

上位運動ニューロン症候を呈さないALSの

臨床病理学的検討

研究分担者 祖父江元¹⁾

研究協力者 熱田直樹¹⁾、渡辺宏久¹⁾、伊藤瑞規¹⁾、千田謙¹⁾、加賀友継¹⁾、加藤重典¹⁾、
井口洋平¹⁾、勝又竜¹⁾、田中章景¹⁾、吉田眞理²⁾、橋詰良夫²⁾

1) 名古屋大学神経内科、2) 愛知医科大学加齢医科学研究所神経病理

研究要旨

現行のALS診断基準では上位運動ニューロン（UMN）症候を捉えられない患者をALSと診断できない。孤発性ALSと病理診断された連続剖検95例により、UMN症候を認めないALSの頻度およびその臨床病理像を調べた。ALSと病理診断された例の14.7%でUMN症候を臨床的に捉えられず、それらは何らかの病理的なUMN変性所見があるが、相対的に下位運動ニューロン（LMN）変性が強かった例であることが示された。これらを医療・福祉のための診断基準にALSとして取り込む必要がある。一方UMN症候が捉えられないALSでは21%でTDP-43陽性細胞質内封入体が認められず、通常のALSと異なる病態の存在が示唆される例が含まれた。UMN症候が捉えられるALSでは100%にTDP-43陽性封入体を認め、均一な病態を有する可能性が高いことが示された。治験や遺伝子多型を用いた関連解析の症例選択基準としては改訂版El Escorial診断基準は妥当と考えられる。

A.研究目的

現在、世界標準の筋萎縮性側索硬化症（ALS）診断基準は改訂版El Escorial診断基準であり、現行のALS特定疾患認定基準もこれに基づいて作成されている。改訂版El Escorial診断基準では上位運動ニューロン症候を認めない例はClinically Suspected ALSとし、ALSの診断基準から除外するとされ、我が国のALS認定基準でもALSの診断には1つ以上の領域に上位運動ニューロン徴候をみとめ、かつ2つ以上の領域に下位運動ニューロン徴候があることが必要とされている。しかしながら上位運動ニューロン（UMN）症候を臨床的に認めないがALSと診断せざるを得ない症例が存在することは知られており、診断基準の問題点が指摘されてきた。

今回、我々は連続剖検例の解析により、UMN症候を呈さない孤発性ALSの頻度や、それらの

臨床病理像を調べた。

B.研究方法

1998-2008年の愛知医科大学加齢医科学研究所における連続剖検例のうち、孤発性ALSと病理診断されたのは117例あった。それらから臨床情報不十分の22例を除外し、計95例を対象とした。下顎反射亢進、四肢いずれかの腱反射の亢進、バビンスキー反射などの病的反射、強制泣き笑い、四肢いずれかの痙性の全てを認めず、腱反射の全般低下、または消失の記載がある例をUMN症候を認めなかった例とした。

（倫理面への配慮）

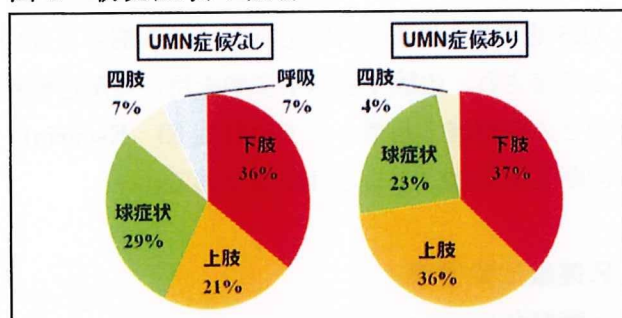
剖検は御遺族の文書による同意を得て実施された。

C.研究結果

剖検で ALS と病理診断された 95 例のうち、UMN 症候を認めなかったと判断されたのは 14 例 (14.7%) であった。

UMN 症候を認めなかった 14 例と認めた 81 例の臨床像を比較すると、発症年齢は UMN 症候無し例で 60.6 ± 10.4 (平均±標準偏差、以下同じ) 歳、UMN 症候有り例 62.7 ± 13.0 歳、発症から死亡もしくは気管切開+人工呼吸器導入までの経過月数は UMN 症候無し例 32.0 ± 27.5 カ月、UMN 症候有り例 38.7 ± 45.7 カ月、男女比は UMN 症候無し例で男性 71.4%、女性 28.6%、UMN 症候有り例で男性 61.7%、女性 38.2% であり、いずれも有意な差を認めなかった。初発症状の割合を図 1 に示すが、UMN 症候無し例と有り例で類似していた。

図 1 初発症状の割合



UMN 症候有り例と無し例で、臨床像は大きくは異ならず、UMN 症候無し例は下肢発症型のいわゆる偽多発神経炎型とは限らないことが示された。

UMN 症候が認められなかった例の神経病理像を表 1 に示す。

表 1 UMN 症候が認められなかった例の神経病理像 症例 5 は末期に低酸素脳症をきたし、評価困難な項目が多いため除いた。

症例	1	2	3	4	6	7	8	9	10	11	12	13	14
死亡時年齢	71	61	62	73	35	71	70	76	62	56	70	69	70
罹病期間(年)	3.5	2.2	1.5	1.3	0.4	1.0	1.6	2.0	4.4	1.1	6.0	1.4	8.0
TPPV導入	無	無	有	無	無	無	有	無	無	無	無	無	無
下位運動ニューロン病理													
前角細胞脱落	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	NE	++	++	++	++	++
Bunina小体	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
TDP-43陽性封入体	-	+	-	+	-	+	+	+	+	±	+	+	+
上位運動ニューロン病理													
中心前回の変性	+	++	+	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+
錐体路変性(αNF)	NE	NE	+	-	+	++	+	++	-	+	-	-	+
錐体路マクロファージ	+	++	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+

人工呼吸器装着期間が長期にわたった症例 8 を除いて、UMN 変性は軽度の例が多いが、全例に何らかの UMN 変性の病理所見を認めた。下位運動ニューロン (LMN) 病理像では、大部分で脊髄前角細胞の脱落は高度であり、UMN 変性に比して LMN 変性が相対的に高度であった。Bunina 小体は 50% の例で認め、TDP-43 陽性細胞質内封入体は 79% の例で認めた。

TDP-43 陽性封入体も Bunina 小体も認めなかった例は 3 例あった。それらは男性 2 例、女性 1 例、発症年齢は平均 54.7 歳、発症から死亡もしくは気管切開+人工呼吸器導入までは平均 1.5 年と、比較的若年発症で速い経過であった。神経病理所見では上位および下位運動ニューロン変性所見に加え、好塩基性封入体を残存脊髄前角細胞、延髄網様体、黒質、青斑核、被殻、淡蒼球など広範に認める例、Gallyas-Braak 陽性封入体を広範に認める例などであり、通常の ALS と異なる病態の存在が示唆された。

UMN 症候が認められた例のうち、2006 年以降に剖検された連続 22 例の LMN 病理像を表 2 に示す。

表 2 UMN 症候が認められた例の LMN 病理像

症例	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
前角細胞脱落	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NE	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Bunina小体	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	
TDP-43陽性封入体	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

UMN 症候が認められた例では Bunina 小体を 77% の例で認め、典型的な TDP-43 陽性封入体を

100%の例で認めた。臨床的に UMN 症候を認める ALS は比較的均一な病態を持つ可能性が示された。

D. 考察

今回の解析にて、ALS と病理診断された連続剖検 95 例のうち 14.7%は臨床的に UMN 症候を認めず、現行診断基準で ALS と診断できないことが示された。既報では D K Leung らの報告

(Neurology 1999; 52: suppl2) がアメリカ合衆国における ALS 連続剖検 76 例のうち 9.2%で UMN 症候を臨床的に認めなかったとされる。臨床診断として、B J Traynor らの報告 (Archives of Neurology 2000; 57: 1171-6) ではアイルランドにおける ALS 患者登録 388 人中、8%で UMN 症候が認められなかったとされ、本研究班をベースに立ち上げられた我が国の多施設共同 ALS 研究コンソーシアムである JaCALS において、登録 308 例中の 12.3%は UMN 症候を認めないが神経内科医専門医により ALS と診断され、病名告知のうえ、登録されている。

