めている。今回は気管支喘息における有病率について検討した。

国立病院機構相模原病院に通院中で同意を得られた気管支喘息患者200名に年齢、性

別、喘息発作の罹病期、RLS(International RLS Study Group 1995による)の有無、症状の発現時間帯、重症度、喘息発作とRLSとの関連について調査した。

C. 結果

Probable RLSの有病率は22%(男性16.7%、女性8.7%)、現在も症状があるのは12%であった。また、definite RLSは10%で、明らかな男女比は認めなかった。また、RLSと使用薬剤、喘息発作にはいずれも明らかな関連は認めなかった。

D. 考察

RLSの頻度はコーカソイドでは5-10%とされるが、わが国では65歳以上の健常人で1.06%(男性0.48%、女性1.16%)とされている(Mizuno S, et al.2005)。気管支喘息でのRLSの有病率は知られていなかったが、かなり高いことが明らかになった。

E. 結論

今年度は、①これまでに示したZNSが強力なキノン体生成抑制、グルタチオン増加作用により神経保護作用をin vivo, in vitroで示し、このグルタチオン増加作用は非活性型アストログリアの増殖及びアストログリアでのシステイン取り込み増加作用によることを受けて、ZNSがS100 β 分泌を介して非活性型アストログリアの増殖作用を示すことを明らかにした。さらに6OHDAによるパーキンソンモデルを用いて実際に進行しているドパミン細胞脱落をZNSが保護することを示した。②ZNSはPI3/Akt系を活性化し、FKHRL1の活性化を介し著明なMnSOD発現増加作用をもつことを明らかにしてきたが、この作用がZNSの濃度及び時間に依存すること、またZNSはcaspase 3, 9の発現抑制を介してstaurosporineにより誘発されるapoptosisを強く抑制することを示した。これらの結果はZNSが複数の作用点に強力に作用して神経保護効果を発揮することを示し、同時にZNSがPDのみならず多くの神経変性疾患に対し、神経保護効果を期待できることを示唆している。さらに③転写因子Engrailedの変異マウス(パーキンソン自然発症モデル)を用いてZNSがドパミン神経脱落進行を強く抑制すること、④ZNSがMPTPコモンマウスモデルの黒質細胞脱落を抑制すること、⑤振戦モデル

における ZNS の効果を示し、同時に脳内各部位の c-fos 発現を検索し、ZNS が大脳皮質及び基底核の神経活動を抑制的に制御することを明らかにした。⑥9年間までのZNSの抗パーキンソン作用の経過を検討し、ZNS が長期的な効果を得られること、ZNS 非投与の進行期患者に比較すると比較的良好な経過をとる傾向にあり、進行を遅らせている(神経保護作用)可能性を示した。⑦SNP chip を用いて、疾患感受性遺伝子を明らかにするとともに ZNS の効果を決定する因子となる遺伝子多型の同定を進め、候補遺伝子を得た。⑧ZNS の Restless Leg Syndrome (RLS)に対する効果を示し、気管支喘息における RLS の有病率を明

らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表
別紙記載
2. 学会発表
別紙記載

G. 知的所有権取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

II. 分担報告書

実験的パーキンソン病振戦モデルに対するZonisamideの効果

(分担) 研究者 近藤智善

研究協力者 三輪英人、久保友美、梶本賀正、浜 喜和
和歌山県立医科大学神経内科

研究要旨

Zonisamide (ZNS)の抗振戦作用の機序を明らかにするために、パーキンソン病振戦の薬理学的モデルと提唱されている「タクリンにより誘発される振戦様運動」に対するZNSの抑制効果を、神経細胞興奮のマーカーである転写因子c-Fos発現を解析することによって検討した。タクリン投与により脳内各部位においてc-Fos発現は顕著に増加し、ZNS投与により、大脳皮質、線条体および側坐核においてc-Fos発現が用量依存的に抑制された。ZNSは大脳皮質や基底核における神経活動を抑制的に制御していることが示唆され、これが抗振戦作用と関連する可能性が推定された。

A. 研究目的

新規抗パーキンソン病薬であるZonisamide (ZNS)の作用機序は十分に解明されていない。抗コリンエステラーゼ阻害剤・タクリンの全身投与によって誘発されるげっ歯類の特徴的な振戦様運動(tremulous jaw movements: TJMs)が、パーキンソン病振戦の薬理学的モデルとして提唱されている。われわれは、これまでの研究から、TJMsがZNSによって抑制されること、またその効果はレセルピン処置(モノアミン枯渇)やD2受容体遮断薬投与によって影響されないことから、ZNSの抗TJM作用がドパミン系以外の系を介した作用である可能性を提唱している。本研究では、神経細胞興奮のマーカーである転写因子c-Fos蛋白の発現を指標に、ZNSの抗TJMs作用の機序解明を試みた。