ALS 患者のうち、1 割程度は臨床的に UMN 症候が捉えられない例が存在すると考えられる。

今回の神経病理学的検討から、UMN 症候を臨床的に捉えられない ALS は、神経病理所見において、何らかの UMN 変性所見はあるものの、相対的に LMN 変性が強いために腱反射亢進や痙性などの UMN 所見が覆い隠されてしまい、捉えられない例であると考えられた。これらの 79%は残存運動ニューロン内に TDP-43 陽性封入体を認め、多くはその他の ALS と共通した病態を持つと想定される。従って、医療・福祉のための診断基準として ALS に入れられないことは合理的とは言えず、今後取り込んでいく必要がある。

一方で、UMN 症候を認めない ALS では 21%の例で典型的な TDP-43 病理所見を認めず、広範な好塩基性封入体や Gallyas-Braak 陽性封入体の出現など、通常の ALS とは異なる病態の存在を示唆する例が含まれた。UMN 症候を認めた

ALS においては TDP-43 陽性細胞質内封入体を全例に認め、比較的共通の病態を有している可能性が高いことが示された。治験や遺伝子多型を用いた関連解析など、なるべく均一な病態を持つ例を多数集めなければならない場合の症例選択基準としては、UMN 症候の存在を必須とした改訂版 El Escorial 診断基準を用いることがやはり適切であると考えられた。

E. 結論

- ・上位運動ニューロン症候を捉え難い ALS 患者は 1 割程度存在し、診断・治療、医療・福祉提供のための診断基準に取り込む必要がある。
- ・好塩基性封入体を有する例など非典型的な病理像を呈する例について引き続き検討が必要。
- ・上位運動ニューロン症候を捉えられる孤発性 ALS 患者は、共通の病態を有している割合が高いと想定され、治験や遺伝子多型を用いた関連解析などの症例選択基準として改訂版 El Escorial 診断基準を用いることは妥当である。

F. 健康危険情報

特記なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Iguchi Y, Katsuno M, Niwa J, Yamada S, Sone J, Waza M, Adachi H, Tanaka F, Nagata K, Arimura N, Watanabe T, Kaibuchi K, Sobue G TDP-43 depletion induces neuronal cell damage through dysregulation of Rho family GTPases. J Biol Chem. 2009;284:22059-66.

Senda J, Ito M, Watanabe H, Atsuta N, Kawai Y, Katsuno M, Tanaka F, Naganawa S, Fukatsu H, Sobue G. Correlation between pyramidal tract degeneration and widespread white matter involvement in amyotrophic lateral sclerosis: a study with

tractography and diffusion-tensor imaging. Amyotroph Lateral Scler. 2009;10:288-94.

Sone J, Niwa J, Kawai K, Ishigaki S, Yamada S, Adachi H, Katsuno M, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. Dorfin ameliorates phenotypes in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. J Neurosci Res. 2010;88:123-35.

Atsuta N, Watanabe H, Ito M, Tanaka F, Tamakoshi A, Nakano I, Aoki M, Tsuji S, Yuasa T, Takano H, Hayashi H, Kuzuhara S, Sobue G; Research Committee on the Neurodegenerative Diseases of Japan. Age at onset influences on wide-ranged clinical features of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. J Neurol Sci. 2009;276:163-9.

田中章景, 坂野晴彦, 井口洋平, 勝野雅央, 祖父江元 【神経疾患治療の進歩】 運動ニューロン疾患の治療の進歩 神経治療学 26 巻 4 号 Page471-475(2009)

坂野晴彦, 勝野雅央, 鈴木啓介, 井口洋平, 足立弘明, 田中章景, 祖父江元 【神経・筋疾患の分子標的治療】 運動ニューロン疾患の分子標的治療 BRAIN and NERVE: 神経研究の進歩 61 巻 8 号 Page891-900(2009)

勝野雅央, 坂野晴彦, 鈴木啓介, 足立弘明, 田中章景, 祖父江元【神経変性疾患研究の新機軸 その新たな研究戦略が謎を解く】 運動ニューロン疾患の病因解析と治療法の開発 細胞工学 28 巻 5 号 Page456-460(2009)

H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

- 1.特許取得 特記なし
- 2.実用新案登録 特記なし
- 3.その他

筋萎縮性側索硬化症（ALS）と重症筋無力症（MG）における 神経反復刺激試験（RNS）の比較

研究分担者 園生雅弘¹⁾

研究協力者 岩波知子¹⁾、畑中裕己¹⁾、大石知瑞子²⁾、清水輝夫¹⁾

1) 帝京大学神経内科、2) 杏林大学神経内科

研究要旨

ALS で RNS での漸減応答（decrementing response；以下 Decr）が見られることは以前より知られているがその詳細な検討は少ない。本研究では Decr 陽性率とその筋別分布、CMAP 振幅と Decr の相関、Decr がボトムとなった以降振幅が回復する U shape 現象、刺激頻度と Decr の関係、などについて ALS と MG とを比較した。対象は、後向き研究で抽出された、ALS50 例、全身型 MG39 例、眼筋型 MG20 例。被検筋は短母指外転筋、小指外転筋、総指伸筋、僧帽筋、三角筋、鼻筋の 6 筋。3Hz、6～10 回刺激を行い、4 発目で 5% を超える振幅低下を有意な Decr とした。Decr 陽性率は全身型 MG74%、眼筋型 MG45% に比して ALS は 84% と高値だった。筋別分布では、MG 同様 ALS でも近位筋優位に Decr を認め、また、顔面筋が障害を免れるパターンが ALS に特徴的であった。CMAP 振幅と Decr の相関、U-shape の有無、刺激頻度と Decr の関係などについて ALS と MG の差は少なかった。RNS 異常は ALS の診断を示唆し、ALS の LMN 障害を証明する手段として有用な可能性がある。

A. 研究目的

RNS は MG の電気生理学的診断法として確立され、漸減応答（decrementing response；以下 Decr）を認めるのが特徴である。Mulder et al. (1959) は ALS でも同様の Decr を認めることを報告した¹⁾。ALS では未熟な神経再支配側枝において神経筋伝達の安全率が低いと考えられ、その後もいくつかの報告がなされているが²⁻⁴⁾、必ずしも広く認識されているとは言いがたく、その頻度や筋別の分布等の詳細な検討は少ない。本研究では、ALS の Decr の陽性率・筋別分布や、Decr の様々な特徴を明らかにし、MG と比較することを目的とした。

B. 研究方法

帝京大学医学部附属病院及び関連する 9 施設で、2006～2009 年の 4 年間に、ALS ないし MG の診断で少なくとも後述の 6 筋のうち 5 筋の RNS を施行された患者で下記の基準を満たす例を後向きに抽出した。MG は諸検査から確定診断された例で、治療前に検査が施行された症例に限定し、全身型と眼筋型とに分けて検討した。ALS については、必ずしも既存の診断基準を満たすことは要求せず、亜急性進

行の経過と筋電図学的特徴から ALS ないし類縁疾患と診断された症例を対象とした。被検筋は短母指外転筋 (APB)、小指外転筋 (ADM)、総指伸筋 (EDC)、僧帽筋 (Trap)、三角筋 (Del)、鼻筋 (Nasalis) の 6 筋。刺激頻度 3Hz、6～10 回刺激を行い、4 発目で 5% を超える振幅低下を有意な Decr とした（一部の MG 症例では APB を除く 5 筋を施行）。刺激強度は最大刺激の少なくとも 20% 増し、可能な場合は 100% 増しとした。

以下の各項目について検討し、1)～4) の各項目については ALS 群と MG 群とを比較した。

- 1) いずれか 1 筋でも Decr を認める症例の割合
- 2) Decr 陽性率の筋別分布
- 3) 1 発目の CMAP 振幅と Decr% の相関：Trap について検討した。
- 4) Decr がボトムとなった以降、振幅が回復する、いわゆる U-shape の有無：ADM と Trap の 2 筋において有意な Decr を認めた症例について、Decr 最大値からの 10 発目での振幅回復の程度を一発目 CMAP 振幅の % で表した。
- 5) 刺激頻度と Decr の関係：ALS 2 例の Trap、1

例の APB において、1、2、3、5、10、20Hz の刺激頻度での RNS を施行し、刺激頻度と Decr の程度との関係を見た。

C. 研究結果

エントリー症例：ALS50例（男性31例、女性19例、40-85歳）、全身型MG39例（男性18例、女性21例、20-83歳）、眼筋型MG20例（男性11例、女性9例、18-79歳）。

1) Decr 陽性患者の割合

RNS 施行筋のうちいずれか1筋でも Decr を認められた症例の割合は、ALS84%に対し、全身型 MG74%、眼筋型 MG45%で、ALS では差は有意ではないものの全身型 MG よりも高頻度に Decr が認められた。

2) Decr陽性率の筋別分布

各疾患群のDecr陽性率の筋別分布を図1に示す。

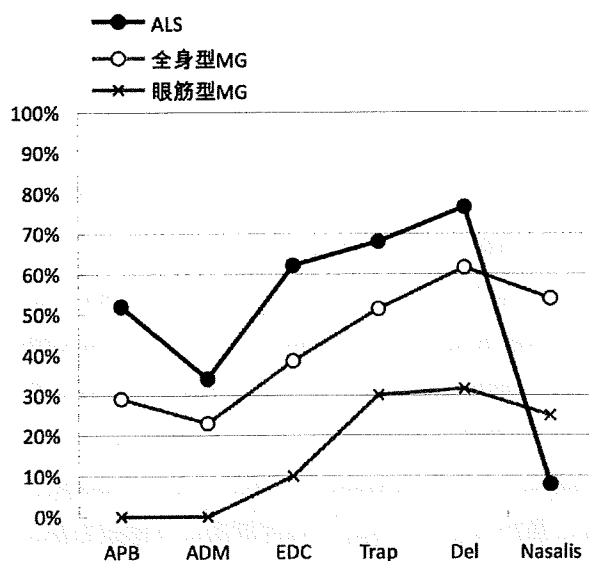


図1 各疾患群のDecr陽性率筋別比較

いずれの群でも陽性率が最も高かったのは三角筋で、四肢体幹筋では僧帽筋がこれに次ぎ、MGだけでなくALSでも、Decrは近位筋優位であった。また、顔面筋である鼻筋はMGでは三角筋ないし僧帽筋に次ぐ陽性率を示したのに対し、ALSでの陽性率は極めて低く(8%)、顔面筋が障害を免れるパターンがALSに特徴的であった。

3) CMAP 振幅と Decr の相関

Trapについて、ALS群、MG群でのCMAP振幅とDecr%との関係を図2に示した。ALS群MG群とも

CMAPが低値な程、Decrが増大する有意な相関を認め、その傾向はALS群においてより顕著であったが (ALS群 $r = -0.56$ 、MG群 $r = -0.28$)、両群の相関係数の間に有意差はなかった。

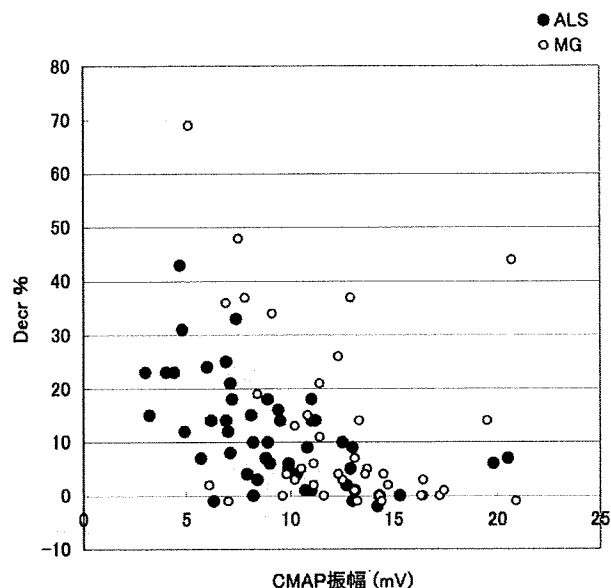


図2 CMAP振幅とDecrの関係

4) U-shapeについて

ADMで有意なDecrを認めたALS 17例、MG9例、Trapで有意なDecrを認めたALS 28例、MG 26例を検討対象とした。Decrの最大値と10発目を比較した場合、ADMでは、ALS $2.2 \pm 1.5\%$ 、MG $5.2 \pm 2.0\%$ とMGで有意に大きい振幅の回復、即ち、U-shapeを認めたが、TrapではALS $1.6 \pm 1.3\%$ 、MG $2.0 \pm 1.0\%$ で、両群間に有意差を認めなかった。実例を図3に示す。

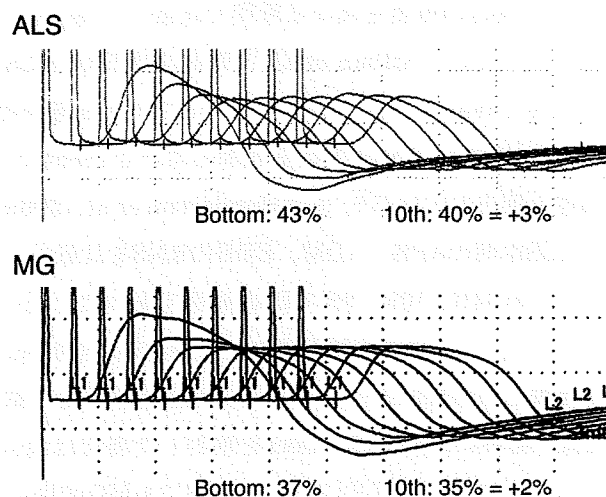


図3 ALS、MGでのU-shapeの例

5) 刺激頻度によるDecrの程度の違い

ALS 2 症例のTrap 2 筋、APB 1 筋いずれにおいても、Decrは3Hzないし5Hzで最大であり、10～20HzではDecrはこれらよりも軽度であった（図4）。

ALS patient, upper trapezius

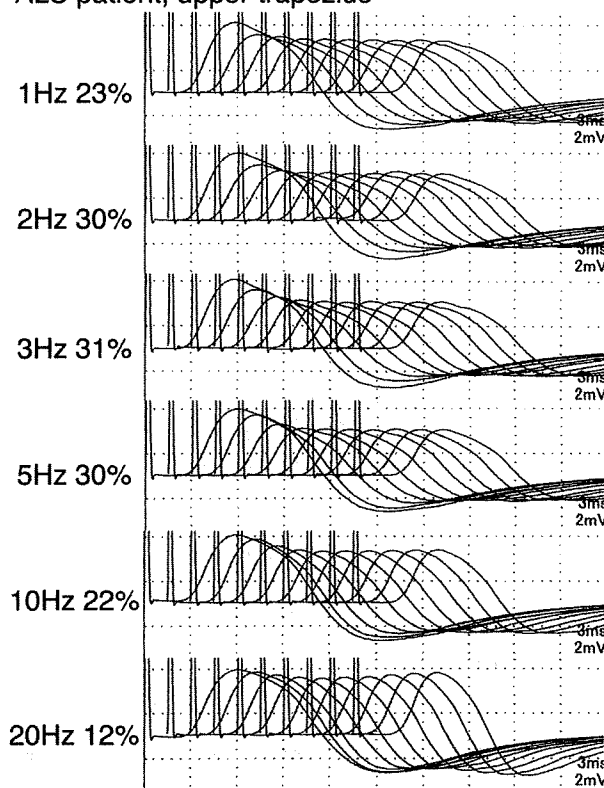


図4 ALSの1例での刺激頻度とDecrの関係

D. 考察

1) ALSのDecr陽性率と筋別比較

ALSのDecrの程度を異なる筋間で比較した報告は極めて少ない。Killian et al. (1994)は192例のALSの51%でTrapのDecrが陽性であり、このDecr陽性者のうち12例にADMのDecrを追加したところ8例で陽性と報告している³⁾。またHenderson et al. (2009)はALS症例のAPB、ADM、EDBのRNSを比較し、それぞれ34%、10%、9%でDecr陽性であったと述べている⁴⁾。この他にはALSにおいて複数筋でのDecrを比較した研究はなく、特に近位筋と遠位筋を比較した、あるいは顔面筋でDecrを検討した報告は過去にみられない。本研究においてALSでもMG同様近位筋優位にDecrを強く認め、また、顔面筋が障害を免れるのがALSに特徴的であることが判明した。