B. 研究方法

対象として雄SDラット(N=36)を用いた。ZNS(50, 5 mg/kg)または対照溶媒(生理的食塩水)を腹腔内投与後、タクリン5mg/kgを全身性に投与しTJMsを惹起した。単位時間(5分間)に出現したTJMsを、処置内容に関知しない2名の評価者が定量した。TJMsの定量終了後、c-Fos発現が最も顕著になる2時間後にパラフォルムアルデヒドを用いて灌流固定を行い、摘出脳の凍結切片を作成、c-Fos蛋白を免疫組織学的に検出・視覚化した。大脳皮質、大脳基底核、視床、脳幹におけるc-Fos発現を定量し、統計解析を行った。

(倫理面の配慮)

本研究は和歌山県立医科大学動物実験倫理委員会の承認のもと、処置、犠牲、などに際しては厳密に同委員会の規約にしたがった。

C. 研究結果

ZNSの投与によって、タクリン誘発TJMsは用量依存的に抑制された。タクリン投与後、大脳皮

質、線条体においてc-Fos発現の顕著な増加が認められた。ZNS投与により、大脳皮質、背側線条体および側坐核(腹側線条体)におけるタクリン誘発c-Fos増加は、用量依存的に抑制された。

D. 考察

タクリン誘発TJMsは、これまでの研究報告から大脳基底核起源の振戦と考えられている。また、L-DOPAをはじめとするドパミン作動性薬剤や抗コリン剤などの抗パーキンソン病薬がタクリン誘発TJMsを抑制することから、TJMsはパーキンソン病振戦の薬理学的モデルとみなされている。われわれはこれまでの研究からZNSがタクリン誘発TJMsを抑制し、その機序にドパミン系を介さないものがある可能性を提唱している。

本研究は、TJMs発現下のc-Fos発現パターンにZNS投与がどのように影響を及ぼすか、その変化に注目して、ZNSの作用を推定しようと試みたものである。

タクリン投与によるTJMs発現下では、大脳皮質、線条体でc-Fos発現が増加したが、ZNS投与により、これらの部位でc-Fos発現が有意に低下し振戦が抑制されたことは、ZNSによる振戦抑制が大脳皮質-大脳基底核系の神経細胞興奮を低下させた結果である可能性を示唆する。

ドパミン欠乏状態においては、線条体でc-Fos発現が著増することが報告されており、いわゆる大脳基底核の間接経路の神経細胞活動増加に対応する所見と考えられている。タクリンで増強された線条体におけるc-Fos発現がZNS投与によって抑制されたことは、(振戦だけでなく)ZNSの抗パーキンソン病作用の発現の場が線条体にある可能性を示唆しているのかも知れない。

E. 結論

パーキンソン病振戦の薬理学的モデルと見なされているタクリン誘発TJMsの抑制に関わるZNSの作用についてc-Fosの変動を用いて検討し

た。ZNSは、大脳皮質や基底核における神経活動を抑制的に制御している可能性が示唆された。

F. 健康被害情報 なし

G. 研究発表

Miwa H, Kubo T, Suzuki A, Kondo T: Effects of zonisamide on c-Fos expression under conditions of tacrine-induced tremulous jaw movements in rats: A potential mechanism underlying its anti-parkinsonian tremor effect. *Parkinsonism Relat Disord* 15:30-35, 2009

H. 知的財産権の出題・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

パーキンソン病治療におけるゾニサミドの長期効果
— 9年間までの follow up —

主任研究者 村田 美穂 国立精神・神経センター病院神経内科

研究要旨：ゾニサミド(ZNS)の抗パーキンソン作用を発見してからすでに9年が経過した。5-9年間の経過を観察しえてパーキンソン病患者8例の臨床症状、他の抗パーキンソン病薬の推移と有害事象を検討した。さらに経過、発症年齢をあわせた11例と比較し、抗パーキンソン作用とともに神経保護作用について考察した。進行期PDではZNS投与により約3年間は最初の効果を維持し、4年目以降薬剤の増量等を行ったが、on時のYahr重症度が投与前より悪化したのは1例のみであった。一方、ZNS開始後4年目以降でもZNSの中止により症状悪化、また増量により症状改善を確認できた。発症早期に投与開始した2例では発症9-10年目も良好な状態を維持できていた。経過中、ZNSに関連する重大な有害事象は認めなかった。ZNSの併用により、進行例においては罹患期間10-15年の症状、早期例においては5-10年の症状が非併用例に比較して安定して良好な経過をとる傾向があった。

A. 研究目的

ゾニサミド(ZNS)の抗パーキンソン病(PD)作用の発見者として、最も長期に抗PD作用を観察しえたことから、ZNSの抗PD作用の長期効果を明らかにする。さらに本研究班において、ZNSが様々な形式で神経保護効果を示すことを明らかにしたことから、臨床例での神経保護効果について検討する。

B. 方法

PDに対する効果を期待してZNSの投与を継続し、観察しえた8例について、UPDRS III, Yahr重症度、抗PD薬服薬量(LEDD:Levodopa Equivalent Daily Dose)を後方視的に検討した。ZNSの投与は倫理委員会の承認のもと、本人の書面同意を得て行われた。

C. 研究結果

症例：平均発症年齢48.5(43-56)才、ZNS開始時平均年齢55.9(47-66)才、現在の平均PD罹患期間14.5(9-22)年、平均ZNS投与期間は7.3(5-9)年で、ZNS投与量は50-150mg/日であった。このうち5例は罹患期間7年