現実にALSとMGの鑑別が必要となる場面は多くないと思われるが、ALSにおいてもこのように高頻度にDecrが見られること、ALSのDecrがこのような筋別分布を呈するということを知っておくことは、たまたま施行されたRNSの結果に惑わされることなく、正しく診断に至る上での有用な情報であると思われる。また、同じくALSにおいてもこのように高頻度にDecrが見られることから、RNS異常はALSの診断を支持する所見として用いることができる可能性、あるいはALSのLMN障害を証明する非侵襲的な手段として有用な可能性がある。これらの展開については今後さらに検討を加える予定である。

2) ALSのDecrについての従来の記載

ALSにおけるDecrの特徴については、「ALSのDecrは障害が強い筋、即ちCMAP振幅低下が強い筋程高度であり、MGとは異なる」、「Decrがbottomとなった後の振幅回復、すなわちU-shapeはMGでは見られるがALSでは認めない」、「MGのDecrは3～5Hzで最大となるが、ALSのDecrは高頻度程強い」等の記載が綜説などで散見される。しかし、これらの点について実際に詳細な検討を行った報告はほとんどない。本研究では、上記の各点についても検討を行った。障害程度とDecrの関係については、CMAP振幅が低い程Decrが大きくなるが、MGでも同様の相関はあり、両者に相関係数の有意差は認めなかった。U-shapeについてはADMではMGの方がU-shapeが有意に強かったが、Trapでは両群間に有意差を認めなかった。刺激頻度とDecrの関係についてはALSでもMGと同様に3～5Hz刺激でのDecrが最大であった。

このように、MGとALSのDecrの性質に大きな差が見られなかった理由は、ALSにおいてもDecrは、シナプス前終末からのアセチルコリン放出におけるimmediately available storeの枯渇と高頻度発火でのCa蓄積による放出増大という、生理的現象によって主に規定されているものであり、神経筋伝達の障害がシナプス前であるか後であるかは、Decrの性質には直接関係しないためではないかと推測される。

E. 結論

- 1) ALS における RNS での Decr 陽性率は非常に高く、全身型 MG よりも高頻度の傾向であった。
- 2) ALS でも Decr は近位筋優位に出現した。
- 3) 顔面筋が障害を免れるパターンが ALS に特徴的であった。
- 4) CMAP 振幅と Decr の相関、U shape の有無、刺激頻度と Decr の関係などにおいて一般に ALS と MG の差は少なかった。
- 5) RNS 異常は ALS の診断を示唆する所見、あるいは ALS の LMN 障害を証明する手段として有用な可能性がある。

文献

- 1) Mulder DW, Lambert EH, Eaton LM. Myasthenic syndrome in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 9: 627-631, 1959.
- 2) Denys EH, Norris Jr FH. Amyotrophic lateral sclerosis: Impairment of neuromuscular transmission. *Arch Neurol* 36: 202-205, 1979.
- 3) Killian JM, Wilfong AA, Burnett L, et al: Decremental motor responses to repetitive nerve stimulation in ALS. *Muscle Nerve*, 17 : 747-754, 1994.
- 4) Henderson R, Baumann F, Hutchinson N, et al : CMAP Decrement in ALS. *Muscle Nerve*, 34 : 555-556, 2009.

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

準備中

2. 学会発表

- 1) 岩波知子, 園生雅弘, 畑中裕己他 : 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) と重症筋無力症 (MG) の神経反復刺激試験 (RNS) の比較. 第 50 回日本神経学会総会, 仙台, 2009.
- 2) Iwanami T, Sonoo M, Hatanaka Y, et al: Comparison of the decremental response in

repetitive nerve stimulation between ALS and MG. 19th World Congress of Neurology, Bangkok, 10, 2009.

- 3) 岩波知子, 園生雅弘, 畑中裕己他 : 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) と重症筋無力症 (MG) の神経反復刺激試験 (RNS) の比較. 第 39 回日本臨床神経生理学会学術大会, 北九州, 2009.

H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

なし

筋萎縮側索硬化症（ALS）における軸索機能評価

研究分担者 梶龍児¹⁾

研究協力者 渋田佳子¹⁾、野寺裕之^{1),2)}、和泉唯信¹⁾

1) 徳島大学神経内科, 2) Cornell 医科大学神経内科

研究要旨

最近 ALS では種々のイオンチャネル異常の病態への関与が報告されているが、threshold tracking 法を用いた軸索機能検査法にて、軸索膜に存在するイオンチャネル機能を in vivo で評価することが可能である。Threshold tracking 法では、通常 target amplitude を 40% とするが、ALS においては軸索間で障害の程度に差があると想定されるため、今回は target amplitude を 10%、20%、40%、60% とした。ALS 群(n=27) と NC 群(n=23) の比較では、40% 以外でも K⁺ channel の機能低下の傾向を認めた。また ALS 27 例のうち 3 例は、target amplitude を 10% とした場合に、depolarization に一致する所見を認めた。

A. 研究目的

神経軸索の機能はインパルスを伝達することであるが、伝達のためには軸索が静止膜電位から脱分極する必要がある。静止膜電位は主に Na⁺ イオンと K⁺ イオンの軸索膜内外での濃度差により規定され、イオン濃度差を規定するのは各イオンチャネルの機能によるところが大きい。そのため、イオンチャネルの機能異常は神経興奮性異常の原因となる。これまで、ALS において、slow K⁺ channel の機能不全および persistent Na⁺ conductance の増加が報告され、これらによる神経興奮性亢進が fasciculation の原因と推測されている(Kanai, et al.:Brain,129,953-962,2006, Vucic, et al.:Clin neurophysio,117,1458-1466, 2006)。threshold tracking 法では target amplitude を 40% とする場合が多いが、ALS においては同一神経内でも軸索間で障害の程度に差があると考えられるため、threshold tracking 法を施行するに際し、target amplitude を従来の 40% に加えて 10%、20%、60% の記録を行い、正常コントロールと比較した。

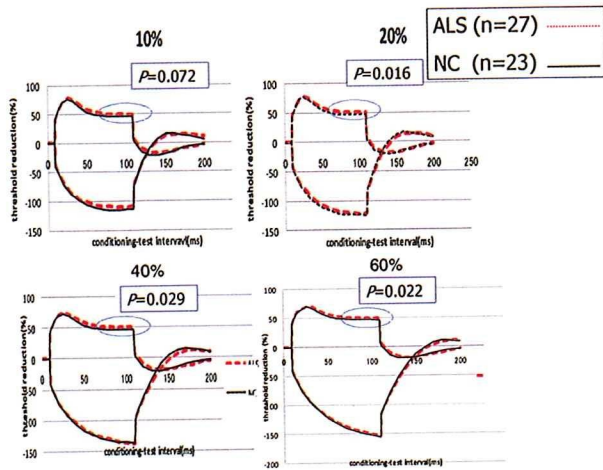
B. 研究方法

比較的早期で検査部位に fasciculation が認められる ALS 患者 27 名に対して、刺激電極の陰極を正中神経上に、陽極を神経から離れた近位におき、記録電極は通常の CMAP 記録部位上に設定し、threshold tracking 法を施行し、年齢を一致させた正常対象群(n=23)と比較した。Target amplitude は 10%、20%、40%、60% とした。

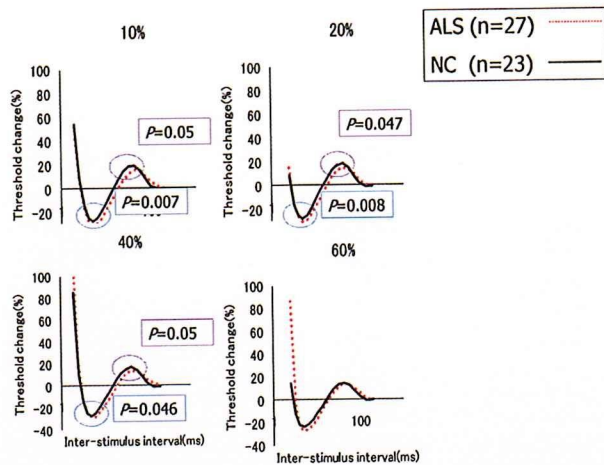
C. 研究結果

ALS 患者群と年齢を一致させた NC 群の比較では、これまでの target amplitude 40% での報告と同様に ALS 群において、threshold electrotonus (TE) 法の脱分極側で上方への偏移(グラフ 1) 傾向および recovery cycle (RC) 法の supernormality 部分で下方への偏移(グラフ 2) 傾向を認め、slow K⁺ channel の機能異常を示す傾向が得られた。

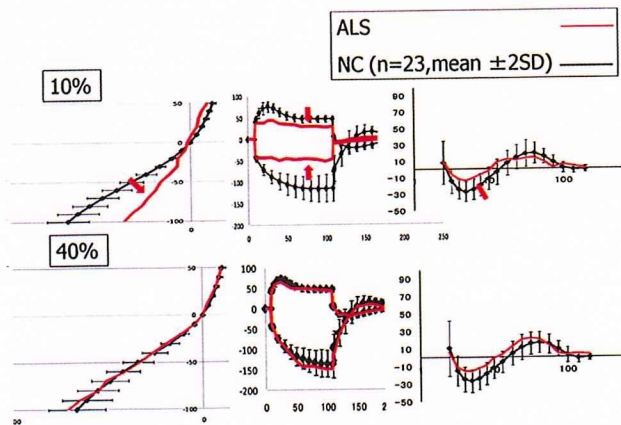
また、ALS 患者 27 例中 3 例において、target amplitude を低く設定した場合(10%)に、TE 法での fanning in や RC 法の supernormality 部分の上方への偏移など脱分極性変化を認めた(グラフ 3)。



グラフ 1:TE 法(ALS27 例:赤点線、NC23 例:黒実線)



グラフ 2:RC 法(ALS27 例:赤点線、NC23 例:黒実線)



グラフ 3:左から IV 法、TE 法、RC 法 (脱分極性変化を示した患者例:赤、NC23 例平均±2SD:黒)

D.考察

Bostock らは SOD1^{G93A} モデルマウス群では、WT 群と比較して、TE 法の脱分極側での下方偏移や、RC 法の supernormality での上方偏移といった脱分極性変化を示すことを報告した(Bostock, et al.:musclen nerve,2009)。臨床的な発症を SOD1 群と WT 群での CMAP の差を認める 11 週以降とすると、RC 法での変化は発症早期の 11 週以降から、TE 法での変化は発症前の 8 週以降から認められた。これは、早期(8-10 週)の病理変化(axonal transport abnormality, mitochondrial dysfunction)を認める時期と一致するため、mitochondrial dysfunction による ATP 欠損や mitochondria の axonal transport 減少が脱分極性変化の原因となっている可能性がある。

E.結論

ALS では、発症早期から運動神経軸索で、脱分極性変化を示す症例がある。Threshold tracking 法の target amplitude を小さくすることで、これまで難しかった発症早期の ALS において、in vivo で末梢神経の変性をとらえられる可能性がある。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1. 論文発表

1. Torii, Y., Y. Goto, et al. (2009). "Quantitative determination of biological activity of botulinum toxins utilizing compound muscle action potentials (CMAP), and comparison of neuromuscular transmission blockage and muscle flaccidity among toxins." Toxicon.
2. Torii, Y., M. Takahashi, et al. (2009). "Quantification of potency of neutralizing antibodies to botulinum toxin using compound

- muscle action potential (CMAP).” Toxicon.
3. Sako, W., M. Nishio, et al. (2009).
”Subthalamic nucleus deep brain stimulation for camptocormia associated with Parkinson’s disease.” Mov Disord 24(7): 1076-9.
4. Nishio, M., K. Korematsu, et al. (2009).
”Long-term suppression of tremor by deep brain stimulation of the ventral intermediate nucleus of the thalamus combined with pallidotomy in hemiparkinsonian patients.” J Clin Neurosci 16(11): 1489-91.
5. Mori, A., H. Nodera, et al. (2009).
”Threshold-dependent effects on peripheral nerve in vivo excitability properties in the rat.” Neurosci Lett.
6. Kamada, M., H. Maruyama, et al. (2009).
”Screening for TARDBP mutations in Japanese familial amyotrophic lateral sclerosis.” J Neurol Sci 284(1-2): 69-71.

2.学会発表 なし

H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

- 1.特許取得 なし
- 2.実用新案登録 なし
- 3.その他 なし

軸索興奮性からみた筋萎縮性側索硬化症の病態：“Split hand”の発現機序

研究分担者 桑原 聡

研究協力者 金井 数明, 渋谷和幹, 三澤園子, 磯瀬沙希里

千葉大学大学院医学研究院神経内科

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症（ALS）では短母指外転筋（APB）と第一背側骨間筋（FDI）が小指外転筋（ADM）に較べて強く萎縮し“split hand syndrome”として知られる。APB 支配軸索と ADM 支配軸索について ALS 患者群と健常対照群で軸索興奮特性を比較したところ、ALS 群では既報の通り Na 電流の低下と K 電流の増大を認めたが、その程度は変性が早く進行する APB 支配軸索でより高度であった。以上より ALS では過剰興奮性を示す神経ほど神経変性の進行が早いことが示された。軸索の過剰興奮性を抑制する薬剤（Na、K チャネル作動薬）は ALS に対する新規治療オプションになり得る可能性が示された。

A.研究目的

筋萎縮性側索硬化症（ALS）では、短母指外転筋（APB）と第一背側骨間筋（FDI）の萎縮が小指外転筋（ADM）の萎縮に比べより目立つという“split hand”を呈する。特に FDI と ADM は髄節・支配神経ともに共通しており、運動神経の内部環境の差異が変性の進行に影響を及ぼしている可能性がある。

昨年我々は健常対照者では APB 支配軸索は ADM 支配軸索に比べ生理学的に興奮性が高いことを報告した。今回、ALS 患者で APB 支配軸索と ADM 支配軸索の軸索興奮性を測定し、これを正常対照者の結果と比較検討することにより、この“split hand”の病態機序を軸索興奮性の面から検討するものとする。

B.研究方法

ALS 患者 14 名および健常対照者 14 名を対象とし、正中神経及び尺骨神経運動軸索の興奮特性を検討し相互に比較した。Strength-duration time constant (SDTC) により持続性 Na⁺コンダクタンスを、Threshold Electrotonus (TE) の脱分極側曲線 (TEd) により fast および Slow K⁺コンダクタンスを、Recovery cycle の supernormality により Fast K⁺コンダクタンス、late subnormality により slow K⁺コンダクタンスを、それぞれ評価した。

倫理面への配慮：学内倫理委員会の承認およびインフォームドコンセントを得て行われた。検査時間は 30 分以内とし、神経刺激に用いる電流強度は最小となるよう配慮を行った。実際に各種電気刺激に対し痛みを訴えた患者はいなかった。

C.研究結果

ALS 患者内で正中神経と尺骨神経を比較した場合には、SDTC 延長、TEd の外側偏倚、supernormality 増大を示した。これらの所見は、健常対照者と ALS 患者ともに正中神経軸索の方が K⁺コンダクタンスが低く持続性 Na⁺コンダクタンスは高いことを示していた。