以上の進行期に、3例は罹患期間3年以内の早期にZNSを開始した。いずれもそれまでの抗PD薬にZNSを1日1回加えた。一方、対象群は平均発症年齢49.4(41-56)才、平均PD罹患期間13.7年(8-19)年であった。

効果：ZNS投与により、PD症状は改善し、3年間はほぼ同程度の効果を維持できた。4年目以降はやや悪化し他の抗PD薬(LEDD)が増量される傾向にあったが、観察期間中にon時のYahr重症度がZNS投与前より悪化した症例は1例のみであった。一方、off時のYahr重症度は4例で悪化していた。

進行期ZNS開始例ではPD発症後13-15年後にoff時の症状が一段階悪化しているが、ZNS非投与群に比較するとやや重症度が低い傾向にあった。

発症3年以内にZNSのL-dopaとの併用投与を開始した3例中2例はPD罹患期間9-10年で、規則的な内服により、ほとんど症状のない状態を維持している。

発症3年以内にZNSを開始した3例中1例は他覚的には効果ははっきりしなかったが、本人及び家族の希望で継続した。服用

開始7年目 (PD罹患期間8年) で口顎及び上肢の振戦がめだってきたため、ZNSを150mg/日に増量したところ、振戦はほぼ完全に消失し、1年後も効果を維持できていた。

ZNS開始4年目以降でもZNS中止による症状悪化を認めた。

対照群であるZNS非併用群でも長期にわたり、Yahr 1を維持できた症例もあった。

なお、抗PD薬量(LEDD)はZNS非投与群に比較して投与群ではLEDDの増量経過が少ない傾向にあった。しかし、非投与群にも数年にわたりほとんど増量せずに経過できる患者もごく小ながら存在した。

有害事象:

- 1) 熱中症(症例3) ZNS服用開始7年目(PD発症15年目)の夏に熱中症にて62歳で死亡した。ZNSの副作用として発汗障害が報告されているが、本例はマウンテンバイク、登山を趣味としていたが、熱中症発症前日まで発汗障害は認めていなかったことから、ZNSによる発汗障害によるものではないと考えた。
- 2) 体重減少(症例8) ZNS開始4年目(PD発症21年目)に1年間で約8Kgの体重減少を認めた。ZNSの副作用の体重減少を疑い、中止したところ、体重は変化しなくなった。しかし、wearing-off減少悪化のため、本人の強い希望で、3ヵ月後よりZNSを再開したが、その後体重減少は認めなかった。
- 3) 幻覚・妄想(症例1) ZNS開始8年目(PD発症16年目)にドパミンアゴニストの変更を契機に幻覚妄想出現。アゴニストの変更を契機にしていることからZNSとの関連はないと考えた。
- 4) 不随意運動(症例1, 2, 4, 6) 経過中4例に不随意運動を認めた。症例2以外は軽度で、症例2はもともとあった不随意運動の悪化である。いずれもZNS開始後3年は変化なく、抗PD薬が増量された4年目以降顕在化していることから、ZNSとの関連は否定的であった。

D. 考察

ZNS投与により症状を改善できた症例は、進行期であっても約3年間効果を維持でき、その後徐々に悪化するものの、on時の症状は比較的維持できていると考えられた。

治験での1年間の長期試験ではUPDRS II

offはonより改善度が高く、1年後までより改善する傾向にあった。しかし、長期的に見ると、on時の重症度に比較してoff時の重症度は維持しにくく、これらからZNSの臨床的な保護作用を示すのは困難と考えられた。

ZNS投与群では非投与群に比較して、発症10-15年後の状態は比較的良好であった。ドパミン神経障害が進行して長期治療の問題点が出現しやすい7年目以降の進行期にZNSを投与することで、1-2段階症状が改善し、これを3年程度持続したのち徐々に悪化するものの比較的良好な状態を維持できることによると考えられた。これは臨床症状の上からはZNS投与が経過の変局点になっていることを示しているが、この経過が症状改善効果のみであるか、神経保護効果を反映しているかを評価することは困難である。

E. 結論

ZNSの抗パーキンソン作用は長期に渡り安全に高い効果を維持することができた。進行期においても長期にわたり、投与前よりも良い状態を維持できたことは、動物実験などで示したZNSの神経保護作用を臨床的に示している可能性もあると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Murata M: Levodopa in the early treatment of Parkinson's disease. Parkinsonism & Related Disorders 2009; 15(1): S17-S20
 - 2) Asanuma M, Miyazaki I, Diaz-Corrales FJ, Miyoshi K, Ogawa N, Murata M. Preventing effects of a novel anti-parkinsonian agent zonisamide on dopamine quinone formation. Neurosci Res. 2008;60:106-113.
 - 3) Tomiyama H, Mizuta I, Yuanzhe Li, Funayama M, Yoshiho H, Lin Li, Murata M, Yamamoto M, Kubo S, Mizuno Y, Toda T, Hattori N: LRRK2 P755L variant in sporadic Parkinson's disease J Hum Genet 2008; 53: 1007-1011
- ##### 2. 学会発表
- 1) M. Murata, I. Kanazawa: Expression profile of corpus striatum and cerebellar cortex in rats after 14days administration of zonisamide;