健常対照者と ALS 患者との比較では、正中神経・尺骨神経ともに ALS 患者において SDTC の延長、TEd の外側への偏倚、supernormality の増大を認め、これらはそれぞれ持続性 Na⁺コンダクタンスの亢進と K⁺コンダクタンスの低下を示すもので、既報告の所見と合致していた。late subnormality については尺骨神経では ALS 患者と健常対照者との間に明確な差を認めなかったのに対し、正中神経では ALS 患者は健常対照者と比べて低下を認め、この結果は slow K⁺コンダクタンスの低下は正中神経でより強いということを示唆するものであった。

D.考察

以上の結果は、ALS では正中・尺骨神経ともに過剰興奮性を伴うような興奮性異常変化が認められるが、生来正中神経の軸索興奮性は生理的に尺骨神経より高いことに加え、軸索の安静時電位の維持に重要な slow K⁺コンダクタンスの低下がより強く生じるなど、ALS で認められる軸索の過剰興奮性/興奮性異常の変化は正中神経でより顕著に生じることを示していた。

ALS の病態仮説には様々なものが提唱されているが、その一つに運動神経の過剰興奮と Ca²⁺流入というものがある。このことをあわせて考えると、ALS で過剰興奮性/興奮性異常が正中神経でより顕著に生じることが、APB 支配運動ニューロンが ADM 支配ニューロンよりも優位に障害されることにつながっている可能性が示唆された。

広範な線維束性収縮 (fasciculation) は ALS に特異的に認められ、運動ニューロン死に関わっている可能性は高い。線維束性収縮は軸索興奮性増大による自発発射により生じることから、Na チャネル阻害剤、K チャネル開口剤などのイオンチャネル作動薬は ALS に対する新規治療オプションとなり得るものと考えられる。

E. 結論

1. 尺骨神経と比較した際の正中神経の興奮性の高さや軸索特性の変化の差異が、ALS 患者で認められる“split hand”の生理学的基盤である可能性が示唆された。

2. さらに、slow K⁺コンダクタンスの低下の程度は正中神経でより高度であり、このことがさらに神経軸索の過剰興奮性を悪化させ、神経変性の進行速度に影響を与えている可能性が示唆された。

3. Na、K チャネル作動薬による神経興奮性の抑制は、ALS に対する新規治療オプションとなる可能性がある。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sonoo M, Kuwabara S, Shimizu T, Komori T, Hirashima F, Inaba A, Hatanaka Y, Misawa S, Kugio Y; Tokyo Metropolitan Neuromuscular Electrodiagnosis Study Group. Utility of trapezius EMG for diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve*. 2009; 39: 63-70.
2. Kanai K, Kuwabara S. Motor nerve hyperexcitability and muscle cramps in Machado-Joseph disease. *Arch Neurol*. 2009; 66: 139
3. Bae JS, Sawai S, Misawa S, Kanai K, Iose S, Kuwabara S. Differences in excitability properties of FDI and ADM motor axons. *Muscle Nerve*. 2009; 39: 350-4.
4. Kanai K, Asahina M, Arai K, Tomiyama H, Kuwabara Y, Uchiyama T, Sekiguchi Y, Funayama M, Kuwabara S, Hattori N, Hattori T. Preserved cardiac (123)I-MIBG uptake and lack of severe autonomic dysfunction in a PARK9 patient. *Mov Disord*. 2009; 24: 1403-4.
5. Kanai K, Yoshida S, Hirose S, Oguni H, Kuwabara S, Sawai S, Hiraga A, Fukuma G, Iwasa H, Kojima T, Kaneko S. Physicochemical property changes of amino acid residues that accompany missense mutations in SCN1A affect epilepsy phenotype severity. *J Med Genet*. 2009; 46: 671-9.
6. Taniguchi J, Sawai S, Mori M, Kubo T, Kanai K, Misawa S, Iose S, Yamashita T, Kuwabara S. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy sera inhibit axonal growth of mouse dorsal root ganglion neurons by activation of Rho-kinase. *Ann Neurol*. 2009;66:694-7.

2. 学会発表

1. Kanai K, Bae JS, Sawai S, Misawa S, Iose S, Kuwabara S. The physiological basis of the split hand syndrome in ALS: an axonal excitability study.

2009 Asian and Oceanian Congress of Clinical Neurophysiology, Seoul.

2. Kanai K, Asahina M, Arai K, Tomiyama H, Kuwabara Y, Uchiyama T, Sekiguchi Y, Funayama M, Kuwabara S, Hattori N, Hattori T. Preserved cardiac ¹²³I-MIBG uptake and lack of severe autonomic dysfunction in a PARK9 patient. 13th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Paris.
3. Kanai K, Yoshida S, Hirose S, Oguni H, Kuwabara S, Sawai S, Hiraga A, Fukuma G, Iwasa H, Kojima T, Kaneko S. Physicochemical property changes of amino acid residues that accompany missense mutations in SCN1A affect epilepsy phenotype severity. 19th World Congress of Neurology, Thai.

H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

- 1.特許取得 なし
- 2.実用新案登録 なし
- 3.その他 なし

大脳皮質変性を伴う神経疾患の臨床像と ^{11}C -フルマゼニル (FMZ)-PET 所見 ～特にALSについて（第3報）

研究分担者 佐々木秀直¹⁾

研究協力者 矢部一郎¹⁾，秋本幸子¹⁾，大槻美佳²⁾，志賀 哲³⁾，玉木長良³⁾

1) 北海道大学大学院医学研究科神経内科学分野，2) 北海道医療大学心理科学部，
3) 北海道大学大学院医学研究科核医学分野

研究要旨： ^{11}C -フルマゼニル (FMZ)-PET を用いて、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 患者の臨床症状と大脳皮質病変の相関について検討を行った。その結果、ALS 全例で側頭葉内側のベンゾジアゼピン (BZ) 受容体結合能低下を認めた。また、嚥下障害や軽度の認知障害のある群では前部前頭葉に BZ 受容体結合能低下傾向を認めた。ALS 患者に認められる書字障害について、文法の誤りと文字の誤りの各々について PET 所見との相関を検討した結果、文法の誤りは右中前頭回に、文字の誤りは前部帯状回と左中前頭回において、BZ 受容体結合能と書字施行時の誤記率が相関していた。この結果は、ALS における文法の誤りと文字の誤りが異なる機序に起因している可能性を示唆している。

A. 研究目的と背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) では一部の患者で非流暢性失語と鑑別の難しい構音障害を呈し、特徴的な書字障害をきたす例がある。これらの点に注目して、我々は一連の検討を行い、偽性球麻痺を伴うALS患者群において左弁蓋部を伴う前頭葉においてび漫性に脳ベンゾジアゼピン (BZ) 受容体結合能低下を認めることと、臨床病型に関わらずALS全例で、側頭葉極～内側にかけてBZ結合能の低下を認めること、ALSの書字障害の重症度と

前部帯状回におけるBZ受容体結合能が相関している可能性があることを報告した。今回、更に詳細に臨床症状とBZ受容体結合能の相関を検討することを目的に本研究を行った。

B. 研究方法および対象

フルマゼニルはBZ受容体と結合する競合的薬剤として市販されており、 ^{11}C 標識フルマゼニルを用いることで、大脳皮質神経細胞の密度を明らかにすること、即ち神経細胞変性脱落の有無を評価することが可能である。PET は Siemens EXACT HR+を用い ^{11}C フルマゼニル

370MBqを静注後、60分間ダイナミック収集し、結合能を reference tissue method で算出した。

対象は脳血管障害や脳炎など、他の神経疾患が否定された ALS 10 例{偽性球麻痺 4 例、全例レーブン色彩マトリックステスト(RCPM) ±2SD 以下以内}である。

評価項目は、1)嚥下障害の有無、2)RCPM - SD 以下程度の認知障害の有無、3)trail making test (TMT), 4)frontal assessment battery (FAB), 5)paced auditory serial addition test (PASAT), 6)書字障害(文字の誤りと文法の誤り)である。

嚥下障害の有無と軽度認知障害の有無の項目については、正常群と異常群の二群に分類し、SPM5 を用い比較検討することにより統計学的に有意に障害されている大脳皮質領域を検討した。他の評価項目については、大脳皮質領域の BZ 受容体結合能 と該当評価項目の重症度との相関につき統計学的に検討した。

(倫理面での配慮)

本研究については、北海道大学医学研究科医の倫理委員会の承認を得た。対象者には研究の趣旨を文書で説明し、文書にて同意を得た。

C. 研究結果

今回の対象 ALS 例においても全例で側頭葉内側の BZ 受容体結合能が低下していた。嚥下障害群では前部前頭葉に BP 低下を認めた ($p < 0.05$ uncorrected)。また、軽度認知障害を伴う群でも前部前頭葉に BZ 受容体結合能低下

を認めた ($p < 0.05$ uncorrected)。TMT, FAB, PASAT の評価点と BZ 受容体結合能が逆相関する領域は認められなかった。

書字障害においては、文法の誤りについては、その誤る率と右中前頭回の BZ 受容体結合能結合能が相関していた ($p < 0.05$ uncorrected)。また、文字の誤りについては、その誤る率が左中前頭回と前部帯状回の BZ 受容体結合能と相関していた ($p < 0.05$ uncorrected)。

D. 考察

ALS 全例で ^{11}C -FMZ-PET 検査にて、側頭葉内側病変が存在した。これについては、今後更に多数例での検討が必要である。また、認知障害と嚥下障害において、前部前頭葉の BZ 受容体結合能の低下を認めた。認知障害については、既に ALS の認知障害が前頭葉機能低下に起因するとする報告があり、それに合致する。一方、嚥下障害との関連については現時点で不明である。今回は詳細に前頭葉機能を検討するため、TMT, FAB, PASAT などの前頭葉機能を反映する指標について解析したが、いずれにおいても BZ 受容体結合能との相関を認めなかった。

書字障害のうち文法の誤りについては、右中前頭回と、文字の誤りについては、左中前頭回と前部帯状回の BZ 受容体結合能低下とそれぞれの重症度は弱く相関していた。前部帯状回については病理学的も機能画像的にも ALS で障害を認める領域であることは既に報

告されている。また、この領域の障害により apathy や akinetic mutism を発症することや注意障害が起こること知られている。また、中前頭回についてはワーキングメモリーとの関連が知られている。しかし、これらは統計学的にはいずれも弱い相関であった。解析症例数増も含め、確定的な結論を得るためには今後更なる検討が必要である。

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

E. 結論

1. ALS 全例で、側頭葉内側に BZ 受容体結合能の低下を認めた。
2. ALS の嚥下障害や認知障害には、前部前頭葉が関与している可能性がある。
3. 書字障害においては、文法の誤りには右中前頭回が、文字の誤りには前部帯状回と左中前頭回が、それぞれ関与している可能性がある。

F. 研究発表

1. 学会発表

- 1) 秋本幸子, 濱田晋輔, 大槻美佳, 田村至, 矢部一郎, 濱田毅, 佐々木秀直. 筋萎縮性側索硬化症の高次脳機能クリーニング, 第 50 回日本神経学会総会, 仙台, 2009 年 5 月 20~22 日
- 2) Akimoto S, Hamada S, Yabe I, Otsuki M, Sasaki H. Writing errors in Japanese ALS, 20th International Symposium on ALS/MND, Berlin, 12/8-12/10, 2009
- 3) Yabe I, Shiga T, Tsuji-Akimoto S, Kuge Y, Tamaki N, Sasaki H. 11C-FMZ PET study in ALS. 19th World Congress of Neurology, Bangkok, Thailand, 10/24-10/30 2009

G. 知的財産の出願・登録状況(予定を含む)

SOD1 変異 ALS マウスにおける変異部位特異的免疫治療

研究分担者 中島健二
研究協力者 渡辺保裕, 北山通朗, 土井浩二, 安井建一, 中野俊也

鳥取大学医学部脳神経内科

神経変性疾患において疾患関連蛋白に対する免疫療法が凝集体形成に効果を及ぼし、病態の改善を示すことが報告されている。今回我々は、変異 Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) に特異的な免疫治療の効果をモデルマウスにおいて検討した。2 塩基欠失 ALS マウス (DF) は、変異 SOD1 内にフレームシフト変異後の 5 アミノ酸 (GQRWK) とそれに続く C 末端の FLAG 配列 (DYKDDDDK) の変異特異的な配列を持つ。これら 2 つの特異配列による免疫の治療効果をと対照との間で検討した。

FLAG 免疫の検討では、対照と比して臨床項目に有意な変化は認めず、FLAG に対する抗体価の上昇も得られなかった。GQRWK 免疫群では有意な体重減少抑制効果と、各臨床項目の改善傾向が認められた。GQRWK 免疫マウス血清は免疫ペプチドに対する抗体価の上昇を認め、二重染色法により変異型 SOD1 を認識した。本検討により免疫治療は DF マウスにおいても一定の効果がある可能性が示された。

A. 研究目的

遺伝性および孤発性の神経変性疾患において、それぞれに特異的な神経細胞内・外、核内の凝集体形成が認められる。これらの凝集体は原因遺伝子がコードする蛋白または疾患に強い関連を有する蛋白を含み、病態との密接な関わりが示唆されている。原因蛋白に対するワクチン免疫療法が、中枢神経での凝集体形成に効果を及ぼし病態の改善を示しうることがアルツハイマー病において最初に示され¹⁾、後に筋萎縮性側索硬化症モデルマウスでも報告されている²⁾。

我々が作製した 2 塩基欠失 ALS マウス³⁾は導入した Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) の C 末端側のアミノ酸がフレームシフト変異のため野生型とは一致せず、変異 SOD1 特異的な免疫の効果を検討するのに有用である。今回、このマウスを用いて 2 種類の変異部位特異的な免疫治療の効果を検討した。

B. 研究方法

2 塩基欠失 ALS マウス (DF) は、変異 SOD1 内にフレームシフト変異後の 5 アミノ酸 (GQRWK) とそれに続く

く C 末端の FLAG 配列 (DYKDDDDK) の特異的な配列を持つ。3×FLAG 配列による免疫群、もしくは 5 アミノ酸を含む KLH-CADDGQRWK による免疫群の治療効果を、対照群との間で比較検討した。免疫は週齢 8, 10, 12, 17 において、50 μg のペプチド、Freund アジュバントとともに腹腔内投与した。

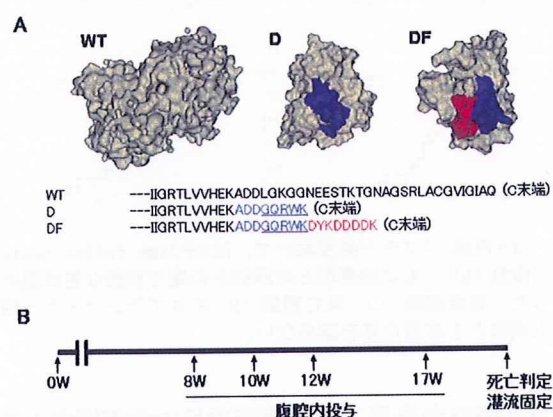


図 1A ヒト野生型 SOD1 (WT), SOD1^{L126delIT1} (D), FLAG 付加 SOD1^{L126delIT1} (DF) の立体構造および C 末端の領域のアミノ酸配列。D, DF において、青字がペプチド合成した部位、下線部が特異配列を示す。DF において 3×FLAG は赤字で示している。
図 1B 8 週に Freund's complete adjuvant とともに初回免疫、10, 12, 17 週に追加免疫 (Freund's incomplete adjuvant) を行った。

治療効果判定は、発症・死亡齢、体重、hind-limb reflex score を 12 週齢以降に毎週施行した。定義した臨床的死亡時に血清を採取し、その後に脊髄と肝臓を 4% paraformaldehyde で灌流固定した。

治療効果判定は、発症・死亡齢、体重、hind-limb reflex score を 12 週齢以降に毎週施行した。定義した臨床的死亡時に血清を採取し、その後に脊髄と肝臓を 4% paraformaldehyde で灌流固定した。

統計解析は SPSS for windows および StatView を使用した。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験および動物の取り扱いに関しては、鳥取大学動物実験委員会の承認（承認番号：08-Y-26）を得て、これを遵守して行った。