- new antiparkinsonian agent 12th
 Internationa Congress of
 Parkinson's Disease and Movement
 Disorders Chicago June 22-26, 2008.
- 2) 山本敏之, 古澤嘉彦, 遠藤史人, 廣實真弓, 小林庸子, 村田美穂: 「L-DOPA 血中濃度の変化がパーキンソン病患者の嚥下動態に与える影響」 日本神経筋疾患摂食・嚥下・栄養研究会 千葉 2008 年 10 月 18 日
- 3) 村田美穂: Continuous dopaminergic stimulation でジスキネジアは予防できる 第 2 回 Movement Disorder Society Japan 学術集会 京都 2008 年 10 月 2-4
- 4) 岡本智子, 大矢 寧, 村田美穂: 亜急性に全身の不随運動をきたし、ハロペリドールが無効と思われる 84 歳女性 第 23 回日本大脳基底核研究会 2008 年 7 月 5-6 山梨
- 5) 遠藤史人, 古澤嘉彦, 岡本智子, 小川雅文, 村田美穂: 発作性運動誘発性アテトーゼの一家系例 第 185 回日本神経学会関東地方会 東京 2008 年 6 月 7 日
- 6) 村田美穂: パーキンソン病の治療: 薬物療法の up to date 第 49 回日本神経学会総会シンポジウム 神奈川 2008 年 5 月 15-17
- 7) 町田 祐, 村田美穂, 服部信孝: 新規抗パーキンソン病薬ゾニサミドの神経保護効果の検討 第 49 回日本神経学会総会 神奈川 2008 年 5 月 15-17
- 8) 富山弘幸, 高橋祐二, 関 尚美, 高橋裕秀, 村田美穂, 山本光利, 戸田達史, 後藤 順, 服部信孝, 辻 省次: 常染色体優性遺伝性パーキンソン病における LRRK2 変異解析 第 49 回日本神経学会総会 神奈川 2008 年 5 月 15-17
- 9) 久野貞子, 村田美穂, 竹内重二: パーキンソン病の視床下核刺激術後の後遺症 第 49 回日本神経学会総会 神奈川 2008 年 5 月 15-17
- 10) 佐竹 渉, 水田依久子, 渡邊雅彦, 武田 篤, 長谷川一子, 中島健二, 佐古田三郎, 山本光利, 服部信孝, 村田美穂, 戸田達史: パーキンソン病感受性遺伝子の固定—FGF20 と新規感受性遺伝子 第 49 回日本神経学会総会 神奈川 2008 年 5 月 15-17
- 11) 水田依久子, 佐竹 渉, 角田達彦, 渡邊雅彦, 武田 篤, 長谷川一子, 中島健二, 山本光利, 服部信孝, 村田美穂, 戸田達史: パーキンソン病感受性遺伝子の固定および統計学的相互作用解析 第 49 回日本神経学会総会 神奈川 2008 年 5 月 15-17
- G. 知的所有権取得状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

パーキンソン病の遺伝子多型と発症リスクおよびゾニサミドの薬剤効果の研究

(分担) 研究者 戸田達史¹⁾²⁾

研究協力者 佐竹渉¹⁾、水田依久子¹⁾、三井純³⁾、長谷川一子⁴⁾、
辻省次³⁾、中村祐輔⁵⁾、山本光利⁶⁾、服部信孝⁷⁾、村田美穂⁸⁾

¹⁾ 大阪大学臨床遺伝、²⁾ 神戸大学神経内科、³⁾ 東京大学神経内科、⁴⁾
国立病院機構相模原病院神経内科、⁵⁾ 東京大学医科学研究所、⁶⁾ 香川
県立中央病院神経内科、⁷⁾ 順天堂大学脳神経内科、⁸⁾ 国立精神・神経
センター病院神経内科

我々は多因子遺伝疾患である孤発性パーキンソン病 (PD) 感受性遺伝子を明らかにするために、種々のアプローチを進めてきた。イルミナ Hap550 アレイを用いて、患者約 1000 人、対照 2500 人（最終計 8296 検体）の Genome wide association study (GWAS) やゾニサミド薬剤感受性 SNP の同定を行った。また rare variant としてゴーシェ遺伝子変異が確実な PD リスクであることを明らかにした。

A. 研究目的

高齢化に伴い患者数の増加が予測される孤発性 PD の疾患感受性遺伝子を明らかにするとともに Zonisamide の薬効に影響する SNP を同定し、テーラーメイド化をめざす。

B. C. 研究方法、研究結果

①500K SNP chip を用いた全ゲノム関連解析
今回、Illumina 社 HumanHap550 アレイを用いて、PD 患者 1012 検体、コントロール 2573 検体の SNP 型を判定した。IBS 検定、Multidimensional scaling により、血縁者や非アジア人検体を除外し、患者 988 検体、コントロール 2521 検体で 438,886SNP の関連解析を行った結果、最も有意であったのは、 α -synuclein 領域の SNP ($P=6.2 \times 10^{-13}$ (trend model)) であった。関連を認めた上位 384SNP について、別の患者 894 検体、コントロール 3893 検体（計 8296 検体）で replication 実験を行った。 α -synuclein 領域は $P=3.5 \times 10^{-16}$ を示したが、それ以外にも有意に関連した領域を得ている。

②ゾニサミドの薬効に関連する SNP

また、ゾニサミド有効例・無効例間（110 例）で同様の SNP chip による関連解析を行い、効果判定マーカーとなる多型を同定することを試みた。内 22 個以上の SNP が $P=10^{-5}$ 以下を示し、例えば CYP20A1 は G アレルをもつと無効例が多いなど、明らかに偏りがあった。

③rare variant とゴーシェ病

リピドーシスのひとつゴーシェ病患者で PD を合併する例が報告されたことから、PD における GBA 遺伝子変異の保因者頻度を調べた研究が世界中で行われている。GBA 遺伝子の全 11 エクソンとその近傍を PD 患者 534 人、対照 544 人リシーケンスして塩基配列変化の有無を調べ、11 種類の疾患原性点変異が同定された。ヘテロで持つ保因者は PD 患者 534 人中

50 人 (9.4%)、対照 544 人中 2 人 (0.37%) であり、PD と GBA 変異は強く関連していた ($p=6.9 \times 10^{-14}$, オッズ比 28.0)。PD 患者で同定された変異は、日本人ゴーシェ病でみられる変異の分布とはかなり異なっていた。GBA 変異をもつ PD 患者の発症年齢 (52.5 ± 7.4) は変異を持たない PD 患者の発症年齢 (58.8 ± 10.7) よりも有意に低かった ($p < 0.001$)。親子または同胞で PD を発症している 34 家系について、GBA 変異を調べたところ、5 家系 (14.7%) において、家系内の患者で共通の変異がみられた。

D. E. 考察、結論

SNP chip では、同規模のプロジェクトが米国、ドイツで進行中であり、関連を認めた SNP に関しては、ドイツ人、米国人で再現性を検討し、PD 感受性 SNP を同定する。また、ゾニサミド有効例・無効例間で効果判定マーカーとなる多型を組み合わせて検証する。GBA 変異は確実な PD リスク因子であり、common disease multiple rare variant 仮説によるものである。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Mizuta I et al. *Hum Genet* 124:89-94, 2008
Tomiyama H et al. *J Hum Genet* 53:1012-1015, 2008
Kumazawa R et al. *Arch Neurol* 65:802-808, 2008
Mitsui J et al. *Arch Neurol* (in press)

2. 学会発表

日本神経学会 2008
日本人類遺伝学会 2008
アメリカ人類遺伝学会 2008

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

特になし

「新規抗パーキンソン病薬ゾニサミドの神経保護作用に関する臨床研究」班 分担研究報告書

気管支喘息患者における restless legs syndrome の頻度

分担研究者：長谷川一子 国立病院機構相模原病院神経内科

研究協力者：堀内恵美子¹ 釣木澤尚実²，押方智也子²，

長谷川真紀²，秋山一男²，公文 彩¹

所属：相模原病院神経内科1，同，アレルギー科2

研究要旨

我々はこれまでに腎不全に伴う透析症例，関節リウマチ患者における二次性 restless legs syndrome (RLS) の頻度について検討してきたが，本年は通院中の気管支喘息患者における RLS の疫学調査をアンケート（質問紙）法により実施した．回答の得られたのは200名（男性69名，女性131名）で平均年齢は54.75±17.31歳，（男性55.34±16.99歳，女性54.45±17.54歳（M±SD）），罹病期間は21.84±17.83年（男性18.89±16.79年，女性23.38±18.22年）であった．RLSの症状があった患者（probable RLS）は全体の22%（44名：男性11名，女性33名）であった．また国際レストレスレッグズ症候群研究グループ（IRLSSG）の診断基準をすべて満たす症例（definite RLS）は全体の10%（20名：男性6名，女性14名）であった．RLSあり群の平均年齢は47.52±14.24歳（男性51.91±18.41歳，女性45.85±12.58歳）でRLSなし群に比較して有意（ $p=0.000511$ ）に若年であり，この傾向は女性で顕著（ $p=0.00014$ ）であった．罹病期間はRLSあり群となし群で有意な差は認められなかったが，男性では31.5±14.82年と長期間（ $p=0.03$ ），女性では18.5±13.79年と短期間（ $p=0.017$ ）で，性差がみられた．喘息発作との関係では44名中27名で関連性はなかった．好酸球数はRLSあり群で高値をとる傾向（ $p=0.086$ ）があり，女性ではRLSあり群363.79±246.29/ μl ，RLSなし群258.58±200.72/ μl と有意（ $p=0.04$ ）に高値であった．現在，RLS治療はドパミン agonist やベンゾジアゼピン系薬物が第一選択薬とされているが，未治療の症例や軽症例，ドパミン agonist で十分な治療効果が得られていない症例に対し，ゾニサミドによる薬物療法の有効性を検証していく予定である．

A. 研究目的

Restless legs syndrome (RLS) は脚（時には腕にも）の不快感を訴え，この不快感から逃れるために脚を動かさずにはいられない衝動に突き動かされ，動き続け，大多数の患者では睡眠障害を生じたり，長時間の会議，旅行などが不可能となったりする．欧米ではこの疾患の罹患率は報告による違いはあるが8.5%～9.6%であるのに比し，わが国の特発性 RLS の頻度は1-2.4%と低い．日常診療においては特発性 RLS よりもむしろ二次性の RLS に遭遇する機会の方が多い．本班において我々は，これまでに腎不全による透析患者，関節リウマチについて二次性 RLS の有病率について検討してきたが，本年は喘息

患者における RLS の現状について調査を行った．喘息患者における RLS の実態を明らかにし，その増悪因子を究明し，発症の予防，治療法の開発を目的とすることを目的とする．

B. 研究方法

当院における喘息患者で，調査に対する同意を得た症例についてアンケート（質問紙）による調査を行った．質問項目は年齢，性別，喘息の罹病期間，RLSの有無，軽快・増悪の有無，現在の RLS による脚や腕の不快感，この一週間で症状のために動き回りたいという欲求の程度，RLS の発症時間帯，喘息発作と RLS との関連とした．RLS の検出には，国際レストレスレッグズ症候群研究グループ

(IRLSSG)の診断基準を用い、①じっと座っているときや横になっているとき、脚や手に気持ちの悪い感じが繰り返したり、そのために脚を動かしたくてたまらなくなることがあるか②足や手を動かしたくてたまらない症状は休んでいたり、横になったり、座ったりしたときに出現したり、悪くなったりするか③脚や手を動かしたくてたまらなくなる衝動や脚の不快感は歩いたり、脚を動かすことによって楽になったりするか。④脚を動かしたくてたまらなくなる衝動や脚の不快感は、夕方や夜に悪化したり、夕方や夜のみにおこるか。以上の4つの質問により行い、原則として①に「はい」と答えた症例を RLS あり (probable RLS) とした。また、4つの質問にすべて「はい」と答えている症例に関しては definite RLS とし、別に有病率を示した。

喘息の診断は 1. 発作性の喘鳴、咳、息切れ、胸部圧迫感などの呼吸困難症状の反復、2. 可逆性気流制限、3. 気道過敏の亢進 4. β_2 -性素因、5. 気道炎症の存在(末梢血での好酸球数の増加など) 6. 呼吸機能検査での閉塞性障害
上記を目安にアレルギー科医師が行った。以上を満たしていても検査結果から、明らかな Churg-Strauss syndrome と考えられる症例は除いた(血管炎による筋炎、筋膜炎、末梢神経障害が合併するため)。

RLS の発症には鉄代謝や貧血が関与していることが報告されている。気管支喘息患者においても鉄欠乏及び鉄欠乏性貧血が RLS の発症に寄与している可能性もあると考えた。鉄欠乏の指標として用いられているのはフェリチン値であるが、欠測症例が多いため、1年以内で、アンケート調査に最も近い時期に検査されたヘモグロビン(Hb)値を代用として使用した。さらに、気管支喘息で上昇することの多い好酸球数についても調査した。

なお調査に先立ち、国立病院機構相模原病院倫理委員会の承認を得た。個人情報の管理については十分な注意を払って調査を行った。

C. 研究結果

回答の得られたのは 200 名(男性 69 名、女性 131 名)で平均年齢は 54.75 ± 17.31 歳、(男性 55.34 ± 16.99 歳、女性 54.45 ± 17.54 歳 (M \pm SD)), 罹病期間は 21.84 ± 17.83 年(男性 18.89 ± 16.79 年、女性 23.38 ± 18.22 年)であった。

RLS の症状があった患者 (probable RLS) は全体の 22% (44 名: 男性 11 名、女性 33 名)で、このうち現在も RLS がみられる患者は 12% (24 名: 男性 10 名、女性 14 名) だった。また国際レストレッグス症候群研究グループ (IRSSG) の診断基準をすべて満たす症例 (definite RLS) は全体の 10% (20 名: 男性 6 名、女性 14 名) であった。4 項目のうち④を満たさない症例が多く、喘息患者ではむずむず感と足を動かしたくなる衝動が夜間でなく、日中のみの患者も少なくないことが明らかとなった。

併用薬剤は① β_2 刺激薬 (貼付・吸入)、②ステロイド薬 (吸入・経口・静注)、③抗アレルギー薬 (抗ヒスタミン薬 (RLS あり群では 4 例で使用 男性 1 例、女性 3 例)、抗 α_1 トリエン薬、抗 α_2 阻害薬、Th2 サイトカイン阻害薬) ④肥満細胞からの化学物質放出抑制剤 (クロモグリク酸ナトリウム) ⑤テオフィリン製剤 (経口・静注) などであった。薬剤と RLS の発現には明らかな関連は見出せなかった。

RLS あり群の平均年齢は 47.52 ± 14.24 歳 (男性 51.91 ± 18.41 歳、女性 45.85 ± 12.58 歳) で RLS なし群と比較して有意 ($p=0.000511$) に若年であり、この傾向は女性で顕著 ($p=0.00014$) であった。罹病期間は RLS あり群では 22.04 ± 15.08 年と全体と比し有意差は認められなかった。しかし、性別では男性で 31.5 ± 14.82 年と長期間 ($p=0.03$)、女性で 18.5 ± 13.79 年と短く ($p=0.017$)、罹病期間と RLS 有病率との間には性差がある傾向がえられた。

RLS のみられる時間帯は寝るときのみが最も多く (18 名)、18 時以降: 7 名、昼間から見られるもの: 14 名 (5 例回答なし) であった。また喘息発作そのものとの関連は 44 名中 27 名で認められなかった。Hb 値の平均値は 13.53 ± 1.31 g/dl であり、(RLS あり群: 13.5 ± 1.18 g/dl、RLS なし群: 13.55 ± 1.35 g/dl) RLS あり群となし群との間に有意な差は認められなかった。好酸球数は RLS あり群で $360.24 \pm 220.97/\mu l$ 、なし群で $290.56 \pm 249.75/\mu l$ と RLS あり群で高値をとる傾向 ($p=0.086$) が認められたが、女性では RLS あり群 $363.79 \pm 246.29/\mu l$ 、RLS なし群 $258.58 \pm 200.72/\mu l$ と有意 ($p=0.04$) に高値であった。

D. 考察

今回のアンケート調査により、気管支喘息患者に

においては RLS 有病率 (probable RLS) は 22% であった。また IRLSSG の 4 つの診断基準を全て満たした症例 (definite RLS) も 10% であった。これら 4 つの診断基準をすべて満たしていない場合の RLS は、本来ならば 1. 家族歴の存在, 2. ドパミン療法に対する反応, 3. 不随意運動 (periodic limb movement in sleep) などを参考にして実際に診察して、臨床的に診断するが、今回の調査は質問紙方式によるものであり、probable RLS としては実際よりも多くの症例が含まれている可能性がある。結果の解釈については慎重を要する。日本で行われた疫学調査では特発性 RLS の有病率は 1-2.4% 程度と低いが、気管支喘息において IRLSSG の確診例が 10% にも上ったことから、気管支喘息における RLS の有病率は高いと考えられた。

二次性 RLS の原因としては、鉄欠乏、腎障害、透析、妊娠、末梢神経障害、脊髄障害、末梢神経障害、パーキンソン病などの神経変性疾患、慢性閉塞性肺疾患、関節リウマチ、薬剤性などがこれまでに知られてきている。Table 1 のように、我々の行った二次性 RLS に関する調査の中では、気管支喘息は、腎不全による透析症例に次いで高い RLS の有病率を示した。RLS の発症機序としてサイトカインの関与についても言及されているが、RLS と喘息発作そのものとの関連がない症例が多かったことから発作によって生ずるサイトカインの変化と RLS の発症との関連は少ないと考えられた。しかしながら好酸球数は女性においては RLS あり群で有意に高値であり、発症に寄与している可能性が示唆された。使用薬剤については RLS あり群となし群で詳細な検討はしていないが、従来より二次性 RLS の原因薬剤のひとつとして知られている抗ヒスタミン薬については使用者が RLS あり群で 4 名 (男性 1 名 女性 3 名) と少なく、関連は少ないものと考えられた。また、Hb 値についても RLS なし群と比較して有意な差は認められず、気管支喘息患者においては貧血が発症に関与していないことが示された。今回の結果で興味深いのは、男女ともに若年者で有病率が高かったことであり、特発性の RLS では高齢になるほど有病率が高いことを鑑みると、気管支喘息においては特発性の RLS とは別の機序が発症に寄与している可能性が示唆された。特発性の RLS においては若年発症例に関しては家族歴を有することが多いことが報告されているた

め、遺伝的素因を有している可能性も示唆された。発症年齢は男女ともに低いが、男性では罹病期間が有意に長期間であり、女性では短期間であった。この結果より、男女で異なる機序が関与している可能性も考えられ、今後、喘息の重症度や型、投薬内容などについて更に検討の余地があると考えられた。

Table 1. 二次性 RLS の頻度

	男性	女性	全体
腎不全	22%	38%	32.1%
関節リウマチ	11.5%	7.9%	7.1%
喘息	15.9%	25.2%	22%

E. 結論

喘息患者を対象に RLS についての疫学調査を実施した。RLS のある症例は RLS がない症例と比し若年であった。罹病期間は、RLS あり群は男性においては長期間であり、女性においては短期間の傾向があった。また、RLS あり群は好酸球が高く、性でより顕著であった。女性においては好酸球数が RLS の機序因子となっている可能性が示唆された。現在、RLS はドパミン agonist が第一選択薬であり、ドパミン製剤も含めた抗パーキンソン病薬で治療されることが多いが、抗てんかん薬、ベンゾジアゼピン系薬剤、セロトニン系薬剤などもその治療に用いられる。現在未治療の症例や、十分な治療効果が得られていない症例に対し、抗パーキンソン病薬としての作用と同時に抗てんかん作用も併せ持つゾニタミドなどの薬物療法の有効性を含め検証する予定である。

[参考文献]

1. Ekbom KA. Restless legs syndrome. *Neurology* 1960; 1060: 868-73.
2. Walters AS. International Restless legs syndrome study group. Towards a better definition of restless leg syndrome. *Mov Disord* 1995; 10: 634-642.
3. Allen RP, Picchietti D, Hening WA, et al. Restless legs syndrome: diagnostic criteria, special considerations, and epidemiology. *Sleep Med* 2003; 4: 101-19.
4. Hening w, Walters AS, Allen RP, et al. Impact, diagnosis and treatment of restless legs syndrome (RLS) in a primary

care population:the REST(RLS
epidemiology, symptoms, and treatment)
primary care study .Sleep Med
2004;5:237-46.

5. 井上雄一, 石東嘉和, 新井平伊他. わが国での
レストレスレッグス症候群の疫学と治療の実態につい
て. 新薬と臨床. 2000 ; 49:244-55.
6. Mizuno S Miyaoka T, Inagaki, et
al. Prevalence of restless legs syndrome in
non-institutionalized Japanese elderly.
Psychiatry Clin Neurosci 2005; 59:461-5.

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表 なし

H. 論文発表, 学会発表 なし

I. 知的財産権の出願・登録

1. 許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

神経毒に対するゾニサミドの保護作用
—セレギリンとの比較—

チャウドリー・ムハメド、森豊隆志、久保円、矢部勇人、野元正弘
愛媛大学大学院病態治療内科

分担研究者 野元 正弘 愛媛大学大学院病態治療内科教授

研究要旨

神経毒の 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) はドパミン神経細胞を選択的に障害することが報告されている。コモン・マーモセットを用いて、MPTP によるドパミン神経障害に対するゾニサミドの作用を、セレギリンと比較して検討した。ゾニサミド、セレギリン、生食を投与した後に MPTP を皮下投与し、14 日後に中脳をチロシン水酸化酵素 (TH) 免疫染色を行い、黒質のドパミン細胞の数と細胞の大きさ、形状を評価した。中脳断面における黒質の TH 陽性細胞数は正常動物で 238.33 ± 25.86 個、MPTP 単独投与群 30.00 ± 6.81 個に対して、ゾニサミド群で 60.67 ± 1.77 個、セレギリン群で 112.33 ± 17.70 個であり、ゾニサミドにより MPTP による神経細胞の障害が抑制された。セレギリンではさらに抑制された。また、TH 陽性細胞の面積、形状の評価でも同様の結果であり、ゾニサミドでも MPTP によるドパミン神経の障害が抑制されることが示された。

A. 研究目的

マウスとコモン・マーモセットを用いて、神経毒である MPTP のドパミン神経細胞障害に対するゾニサミドの作用を検討する。

B. 研究方法

コモン・マーモセットに対して 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) を皮下投与した。ゾニサミド群では MPTP を投与する 1 時間前にゾニサミド 40 mg/kg を皮下に 1 日 1 回、3 日間投与した。投与を開始して 2 週間後に脳を 4% パラフォルムアルデヒドで固定した後、パラフィン包埋し、中脳の黒質を抗チロシン・ヒドロキシラーゼ (TH) 抗体を用いた免疫組織学的方法により検討した。

薬物

ゾニサミドは dimethyl sulfoxide (DMSO) に懸濁し、生理食塩水で 20% に調整して皮下投与した。

MPTP は生理食塩水に溶解して皮下投与した。

C. 研究結果

黒質の TH 陽性細胞数は、正常対照群 238.33 ± 25.86 に対して、MPTP 単独投与群 30.00 ± 6.81 と減少していたが、ゾニサミド投

与群は 60.67 ± 1.77 、セレギリン投与群は 112.33 ± 17.70 と、共に単独投与群に比して、TH 陽性細胞数は保たれていた (Fig 1)。また、残存している黒質の TH 陽性細胞の面積 (μm^2) を測定したところ、正常動物では 424.29 ± 51.32 、ゾニサミド投与群では 273.42 ± 20.64 に対して、セレギリン投与群では 319.02 ± 26.52 は、MPTP 単独投与群 158.69 ± 20.77 より大きかった (Fig 2)。また、TH 陽性神経細胞の樹状突起・軸索の形態はゾニサミド群、セレギリン群では MPTP 単独投与群よりも、よく保たれていた。

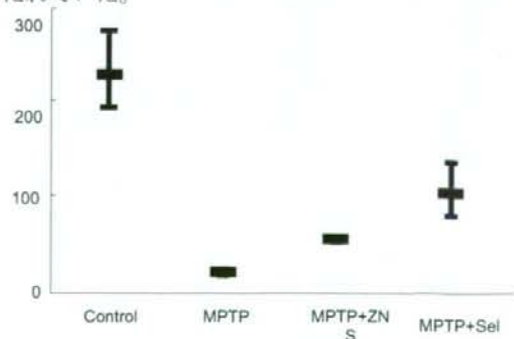


Fig 1. 黒質 TH 陽性細胞の数 各 n=3