C. 研究結果

FLAG 免疫の検討で、治療群は対照と比して臨床項目に有意な変化は認めなかった（図 2）。FLAG に対する抗体価の有意な上昇も認められず（図 3）、有意な免疫反応が得られていないと考えられた。

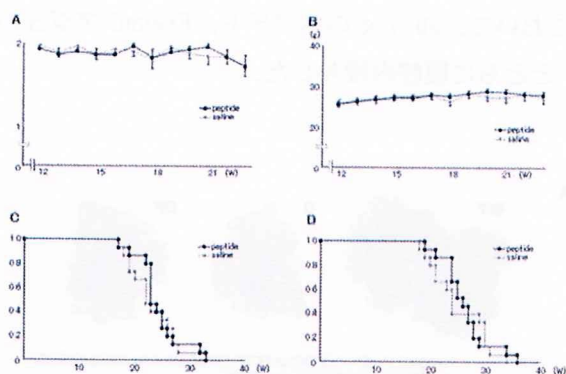


図 2 3×FLAG ペプチド免疫において、hind-limb reflex score (A)、体重 (B) ともに治療群と対照群との間で有意な差は認めなかった。発症週齢 (C)、死亡週齢 (D) の Kaplan-Meier 解析でも両群とも有意な差を認めない。

他方、GQRWK 免疫群では各臨床項目の改善傾向と有意な体重維持効果が認められた（図 4）。マウス血清は免疫ペプチドに対する抗体価の上昇を認め（図 3）、二重染色法により 2 塩基欠失型 SOD1 を認識していることが示された（図 5）。免疫治療による変異蛋白の

増減に関しては、脊髄、肝臓とも明瞭な差異は認められなかった（データ未呈示）。

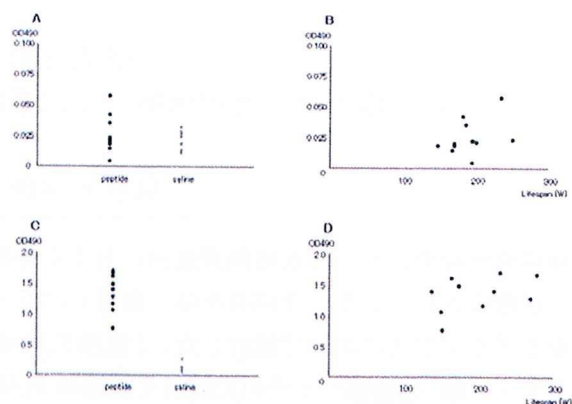


図 3 FLAG 免疫群は対照と比べ有意な抗体価の上昇を認めず (A)、FLAG 抗体価と生存期間にも相関を認めなかった (B)。GQRWK 免疫群において、全例で抗体価の上昇を認めた (C) が、抗体価と生存期間に有意な相関は認めなかった (D)。

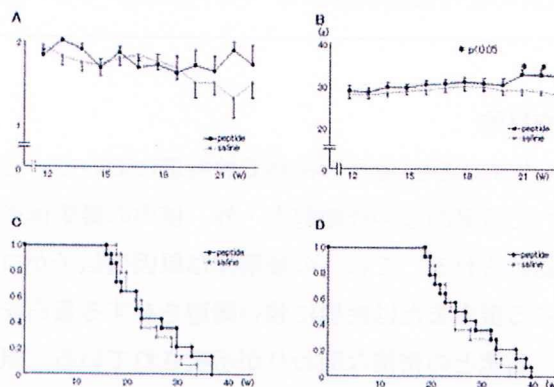


図 4 GQRWK 免疫において、hind-limb reflex score (A)、体重 (B) ともに治療群が対照群とくらべ有意な傾向をしめし、21、22 週において両群間に有意差を認めた。発症週齢 (C) ともに死亡週齢 (D) 治療群で有効な傾向が認められたが、両群に有意な差を認めなかった。

D. 考察

血液脳関門により末梢から隔離された中枢神経において免疫治療が有効である機序には不明な点が多い。SOD1 変異を有する ALS モデル動物において免疫治療が効果を発揮する有力な機序として、変異 SOD1 の細胞外分泌仮説が挙げられている²⁾。

本研究の目的と意義として、単に先行研究²⁾と異なる変異 SOD1 モデル動物と異なる抗原での追試のみならず、以下のことが挙げられる。①本変異によるフレームシフト部位は変異 SOD1 に特異的であり、

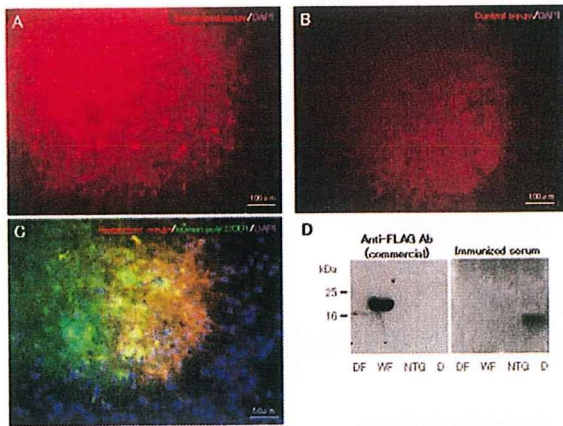


図5 GQRWK免疫における免疫組織化学的検討では、GQRWK免疫の血清はDFマウスの脊髄において運動ニューロンと考えられる大型の細胞をよく認識した(A)が、対照血清では染色性は認められなかった(B)。GQRWK免疫の染色性は市販の抗SOD1ポリクローナル抗体の染色性とよく合致した(C)。DF, WF, D, 野性型(NTG)マウス脊髄ホモジェネートをサンプルとしたイムノブロットでは、市販抗FLAG抗体では、FLAGを付加したDF, WFを認識した(D左)、GQRWK免疫の血清はDを認識したものの、DFは認識しなかった。これはDとDFの構造の差異による抗原性の違いに起因すると考えられた。

野性型SOD1に影響を及ぼすことなく変異SOD1に対する免疫治療の効果を検討できる。②野性型と変異型のSOD1を区別する抗体が存在するため(市販の抗FLAG抗体、本研究で得られた抗GQRWK抗体ほか)、病理学的解析に有用である。③最も重要な点として、ペプチド合成抗原をもちいた免疫治療であり(かつ理論的に野性型のSOD1に影響を及ぼさないため)、動物モデルにおける有用性を実際に本変異を有する患者さんへの応用へ繋げるためのハードルが比較的低いと考えられる。点が挙げられる。

実際に本検討では免疫治療が体重減少の抑制として効果を示し、発症や生存に関しても好ましい傾向が認められた。このような変異部位特異的な免疫治療は、幾つかのフレームシフトをきたす変異⁴⁾に対しては同様に有効な可能性があると考えられた。

E. 結論

本検討の結果は、先行研究でのG93Aマウスの結果と類似する²⁾ものであり、免疫療法は進行の比較的早いDFマウスにおいても一定の効果がある可能性を示している。一方、免疫治療が効果を発揮する機序に関しては不明な点が多く今後の解析が待たれる。

F. 文献

- 1) Shenk D, et al. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400: 173-177, 1999.
- 2) Urushitani M, et al. Therapeutic effects of immunization with mutant superoxide dismutase in mice models of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 2495-2500, 2007.
- 3) Watanabe Y, et al. Mouse motor neuron disease caused by truncated SOD1 with or without C-terminal modification. *Brain Res Mol Brain Res* 135: 12-20, 2005.
- 4) Watanabe Y, et al. Frameshift, nonsense and non amino acid altering mutations in SOD1 in familial ALS: report of a Japanese pedigree and literature review. *ALS and other motor neuron disorders* 1, 251-258, 2000.

G. 健康危険情報

なし

H. 研究発表

1. 論文発表

未発表

2. 学会発表

未発表

I. 知的所有権の取得状況(予定を含む)

1. 特許取得

申請中

「エクソン5において2塩基欠失を有するSOD1遺伝子を導入した、遺伝子導入非ヒト動物」

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし