

showed electrophysiological and behavioral properties expected of neurons from the midbrain in a rat model of PD (Chung et al., 2006; Kim et al., 2002; Rodriguez-Gomez et al., 2007). Survival of DA neurons obtained in vitro from primate ES cells was also reported in primate hosts (Sanchez-Pernaute et al., 2005; Takagi et al., 2005), but the dopaminergic function of these cells in the primate brain has not been fully evaluated.

Positron emission tomography (PET) is a valuable method for imaging altered DA function in PD. The most common tracer used to visualize and assess the integrity of DA presynaptic systems is 6- ^{18}F fluoro-L-4-dihydroxyphenylalanine (^{18}F FDOPA), a fluoro-analog of 4-dihydroxyphenylalanine (L-dopa). However, uptake of this agent is increased in variable conditions such as inflammation and tumor formation, and assessment of graft function using only this ligand is difficult. The present study therefore used PET with multitracers to analyze both presynaptic and postsynaptic dopaminergic functions and found that transplantation of neural stem cells (NSCs) induced from primate ES cells restored DA function in a primate model of PD.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and differentiation

Astrocyte-conditioned medium (ACM) was prepared by culturing astrocytes obtained from mouse fetal cerebra (Inoue et al., 1988) in DMEM/F12 medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) containing N2 supplement (Invitrogen). The CMK6 cynomolgus monkey ES cell line (Suemori et al., 2001) was seeded at a clonal density and grown on a mitomycin C-treated mouse embryonic fibroblast feeder layer in DMEM/F12 medium (Invitrogen) supplemented with 1000 U/ml leukemia inhibitory factor (Chemicon, Temecula, CA), 1 mM β -mercaptoethanol (Invitrogen), and 15% knockout serum replacement (Invitrogen). Colonies of undifferentiated ES cells with a diameter of 300–500 μm and grown for 7–9 days were treated with 0.1% collagenase for 5 min and then detached whole using a glass capillary. Colonies were transferred to nonadhesive bacteriological dishes in ACM supplemented with 20 ng/ml of recombinant human fibroblast growth factor (FGF)-2 (R&D Systems, Minneapolis, MN) and 20 ng/ml of recombinant epidermal growth factor (EGF) (R&D Systems). Colonies were cultured for 10 days, giving rise to floating spheres comprising numerous NSCs. To stimulate proliferation, these spheres were plated onto Matrigel-coated dishes and cultivated for up to 10 days in Neurobasal medium (Invitrogen) supplemented with 2% B-27 (Invitrogen), 20 ng/ml of FGF-2, and 20 ng/ml of EGF. To efficiently induce DA-synthesizing neurons, the medium was replaced with ACM supplemented with 50 ng/ml of sonic hedgehog (Shh; R&D Systems) 1 day before transplantation.

Animals and neurotoxin treatment

All experiments were performed in full compliance with the requirements of the institutional animal care and use committee. Two cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*), M-1 and M-2, weighing 2.3–2.5 kg were used for the cell therapy experiments. The monkeys were housed under standard conditions of humidity and dark/light cycles with ad libitum access to food and water. To create bilateral striatal lesions, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP, 0.2–0.4 mg/kg of free base; Sigma-Aldrich Japan K.K., Tokyo, Japan) in phosphate-buffered saline (PBS) was injected intravenously once per week over a 4-month period until a stable parkinsonian syndrome was observed. The total dose of MPTP administered was 1.5 and 2.95 mg/kg. To avoid the possibility of spontaneous recovery from the effects of MPTP, which could mimic the behavioral effect of cell transplantation, the monkeys were allowed to recover for 2 months after the last MPTP treatment.

Transplantation procedures

All surgical procedures were performed in an aseptic environment with the monkeys under isoflurane (1–2%) anesthesia. The head was placed in a stereotaxic device (Kopf Instruments, Tujunga, CA). Each monkey received nine injections of NSCs derived from cynomolgus monkey ES cells (M-1, 1×10^5 viable cells; M-2, 2×10^7 viable cells) in three tracts in the left putamen. NSCs were trypsinized and resuspended in 72 μl of ACM supplemented with Shh. Eight microliters of NSC suspension was injected into each of the nine points using a 50- μl Hamilton microsyringe fitted with a 26-gauge needle over a period of 5 min. The needle was left in place for an additional 3 min to prevent the loss of cells by backflow. As a control, 25 μl of ACM supplemented with Shh was injected into the right putamen. Stereotaxic coordinates of injection sites in the putamen were: Track 1, anterior 13.4 mm, lateral 12 mm, depth +19, 17, 15 mm from the midpoint of the ear bar; Track 2, anterior 16.4 mm, lateral 11.5 mm, depth +20, 18, 16 mm; and Track 3, anterior 18.1 mm, lateral 11 mm, depth +19, 17, 15 mm. From 3 days before surgery, the monkeys received daily intramuscular injections of 0.5 mg/kg of the immunosuppressant FK506 (Astellas Pharmaceuticals, Osaka, Japan) diluted in physiological saline. From 5 days after surgery, the dose was reduced to 0.2 mg/kg for the rest of the experimental period.

PET

Magnetic resonance imaging (MRI) of both monkeys was performed at the National Institute for Physiological Sciences using a 3.0-T imager (Allegra; Sie-

mens, Erlangen, Germany) under pentobarbital anesthesia. Stereotaxic coordinates of PET and MRI were adjusted based on the orbitomeatal (OM) plane with a specially designed head holder. Syntheses of [^{11}C]-labeled-compounds have been described (Tsukada et al., 2000a,b). Data were collected on a high-resolution animal PET scanner (SHR-7700; Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) with a transaxial resolution of 2.6 mm full-width at half-maximum and a center-to-center distance of 3.6 mm (Watanabe et al., 1997). The PET camera allowed 31 slices to be recorded simultaneously. After fasting overnight, the monkey under isoflurane anesthesia was secured to a monkey head folder with stereotaxic coordinates aligned parallel to the OM plane. Each of the [^{11}C]-labeled compounds was delivered through a posterior tibial vein cannula. PET with [^{11}C]L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-[^{11}C]DOPA), the precursor of DA synthesis, and [^{11}C]raclopride, a reversible D_2 receptor antagonist, were performed for a total of 64 min with 6 time frames at 10 sec intervals and 12 time frames at 1 min, followed by 16 time frames at 3 min. PET with [^{11}C]2 β -carbomethoxy-3 β -(4-fluorophenyl)-tropane ([^{11}C] β -CFT) was performed with an additional 19 time frames at 3 min for a total of 91 min. To measure DA release in the striatum indirectly in vivo as reflected by reductions in DA receptor availability, [^{11}C]raclopride was injected through the cannula 30 min after administration of either 0.5 mg/kg of amphetamine or saline. Time-activity curves of each labeled compound in regions of interest chosen from magnetic resonance images were obtained.

For quantification of in vivo binding of [^{11}C]raclopride and [^{11}C] β -CFT, a kinetic 3-compartment analysis method was applied as previously described (Huang et al., 1986). The time-activity curves of plasma and of each region were fitted to a 3-compartment model using the least-squares method. Binding potentials of [^{11}C]raclopride and [^{11}C] β -CFT were calculated by determining the ratio of the estimated k_3 value (association rate) to the estimated k_4 value (dissociation rate). For quantification of L-[^{11}C]DOPA utilization rate constant in the striatum of the monkey brain, a graphical analysis method was applied to calculate DA synthesis rate (k_3) as described previously (Tsukada et al., 2000a,b).

Behavioral assessment

Animals were clinically evaluated twice a week using a primate parkinsonism rating scale (PPRS) and activities were recorded on digital videotape. The PPRS is based on the Unified Parkinson's Disease Rating Scale, but was developed specifically for non-human primates (Jenner, 2000). On PPRS, scores from 0 (normal) to 4 (maximal disability) are given for each of the six following parkinsonian features:

spatial hypokinesia in movements around the cage, bradykinesia, manual dexterity of the right arm, manual dexterity of the left arm, balance, and freezing.

Immunocyto- and immunohistochemistry

Cells cultured on coverslips were fixed with 4% paraformaldehyde in 0.1 M PBS (pH 7.2) for 20 min at 4°C. Cells were then treated with 10% normal horse serum, 2% bovine albumin, and 0.2% Triton X-100 in 0.1 M PBS (pH 7.2) for 20 min at room temperature and incubated further in the presence of the following antibodies separately: nestin (1:200, Chemicon); high-molecular-mass neurofilament protein (NF-H) (1:500, Chemicon); glial fibrillary acidic protein (GFAP) (1:200, Chemicon); O4 (1:200, Chemicon); tyrosine hydroxylase (TH) (1:500, Chemicon); aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC) (1:200, Sigma); DA transporter (DAT) (1:200, Chemicon); choline acetyl transferase (ChAT) (1:500 Chemicon); serotonin (5HT) (1:1000, Sigma); and glutamic acid decarboxylase (GAD) (1:1000, Sigma). Cells were washed and then incubated in Alexa Fluor 488- and Alexa Fluor 594-labeled secondary antibodies (1:200; Molecular Probes, Eugene, OR). Cells were mounted in Vectashield containing 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Vector Laboratories, Burlingame, CA) and analyzed under a fluorescence microscope (Eclipse E800; Nikon, Tokyo, Japan) equipped with phase-contrast optics or under a confocal laser-scanning microscope (LSM 510; Carl Zeiss Microimaging Co., Tokyo, Japan). Quantitative immunocytochemical data obtained from 4 to 9 cultures are expressed as mean \pm standard error of the mean.

Under deep anesthesia, monkeys were perfused with 4% paraformaldehyde through the ascending aorta. The brains were removed and cut into several blocks 5-mm thick. These blocks were postfixed in the same fixative, left for 3 days in PBS containing 30% sucrose, and then cut on a cryostat into coronal sections 30- μm thick. Sections were treated with 0.3% H_2O_2 for 15 min to inhibit endogenous peroxidase. Sections were incubated at 4°C for 2 days in PBS containing 0.3% Triton X-100 and primary antibodies against mouse monoclonal anti-TH antibody (1:8000; Immnostar, Hudson, WI). Next, sections were incubated in biotinylated antimouse immunoglobulin (IgG) (1:1000; Vector Laboratories) for 1 h at room temperature, and finally in avidin-biotin-peroxidase complex (1:50; Vector Laboratories) for 30 min at room temperature. Peroxidase activity was revealed in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.6) containing 0.0004% H_2O_2 and 0.01% 3,3'-diaminobenzidine-4HCl (DAB) (all from Vector Laboratories). For immunofluorescence staining, sections were incubated with mouse monoclonal anti-TH antibody (1:800; Immnostar), rabbit anti-5HT antibody (1:2500; Incstar,

Stillwater, MN), or anti-Ki 67 antibody (1:200; Chemicon) followed by incubation with Alexa Fluor 594-conjugated goat antimouse IgG (1:1000; Molecular Probes). Immunoreactivity was assessed and viewed under confocal laser scanning microscopy (TCS NT; Leica Microsystems, Tokyo, Japan). We estimated TH-immunoreactive (IR) cell counts in serial sections (every 10th) under $\times 63$ magnification on a Zeiss microscope equipped with a video camera.

RESULTS

Efficient induction of DA neurons in culture

A colony of undifferentiated ES cells formed spheres with unique concentric stratiform structure when cultivated in ACM supplemented with FGF-2 and EGF under free-floating conditions, as reported previously (Nakayama et al., 2003, 2004). These spheres displayed peripheral NSCs with a center of proliferating ES cells. Subsequent culture on an adhesive substrate formed circular clusters of cells from which many nestin-positive NSCs migrated. After a few passages, almost all cells expressed nestin ($99.5\% \pm 0.5\%$) and only a few cells ($<0.5\%$) expressed NF-H. To examine differentiation properties *in vitro*, a small fraction of NSCs were grown in ACM with Shh. After 5 days, cells in culture displayed a neuronal appearance with long neuritis and became positive for NF-H ($99.5\% \pm 0.5\%$). Cells were immunoreactive for neither antibody against the astrocyte marker GFAP nor the antibody against oligodendrocyte protein O4 (data not shown). Moreover, many ($70\% \pm 1\%$) NF-H-positive cells expressed DA neuronal markers such as TH, AADC, and DAT (Fig. 1). Small proportions of NF-H-positive cells expressed either 5HT ($12.2\% \pm 1.3\%$), ChAT ($1.0\% \pm 0.6\%$), or GAD ($11.9\% \pm 1.6\%$).

DA production is restored in the grafted putamen

We used PET to assess nigrostriatal dopaminergic function in MPTP-treated monkeys before and after NSC implantation. MPTP-intoxicated monkeys displayed comprehensive loss of uptake for L-[β - ^{11}C]DOPA, a substrate for AADC, and [^{11}C] β -CFT, a DA transporter ligand, in both hemispheres of the brain before transplantation, suggesting severe loss of DA terminals (Figs. 2A and 2B). At 4 weeks postoperatively, we found increases in both L-[β - ^{11}C]DOPA and [^{11}C] β -CFT uptake in the grafted putamen. Quantitative analysis of scans at 4 weeks after implantation revealed significant increases in both L-[β - ^{11}C]DOPA uptake (M-1, 41%; M-2, 61%) and [^{11}C] β -CFT uptake (M-1, 33%; M-2, 36%) in the implanted striatum compared with the control putamen (Figs. 2C and 2D). The degree of decrease in striatal radioactivity from [^{11}C]raclopride after amphetamine challenge in M-2 was significantly higher in the grafted putamen (16%)

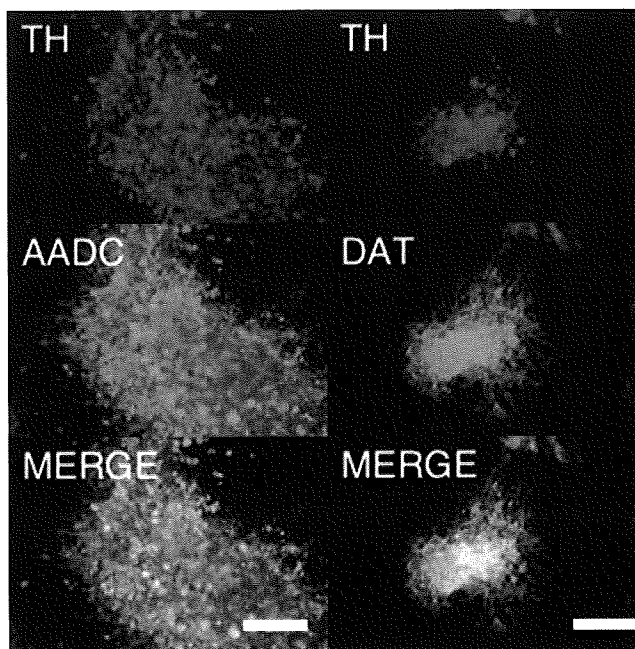


Fig. 1. Neurons derived from ES cells show markers of DA-synthesizing cells. Dual labeling with antityrosine hydroxylase (TH) and antiaromatic L-amino acid decarboxylase (AADC) antibodies shows coexpression of dopamine (DA)-synthesizing enzymes in the neurons. Dual labeling with anti-TH and anti-DA transporter (DAT) antibodies indicates the DA phenotype. Scale bar: 50 μm .

than in the control putamen (0.6%), indicating increased release of DA in the striatum (Fig. 3).

Behavioral recovery is modest

After chronic administration of MPTP, monkeys developed bilateral parkinsonism manifested by a loss of spontaneous motor activity, bradykinesia, impairment of manual dexterity, tremor, and freezing. Parkinsonian features were stable for 2 months from the last MPTP treatment. Three months after unilateral cell transplantation into the putamen, both monkeys showed modest behavioral improvements demonstrated by both PPRS and systematic analysis of digital videotapes. Before MPTP treatment, both monkeys scored 0 on PPRS. After MPTP, but before implantation, mean scores of four evaluations on the PPRS were 14 for M-1 and 12 for M-2. At 12 weeks after implantation, this score reduced to 11 and 10, respectively. In M-2, the score remained constant during the observation period until 6 months after implantation. Regardless of on- or off-medication, no dyskinesia was observed.

Grafted cells differentiate into TH-positive cells in the brain

Histological assessment of brains was performed for M-1 and M-2 at 3 and 6 months after implantation,

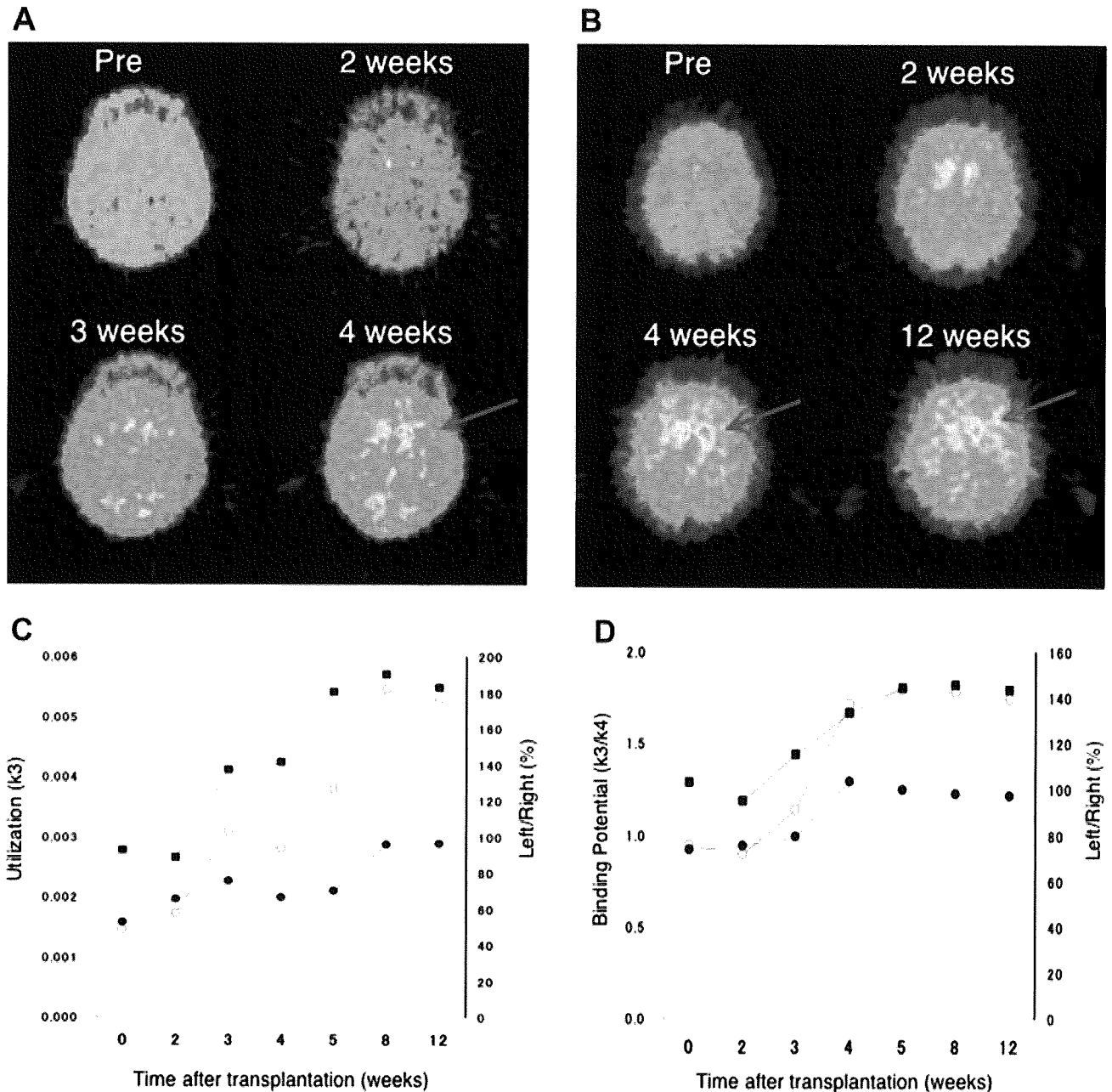


Fig. 2. (A, B) PET images of L-[β-11C]DOPA (A) and [11C]β-CFT (B) uptake in monkey M-1 before and after cell transplantation. Four weeks after implantation, increased radionuclide uptake was detected in the implanted putamen (arrows). (C, D) Graphic representation of relative changes in signal strength over time in the

same animal, showing significant increases in L-[β-11C]DOPA utilization (k_3 value) (C) and [11C]β-CFT binding potential (BP) (k_3/k_4 value) (D) in the implanted (left: open circles) putamen compared with control (right: filled circles) putamen. Filled squares indicate left to right ratio.

respectively. Many TH-IR cells, about 1000 in M-1 and 3000 in M-2, thrived in the grafted putamen (Fig. 4). Less than 50 TH-IR cells were found in the putamen on the side contralateral to the graft. A small number of 5HT-IR cells was identified in the grafted putamen (<5 cells). No TH-positive cells were positive for the proliferation marker Ki-67. Hematoxylin and eosin staining showed no signs of teratoma-like structures in the transplanted putamen.

DISCUSSION

This study demonstrated with PET that engraftment of NSCs derived from primate ES cells has the capacity to restore DA function in a primate model of PD. Transplantation of neural precursors has become one of the key strategies for cell replacement in the brain. To bypass the shortage of donor tissue, a wide range of experimental approaches have been studied, including proliferation of NSCs in vitro stimulated by

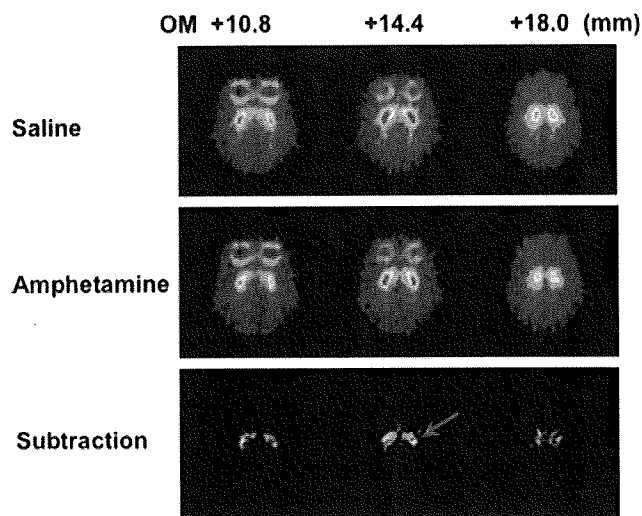


Fig. 3. Drug-induced release of DA in the grafted striatum 12 weeks after transplantation in monkey M-2. After methamphetamine administration, [^{11}C]raclopride binding in the implanted putamen was significantly reduced compared with that in the control putamen. Each slice image after methamphetamine infusion (middle row) was subtracted from a corresponding baseline image (upper row). Subtraction images (lower row). The images of each column are in horizontal plane and same stereotaxic coordinates (mm) from the orbitomeatal (OM) line. Arrows indicate the side of the implant.

mitogen treatment, ex vivo introduction of growth stimulating oncogenes, xenotransplantation, enhancement of endogenous adult neurogenesis, and attempts to recruit non-neural adult stem cells from other tissues (Hall et al., 2007; Liu, 2008). However, in addition to the limited plasticity and slow propagation of adult stem cells, continuous expression of oncogenes or stimulation of mitogens raises question about the long-term safety of these strategies. Of the various candidate donor cells, ES cells are the most attractive due to the characteristics of pluripotency and the potential for unlimited self-renewal. Although human ES cells seem promising for clinical applications, an alternative model system based on ES cells derived from nonhuman primates is necessary for preclinical studies, including allogenic transplantation.

The present study used cynomolgus monkey ES cells that resemble human ES cells but are distinct from murine ES cells in terms of morphology, expression of surface markers and feeder- and leukemia inhibitory factor-dependence, among other factors (Sue-mori et al., 2001). We have previously shown that astrocyte-derived factors instruct mouse and primate ES cells to differentiate into neurons quickly and efficiently (Nakayama et al., 2003, 2004). This ACM method is superior to previous methods in terms of simplicity, efficiency, and productivity of neural differentiation. The number of cells was increased 1000-fold, along with differentiation from ES cells into NSCs. NSCs can be highly purified without using ei-

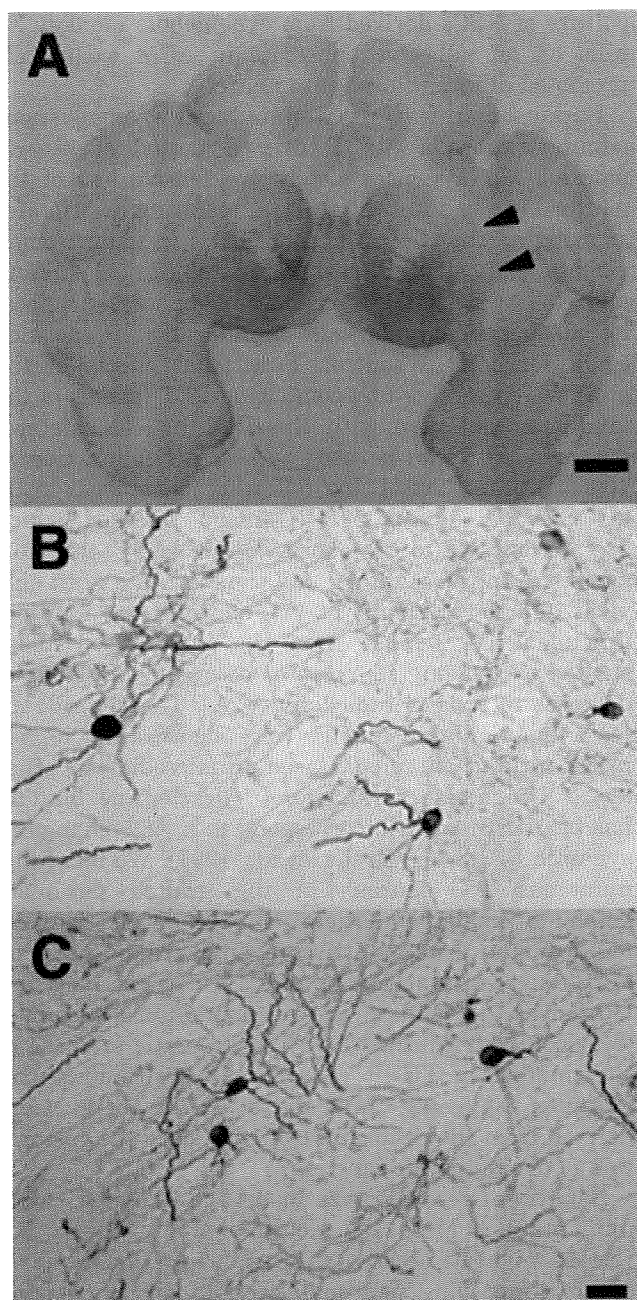


Fig. 4. TH-IR cells in the unilateral putamen of monkey M-1 at 3 months after cell implantation. (A) Restoration of TH-IR in the implanted putamen (arrowhead) is not obvious at low magnification. However, TH-IR neurons are apparent in dorsal (B) and ventral (C) portions of the implanted putamen. Scale bar: 0.5 cm (A); 20 μm (B, C).

ther magnetic- or fluorescence-activated cell sorting, and incorporation of undifferentiated ES cells is virtually eliminated. Although low doses of undifferentiated mouse ES cells transplanted into rat striatum developed into fully differentiated DA neurons (Bjorklund et al., 2002), elimination of undifferentiated ES cells is crucial for reducing the risk of tumor formation. Consistent with our previous observations,

culture of NSCs derived from cynomolgus monkey ES cells on an adhesive substrate in ACM exclusively promoted differentiation into neurons.

Parkinsonian features were induced by intravenous administration of MPTP over a period of several months. MPTP causes slowly progressive loss of DA neurons in the substantia nigra, resulting in primates showing all the clinical signs of PD, including tremor, rigidity, akinesia, and postural instability (Wichmann and DeLong, 2003). We created bilateral striatal lesions but implanted cells unilaterally, so one side could serve as a control. Functional effects of the graft were evaluated by comparing PET images of the implanted putamen with those of the contralateral putamen. PET can be used to assess DA function in vivo (Brooks, 2004) by following increases in L-[β - ^{11}C]DOPA uptake or [^{11}C] β -CFT binding, which are attributable to the expression of AADC and storage of DA in the putamen and thus indicate graft survival and development of DA neurons. In addition, functional DA release from the graft was demonstrated by imaging D₂ receptor occupancy. Degrees of decrease in striatal radioactivity of [^{11}C]raclopride after amphetamine challenge were significantly higher in the grafted putamen. Based on microdialysis studies, a 1% change in striatal [^{11}C]raclopride binding has been estimated to correspond to a $\geq 8\%$ change in synaptic DA levels (Breier et al., 1997). We identified numerous TH neurons in the grafted putamen. Although small populations of TH neurons may be found in the primate striatum after creating lesions of the nigrostriatal dopaminergic pathways, most are located in the caudate and precommissural putamen (Mazloom and Smith, 2006). The dramatic increase in the number of TH-IR cells in the postcommissural putamen suggests that these TH-IR cells were derived from the graft and contributed to the restoration of dopaminergic function.

Behavioral recovery was modest at 12 weeks after implantation. More DA neurons and synaptic DA release might be necessary for apparent behavioral recovery. Improving neuronal survival and increasing axonal outgrowth would possibly improve the magnitude of the response to grafting. In this regard, the combination of cell replacement and neuroprotective strategies by gene delivery may be effective in preventing the loss of endogenous and grafted NSCs. Another possible explanation for incomplete behavioral recovery is that functional integration of DA neurons with the host circuitry may take place gradually. PD patients with implanted fetal DA neurons show continuous symptomatic improvements even after DA storage capacity in the striatum (measured by L-[β - ^{11}C]DOPA PET) and response to DA-releasing agents has plateaued (Isacson et al., 2001; Piccini et al., 2000). With bilateral implantation, further amelioration of global parkinsonism (including

enhanced spontaneous activity and improved balance) would be expected, since only 20% of thalamic projections from the basal ganglia are crossed in monkeys (Parent and Hazrati, 1995) and unilateral implantation would mainly affect contralateral limb movement. Monkeys did not display dyskinesia with or without L-dopa. This result supports previous observations that functional DA grafts do not independently generate abnormal DA responses (Bjorklund et al., 2002).

Given the recent successful isolation of nuclear-transferred ES cell lines (Tabar et al., 2008), our findings of efficient ES cell transplantation, expansion, and differentiation into functional DA neurons in the primate model have implications for ES cells as a donor source for cell therapy against PD.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Astellas Pharmaceuticals (Osaka, Japan) for providing FK506.

REFERENCES

- Bjorklund LM, Sanchez-Pernaute R, Chung S, Andersson T, Chen IY, McNaught KS, Brownell AL, Jenkins BG, Wahlestedt C, Kim KS, Isacson O. 2002. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:2344–2349.
- Breier A, Su TP, Saunders R, Carson RE, Kolachana BS, de Bartolomeis A, Weinberger DR, Weisenfeld N, Malhotra AK, Eckelman WC, Pickar D. 1997. Schizophrenia is associated with elevated amphetamine-induced synaptic dopamine concentrations: Evidence from a novel positron emission tomography method. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:2569–2574.
- Brooks DJ. 2004. Positron emission tomography imaging of transplant function. *NeuroRx* 1:482–491.
- Chung S, Shin BS, Hwang M, Lardaro T, Kang UJ, Isacson O, Kim KS. 2006. Neural precursors derived from embryonic stem cells, but not those from fetal ventral mesencephalon, maintain the potential to differentiate into dopaminergic neurons after expansion in vitro. *Stem Cells* 24:1583–1593.
- Hall VJ, Li JY, Brundin P. 2007. Restorative cell therapy for Parkinson's disease: A quest for the perfect cell. *Semin Cell Dev Biol* 18:859–869.
- Huang SC, Barrio JR, Phelps ME. 1986. Neuroreceptor assay with positron emission tomography: Equilibrium versus dynamic approaches. *J Cereb Blood Flow Metab* 6:515–521.
- Inoue N, Matsui H, Tsukui H, Hatanaka H. 1988. The appearance of a highly digitalis-sensitive isoform of Na⁺,K⁺-ATPase during maturation in vitro of primary cultured rat cerebral neurons. *J Biochem (Tokyo)* 104:349–354.
- Isacson O, Bjorklund L, Pernaute RS. 2001. Parkinson's disease: Interpretations of transplantation study are erroneous. *Nat Neurosci* 4:553.
- Jenner P. 2000. Factors influencing the onset and persistence of dyskinesia in MPTP-treated primates. *Ann Neurol* 47 (4 Suppl 1): S90–S99; discussion S99–S104.
- Kim JH, Auerbach JM, Rodriguez-Gomez JA, Velasco I, Gavin D, Lumelsky N, Lee SH, Nguyen J, Sanchez-Pernaute R, Bankiewicz K, McKay R. 2002. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* 418:50–56.
- Kish SJ, Shannak K, Hornykiewicz O. 1988. Uneven pattern of dopamine loss in the striatum of patients with idiopathic Parkinson's disease. Pathophysiologic and clinical implications. *N Engl J Med* 318:876–880.
- Li JY, Christophersen NS, Hall V, Soulet D, Brundin P. 2008. Critical issues of clinical human embryonic stem cell therapy for brain repair. *Trends Neurosci* 31:146–153.
- Liu SV. 2008. iPS cells: A more critical review. *Stem Cells Dev* 17:391–397.
- Mazloom M, Smith Y. 2006. Synaptic microcircuitry of tyrosine hydroxylase-containing neurons and terminals in the striatum

- of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated monkeys. *J Comp Neurol* 495:453–469.
- Nakayama T, Momoki-Soga T, Inoue N. 2003. Astrocyte-derived factors instruct differentiation of embryonic stem cells into neurons. *Neurosci Res* 46:241–249.
- Nakayama T, Momoki-Soga T, Yamaguchi K, Inoue N. 2004. Efficient production of neural stem cells and neurons from embryonic stem cells. *Neuroreport* 15:487–491.
- Newman MB, Bakay RA. 2008. Therapeutic potentials of human embryonic stem cells in Parkinson's disease. *Neurotherapeutics* 5:237–251.
- Parent A, Hazrati LN. 1995. Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res Brain Res Rev* 20:91–127.
- Piccini P, Lindvall O, Bjorklund A, Brundin P, Hagell P, Ceravolo R, Oertel W, Quinn N, Samuel M, Rehncrona S, Widner H, Brooks DJ. 2000. Delayed recovery of movement-related cortical function in Parkinson's disease after striatal dopaminergic grafts. *Ann Neurol* 48:689–695.
- Rodriguez-Gomez JA, Lu JQ, Velasco I, Rivera S, Zoghbi SS, Liow JS, Musachio JL, Chin FT, Toyama H, Seidel J, Green MV, Thanos PK, Ichise M, Pike VW, Innis RB, McKay RD. 2007. Persistent dopamine functions of neurons derived from embryonic stem cells in a rodent model of Parkinson disease. *Stem Cells* 25:918–928.
- Sanchez-Pernaute R, Studer L, Ferrari D, Perrier A, Lee H, Vinuela A, Isacson O. 2005. Long-term survival of dopamine neurons derived from parthenogenetic primate embryonic stem cells (cyno-1) after transplantation. *Stem Cells* 23:914–922.
- Suemori H, Tada T, Torii R, Hosoi Y, Kobayashi K, Imahie H, Kondo Y, Iritani A, Nakatsuji N. 2001. Establishment of embryonic stem cell lines from cynomolgus monkey blastocysts produced by IVF or ICSI. *Dev Dyn* 222:273–279.
- Tabar V, Tomishima M, Panagiotakos G, Wakayama S, Menon J, Chan B, Mizutani E, Al-Shamy G, Ohta H, Wakayama T, Studer L. 2008. Therapeutic cloning in individual parkinsonian mice. *Nat Med* 14:379–381.
- Takagi Y, Takahashi J, Saiki H, Morizane A, Hayashi T, Kishi Y, Fukuda H, Okamoto Y, Koyanagi M, Ideguchi M, Hayashi H, Imazato T, Kawasaki H, Suemori H, Omachi S, Iida H, Itoh N, Nakatsuji N, Sasai Y, Hashimoto N. 2005. Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model. *J Clin Invest* 115:102–109.
- Tsukada H, Harada N, Nishiyama S, Ohba H, Kakiuchi T. 2000a. Cholinergic neuronal modulation alters dopamine D2 receptor availability in vivo by regulating receptor affinity induced by facilitated synaptic dopamine turnover: Positron emission tomography studies with microdialysis in the conscious monkey brain. *J Neurosci* 20:7067–7073.
- Tsukada H, Harada N, Nishiyama S, Ohba H, Sato K, Fukumoto D, Kakiuchi T. 2000b. Ketamine decreased striatal [(11)C]raclopride binding with no alterations in static dopamine concentrations in the striatal extracellular fluid in the monkey brain: Multiparametric PET studies combined with microdialysis analysis. *Synapse* 37:95–103.
- Watanabe M, Okada H, Shimizu K, Omura T, Yoshikawa E, Kosugi T, Mori S, Yamashita T. 1997. A high resolution animal PET scanner using compact PS-PMT detectors. *IEEE Trans Nucl Sci* 44:1277–1282.
- Wichmann T, DeLong MR. 2003. Pathophysiology of Parkinson's disease: The MPTP primate model of the human disorder. *Ann N Y Acad Sci* 991:199–213.

Neurological CPC

著明な自律神経症状を呈した末梢神経障害の59歳男性例*

藤原 雅代¹⁾ 森田 陽子²⁾ 松坂 恵介³⁾ 中野 今治⁴⁾
 (演者) (演者) (演者) (コメンテーター)
 福田 隆浩⁵⁾
 (司会)

第11回 Neuro CPC 第2題 2008年10月24日 於：東京都済生会中央病院
 世話人：横地正之⁶⁾ 河村 満⁷⁾ 織茂智之⁷⁾ 福田隆浩⁸⁾ 藤ヶ崎純子⁹⁾ 後藤 淳⁹⁾ 鈴木正彦¹⁰⁾

司会 2例目をご発表いただきます。東京医療センターの森田先生、よろしくお願いいたします。

症例呈示

森田 患者は、当院初診時(X年)に57歳の男性です。主訴は両下肢のしびれと筋力低下です。

経過の概要ですが、52歳と55歳時に立ちくらみがして倒れて頭部を打撲し、医療機関にかかったというエピソードがありました。54歳時(X-3年)に左足先、次いで右足先にしびれ感が出現して、徐々に下腿へ広がったということで内科を受診し、血液検査やMRIを施行したそうですが、原因は不明と言われたそうです。翌年(X-2年)、他院整形外科でMRIを施行し、椎間板ヘルニアによるものではないかと言われたそうです。さらに次の年(X-1年)の6月頃に足がもつれ、12月末から両手がしびれるような感覚と残尿感もするという事で、別の病院で筋電図検査を施行したところ、末梢神経障害の疑いがあるのではないかとわれ、年明け(X年)1月に当院神経内科を受診されました。初診時の所見は後ほどお示しします。2週間ほど検査入院していただきましたが、原因確定せず、外来で経過観察としました。翌年(X+1年)2月に転倒し右大腿骨頸部骨折で他院にて入院治療を行い、歩行器で全荷重可能となり、4月に当科に2回目の入院となりました。

既往歴は、56歳時に慢性胃炎でピロリ菌の除菌をしています。職業は事務職でしたが、同年に体調不良が原因で退職されています。家族歴としては、祖母と妹が関節リウマチ、両親が椎間板ヘルニアです。

初診時の一般身体所見は、身長163cm、体重50kgと多少痩せ型で、坐位で血圧が80/52mmHg、そのほかは胸部・腹部、一般身体上特記することはありません。かなり神経質そうな方だったのですが、雰囲気としては正常だろうと判断しました。

いちばん目立った所見としては、臀部から大腿の背面にかけての筋萎縮でした。例えば、うつおせにすると膝が曲げられず、hamstringsがかなり落ちていました。それに対して大腿の前面は意外にしっかりしていて、かなり奇異な状況でした。上肢には特に筋力低下を認めませんでした。

膝蓋腱反射はむしろ高めのように思いましたが、アキレス腱反射は消失しており、足底反射は反応がなく、Babinski徴候やChaddock徴候も陰性でした。肛門のtonusは低下していました。この時点で立つことはでき、1本杖を使って受診していました。ただ、立ち上がる時には支えが必要でした。

感覚系は、やはり臀部と大腿の背面から下腿のほうにかけて触覚低下としびれ感を訴え、振動覚は下肢から尾部まで低下しており、遠位に優位に思われました。尿意・便意は保たれていました。

* An Autopsy Case of Peripheral Neuropathy, Presenting with Severe Autonomic Failure

1) 虎の門病院神経内科, 2) 東京医療センター神経内科, 3) 東京大学大学院医学系研究科人体病理学・病理診断学分野, 4) 自治医科大学神経内科, 5) 東京慈恵会医科大学神経病理, 6) 荏原病院神経内科, 7) 昭和大学医学部神経内科, 8) 関東中央病院神経内科, 9) 東京都済生会中央病院神経内科, 10) 東京慈恵会医科大学青戸病院神経内科

[連絡先] 藤原(待井)雅代: 福島県立医科大学附属病院神経内科(〒960-1295 福島市光が丘1番地)

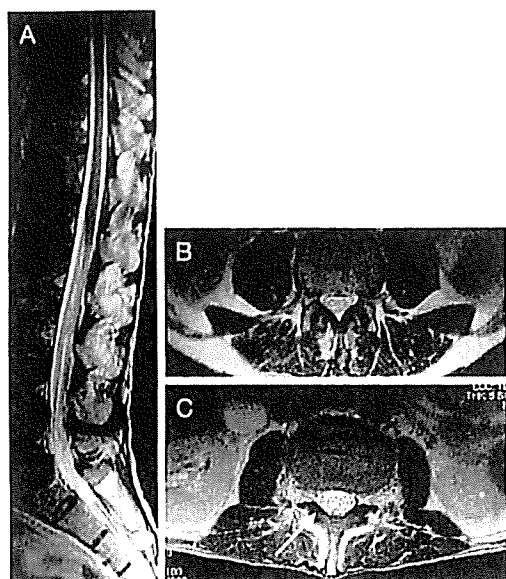


Fig. 1 腰髄・仙髄 MRI 画像

A, B: 第1回入院時(57歳時), C: 転院後(59歳時)。著明な馬尾の肥厚(矢印)がみられる。

起立試験を試みましたが、臥位で血圧 94/51 mmHg, 脈拍 77, 立位で血圧 58/38 mmHg, 脈拍 100 となり、気分が悪いという訴えがあり、直ちに中止しました。泌尿器科に膀胱機能検査を依頼したところ、flaccid type の神経因性膀胱の疑いで、残尿 8 mL と特に緊急的な治療の必要はないのではないかとのことでした。

入院後の一般検査では、血液生化学、膠原病、腫瘍関連に明らかな異常を認めませんでした。一方、心電図 CV-RR (coefficient of variation of R-R intervals) は 0.78% と、明らかな低下がみられました。

髄液所見では、総蛋白が 253 mg/dL, IgG 31.9 mg/dL と、どちらも上がっていました。

ガリウムシンチでは異常集積なく、心エコーでは、心筋には問題はなかったのですが、心嚢液の貯留が少量あるという所見でした。

神経伝導速度検査で、左腓骨神経は導出できませんでした。右はかなり振幅は小さかったのですが測定すると 44 m/sec で、振幅が小さいわりにはそれほど落ちていないという印象でした。

針筋電図では、筋萎縮がみられたところで positive sharp wave が見受けられ、neuropathic units が目立ったので筋疾患ではないと考えました。腰・仙髄病変を疑い MRI を撮りましたが、特に目立った所見はみられませんでした。馬尾は普通より多少密にみえますが、放射線科医は病的なものとは言えないのではないかと意見でした (Fig. 1 A, B)。悪性腫瘍など全身を検索する目

的で胸・腹部の造影 CT を撮りましたが、異常は認められませんでした。あえて挙げるとすれば、大腿部の背側と臀部の筋肉がかなり選択的に萎縮していることがみてとれました。

以上のように、自律神経障害があり胸・腰髄から仙髄レベルの障害が認められて、髄液蛋白が高いという陽性所見はありましたが原因は確定せず、積極的な治療にも踏み切れない状況でしたので、外来で経過観察となりました。退院 6 カ月後には両手のしびれの訴えが目立つようになり、感覚障害も明らかになってきました。血圧は、坐位で 100~110/60~75 mmHg でしたが、立ちくらみがしばしばありました。

その後骨折で他院に入院し、次に当院へ来院されたのは外来最終受診から 5 カ月後でした。このとき第 2 回目入院となりましたが、左眼が外転位をとっており、本人にうかがったのですが複視の訴えははっきりせず、眼の異常にも気づいていない状況でした。そのほか、最初にあった症状が多少進んでおり、例えば膝蓋腱反射が低下し、下肢の感覚障害の範囲が広がり、上肢の末梢の感覚障害と筋力低下も明らかに認められました。CV-R-R もさらに低下していました。MIBG 心筋シンチも施行しましたが、極端に落ちているという状況はありませんでした。

残尿が増え膀胱障害が進んだと考えられました。腰椎穿刺は前よりも総蛋白は上がっていますが、性質が変わっているというものではありませんでした。今回は、血清の免疫電気泳動を調べたところ、IgG の λ 型の M 蛋白が検出されました。尿では M 蛋白は認められませんでした。

骨シンチを行い、肋骨に点状に集積が認められましたが、外傷性のものではあると思われる。ガリウムシンチでは、骨盤の正中部に若干集積がありました。消化管の内容物だろうと思われました。念のために腹部の CT を撮りましたが、はっきりした異常はみられませんでした。

入院後、やはり立ちくらみがあり、徐々に排尿障害が進んで導尿が必要になり、腹部膨満があつて食事摂取量も減少しました。このころ、精神不安がみられ、訴えが多く、医療関係者の言葉でいうと、「ワガママな患者さん」になってしまったという印象でした。

なかなか診断確定に至らず、ご本人、ご家族の希望もあつて、虎の門病院へ転院されました。

司会 ありがとうございます。2 回目の入院までの臨床経過で、ご質問などありますか。

中瀬 この方は、最初入院されたときには、性格の面ではごく普通の感じて、全体の経過のなかで出てきた

というふうに考えていいですか。

森田 はい。1回目の入院のときには、検査などにも協力的でした。ただ、経過も長いですし、診断もつかないこともあって、ストレスから心因反応を起こしてもおかしくはないと思います。私自身、病的なものというよりも、反応性のものかなというふうに思っていました。

長谷川 神経伝導検査では、下肢のCMAP (compound muscle action potential) 振幅が非常に小さかったようですが、感覚神経の振幅もかなり下がっているんですか。

森田 それほどではありません。何回か行っておりまして、1回目の入院後の検査でsensoryの波形は確認できました。

長谷川 普通、あれだけしびれがあって、CMAPがperonealだけでなくtibialも2.5 mVまで下がっていると、下肢の腓腹神経はほとんどとれなくなることが多いのですが。上肢は正常の半分ぐらいの振幅がとれていて、少しmotorの分布が変だということと、axonal neuropathyのようですが、画像上のproximalが太いことと髄液蛋白が上がっていることは、なんとなく結びつきそうだという感じですか。

森田 最初に患者さんを診察したときには、症状が低位腰髄・仙髄レベルに限局し、脱神経がかなりはっきり出ていて、伝導速度がはっきり落ちていなかったのので、局所診断でいうと、最初は脊髄の印象を持ちました。

長谷川 CMAPの振幅が落ちていますから、私はaxonal neuropathyでおかしくはないと思います。

司会 ありがとうございます。それでは次に、虎の門病院神経内科の藤原先生、よろしく願いいたします。

藤原 当院に転院後の身体所見からご説明します。血圧は、臥位の状態で88/60 mmHgです。頭部、頸部、胸腹部に特記事項はありません。るいそうが著明であり、下肢優位の筋萎縮を認めました。神経学的所見としては、改訂長谷川式簡易知能評価スケール(HDS-R)で30点中15点、エピソード記憶の障害と抑制の低下を認めました。

深部腱反射低下と、筋萎縮を伴う下肢優位で遠位優位の筋力低下、MMT (manual muscle test) では、下肢が0~3-、上肢では4+~5と上肢は比較的保たれ、下肢の末梢にかなり強い所見でした。感覚も下肢優位、末梢優位の表在覚・深部覚低下で、こちらもやはり下肢の末梢で優位であり、末梢では全感覚消失という状況です。

眼球運動障害として、左の内転・下転・上転障害、眼位は、左で外斜位。輻輳反射の消失、対光反射右遅鈍・左消失、瞳孔は楕円形であり、右が5 mm、左が6 mm、

また後ほど説明いたしますが自律神経障害を認めました。血液検査所見では、軽度の貧血と食欲低下によると思われる低栄養の所見を認めました。肝・腎機能は正常で、各種のビタミンやリゾチーム、ACEにも異常はありません。

内分泌系でも、低栄養によるものと思われるlow T₃症候群以外は異常な所見は認めませんでした。免疫グロブリンや各種の自己抗体にも異常はありません。可溶性IL-2レセプター、赤沈の亢進を認めますが、繰り返す尿路感染があったようで、慢性炎症の影響が疑われます。血清の免疫電気泳動では、IgG-λ型M蛋白が認められました。

髄液検査所見では、当院の結果でも蛋白が302 mg/dLと著明に上昇しています。IgG indexは0.63、髄液でも免疫電気泳動でIgG-λ型のM蛋白を認めています。一方尿所見では、尿管障害を疑わせる所見はありましたが、M蛋白は認められませんでした。

次に画像所見です。心電図では、左軸偏位で肢誘導にて低電位を認め、心エコーでは少量の心嚢水を認めました。X線、ガリウムシンチに関しては、前医での結果から特に変化はありません。骨格筋のCTでは両側の大腿と下腿筋で著明な筋萎縮を認め、脊髄のMRIでは著明な馬尾の肥厚を認めました (Fig. 1 C)。頭部MRIでは、側頭葉と前頭葉に萎縮を認めましたが、明らかな左右差はありませんでした。脳血流SPECTは、両側の前頭葉から側頭葉、後頭葉にかけて血流低下があり、左優位な所見でした (Fig. 2)。

自律神経機能検査ですが、初回入院時、第2回入院時、当院転院時と比較すると、いずれにおいても、体位変換での血圧の変動が明らかなです。当院転院時には、30°ベッドアップで血圧の変動は認めませんでした。60°にしたときに収縮期血圧が50 mmHg台となり、気分不快を認めたため検査中止となりました。心拍数の上昇は認めませんでした。

ピロカルピン点眼試験では、明らかな縮瞳は認めませんでした。

膀胱直腸障害に関してですが、膀胱が弛緩しており、MRIで膀胱が臍の位置まで拡張していました。肛門括約筋反射は消失していました。このほか、インポテンツがあり、発汗の状態は低下、皮膚は乾燥気味でした。

神経生理の所見ですけれども、ABR (auditory brainstem response)では、右stimで、I~V波のIPL (interpeak latency) が落ちていました。これは、III~Vでの延長です。各波ともに振幅低下がみられます。パターンVEP (pattern-visual evoked potential : P-VEP) では、

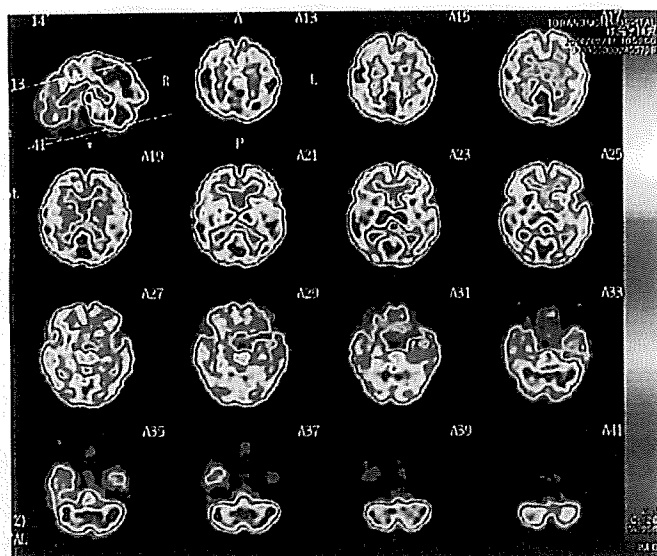


Fig. 2 脳血流 SPECT

両側前頭葉，側頭葉，後頭葉の血流低下が認められる。全体に左優位の低下傾向にある。

両側で潜時の遅延がみられました。ABR, VEP いずれも臨床的にこの検査結果に合致するような症状は認めておりません。

脳波では，awake の状態で θ 波と δ 波が中頻度に混在し，SEP (somatosensory evoked potential) では上肢が正常，下肢は P15 以降検出されておられません。

NCS (nerve conduction studies) では，CMAP 振幅の低下，SNAP (sensory nerve action potential) 振幅の低下が著明です。速度の低下を認めますが，振幅の低下と比較すると程度が軽く，やはり axonal neuropathy が疑われました。上肢は，median が CMAP 5.60 mV と軽度低下しているのみで F 波も保たれており，下肢に強い所見でした。

筋電図では，経時的にみると，下肢筋に関しては polyphasic unit や positive sharp wave の出現が増加し，unit が減少しています。当院転院時の 58 歳時点では，exhausted neurogenic の所見でした。上腕二頭筋や尺側手根屈筋などの上肢筋に関しては，経過を追って inactive neurogenic の所見です。

入院後の経過です。先ほどのような経過からアミロイドーシスも疑い，腹壁脂肪生検や直腸粘膜下生検も行いましたが，確定診断には至りませんでした。脊髄 MRI で著明な馬尾肥厚もあり，IV IgG (intravenous immunoglobulin) を診断的治療目的で施行しましたが，症状の改善は認めておりません。

当院転院時に 15 点だった HDS-R が 8 点まで低下しました。翌年 (X+2 年) 1 月，夕方に原因不明の心肺

停止状態で発見され，一時蘇生に成功しましたが，その後，感染コントロール不良および血圧の維持が困難となり，6 日後に永眠されました。診断確定目的に剖検をしています。

司会 死亡時 59 歳の男性です。全経過 6 年弱で，慢性的に進行し，初めに自律神経障害，そして下肢の筋力低下。感覚異常が上肢に広がる経過をとり，神経生理学的には axon の障害を示唆する所見という症例です。

大矢 この方は，こんなに髄液の蛋白が高く，正常圧水頭症をきたし得るため，そのためなのか，精神症状なのか，脳血流が低下しているので，脳室の拡大が出てきているのでしょうか。先ほどの MRI では側角の拡大はみられなかったのです。

藤原 脳室の拡大は，MRI 上は認めておりません。

大矢 そうしますと，これは麻痺の結果なんのでしょうか。それから，はたして高次機能が落ちていることをどう考えるのかが疑問なのですが。

藤原 ご指摘の点がまさに問題になっているところですが，結論から言うと，原因は明らかではありませんが，血圧低下が頻回に起こってしまっていて，ベッドサイドで普通に話しているときでも，血圧 50 mmHg という状態もありました。慢性的な虚血状態というか，脳循環障害がかなり繰り返されていたと思われるので，その影響が可能性としてはあるかなと考えています。

司会 剖検に進む前に，臨床として鑑別診断はどういったものを考えていらっしゃったのでしょうか。

藤原 これだというのは，あまりつかめなかったというのが正直なところですが，自律神経障害がかなり強く，monoclonal gammopathy があるという点からは，組織はとれませんでした，1 つアミロイドーシスが鑑別に挙がりました。

それから，馬尾の肥厚がかなり強く，蛋白の上昇もあって，脱髄が関与していることも考えました。神経根で脱髄が起こって，そこに障害が起きて末梢に影響が出た可能性も考えて，treatable なものを見逃さないために IV IgG を行いました。

長谷川 Amyloid polyneuropathy を考える必要があると思います。これは，典型的には集積地で起こってくるような若年発症の自律神経系に非常に強く出る FAP (familial amyloid polyneuropathy) と，散発的に起こって家族歴のはっきりしない，高齢男性に発症してくる自律神経障害のあまりはっきりしない，だけれども確実に進行して，数年でどんどん悪くなっていくものがありま

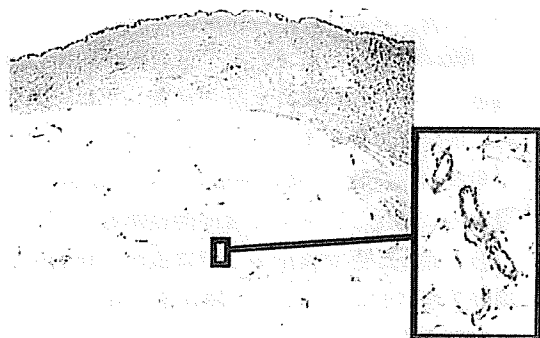


Fig. 3 皮膚生検 (DFS 染色)

すが、この症例は年齢的にはまったく中間型なんです。FAP と考えたときに矛盾することは、心臓があまり involve されていないことと、基本的に axonal polyneuropathy のはずなのに、なぜ馬尾が肥厚するのか、なぜ髄液蛋白があんなに上がるのかということで、普通の FAP には合わないところです。これだけ確実に進行していく中年発症の polyneuropathy——概念としては矛盾があるんだけど——、「さて何だろう？」という感じです。

司会 ほかにご意見はありますか。

では、松坂先生、病理をよろしくお願いいたします。

病理所見

松坂 解剖の所見からタイトルをつけるならば、「脊髄根に高度のアミロイド沈着をきたした孤発性 AL 型 amyloid polyneuropathy の 1 解剖例」が妥当かと思いました。

全身性アミロイドーシスは、アミロイドがさまざまなアミロイド前駆体から産生され、全身の細胞外に沈着することで臓器障害をきたす疾患ですが、本症例では、免疫グロブリンの light chain の λ を前駆体とした AL 型のアミロイドでした。

まず、生検の所見からお示します。エポン包埋による腓腹神経の標本では有髄線維の中等度の減少を認め、特に小径の有髄線維に減少が目立ちます。また、無髄線維の減少は極めて高度に認められました。

神経の電子顕微鏡（電顕）写真でも同様に有髄線維の減少を認め、denervated Schwann cell cluster を形成しています。血管壁は肥厚していますが、アミロイドの沈着は認めませんでした。無髄線維の減少に伴って膠原線維の増加が目立ちました。

直腸生検では、粘膜下層の中・小動脈レベルの血管壁には沈着を認めますが、通常生検では粘膜筋板より浅



Fig. 4 中脳

い部分が採取されますので、このレベルでの組織にはアミロイドの沈着を認めることはできませんでした。

皮下脂肪組織ではまったくアミロイドの沈着は認めません。一方、血管壁には DFS (direct fast scarlet) 染色で陽性所見を認めたものの、偏光顕微鏡下でアップルグリーンを呈する屈折像が確認できなかったために、「アミロイド沈着が疑われるが、確定診断はできない」という一歩引いた診断になってしまいました (Fig. 3)。

骨髄は normocellular bone marrow で、異形形質細胞の有意な増加は認めませんでした。

以上から、生検の段階では、アミロイドの存在を確定することはできませんでした。

続いて解剖所見です。大脳重量は 1,660 g と、脳の腫大を認めます。これは、心肺停止から 1 週間程度経過していますので、心肺蘇生後の変化によると考えます。大脳の断面は、第三脳室の辺縁にある視床や乳頭体、扁桃核が色調の変化を呈し、また非常に軟化しており、組織学的にも新鮮な虚血の所見を認めました。中脳では、中脳水道の周囲に加えて、血流の中核側である黒質にも新鮮な虚血の変化を認めました。これは血流の需要が神経核に多いことで説明できるのではないかと考えております (Fig. 4)。海馬の神経核はよく保たれており、神経原線維変化や gliosis なども認めませんでした。ほかの大脳の所見からも、高次機能障害を説明し得る所見は残念ながら認められませんでした。脊髄については、薄束に二次性の変化が目立ちました。そのほか perivascular lymphocytic cuffings を認めています。

続いて末梢神経です。脊髄直近の神経根に対しては、アミロイドの沈着は認めませんでした。一方、脊髄根でも、より末梢側でアミロイドの沈着が目立ち、特に馬尾に非常に高度な沈着を認めました。また、馬尾のなかでも末梢側に肥厚が目立ちました。脊髄レベルでは、頸神経や胸神経といった頭側の神経よりも、腰神経や仙骨神経といった尾側の神経に沈着が目立ちました。それが、

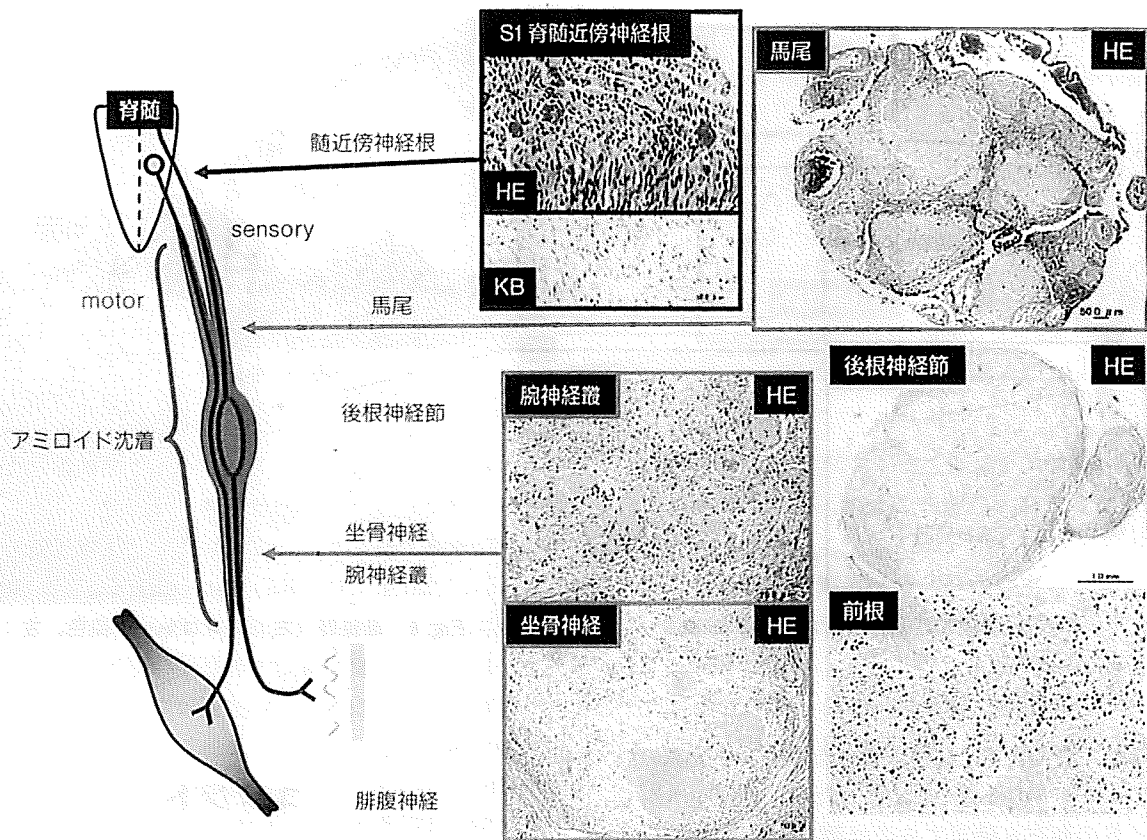


Fig. 5 末梢神経系のアミロイド沈着部位

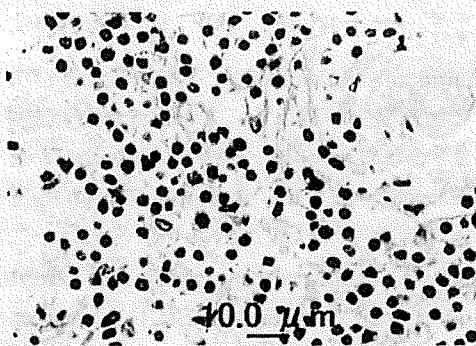


Fig. 6 単核球の集簇

馬尾の肥厚を反映していると思われます。後根神経節に高度な沈着を認め、末梢神経でも坐骨神経や腕神経叢といった、より中枢側の末梢神経には極めて高度なアミロイドの沈着を認めました。一方、腓腹神経まで末梢になると、アミロイドの沈着は確認できませんでした。

拡大を上げて見ていきます。前根の脊髄の直近部では、アミロイドの沈着はまったく認めず、軸索も保たれています。脊髄に入る直前部分では、後根神経節の傷害を反映して軸索の脱落が目立ちますが、こちらもアミロイド

の沈着は認めません (Fig. 5)。

腰髄後根の電顕写真では、血管壁が内皮細胞の直下まで、約 10 nm 程度のストレートの線維束を認めます。アミロイドの沈着として矛盾しないという所見です。

免疫組織学的な所見は、IgG- λ 型に特異的な抗体で強い陽性像を認めました。一方、Pre-albumin や amyloid A に対する陽性像は認めず、AL- λ 型のアミロイドーシスと判断しました。

気になるのは、アミロイドの沈着部位に一致して、単核球の集簇が強く認められたことです (Fig. 6)。異型のない、免疫組織学的には B cell maker が陽性のリンパ球でしたが、悪性リンパ腫のような腫瘍性の病変ではありません。この集簇の意義に関しては、なかなか判断の難しいところです。

後根神経節ならびに腕神経叢、坐骨神経にも、極めて高度なアミロイドの沈着を認めました。

次に自律神経系です。交感神経幹ならびに交感神経節に高度なアミロイドの沈着を認めました。さらに拡大しますと、アミロイドの沈着により星状神経節組織が置換されています。また、この周囲の脂肪組織ならびに血管壁にもアミロイドの沈着を認めます (Fig. 7)。

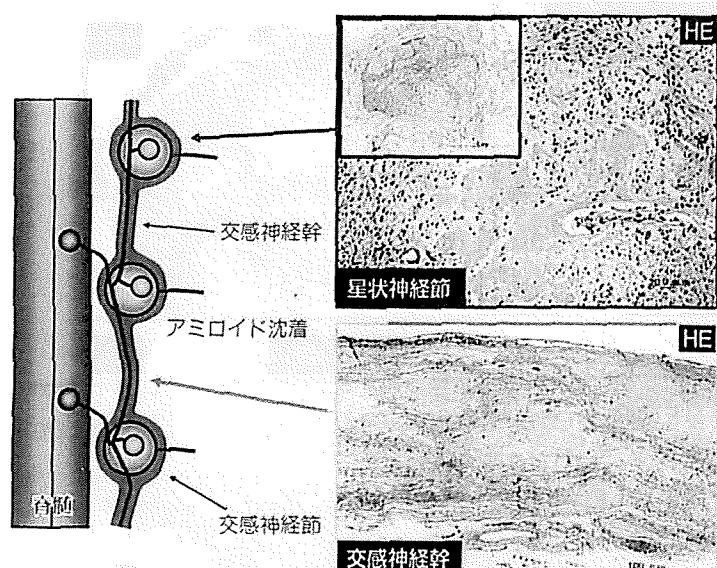


Fig. 7 自律神経系のアミロイド沈着部位

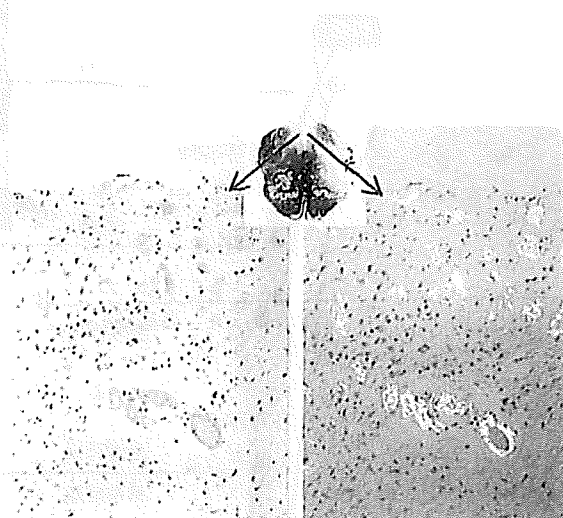


Fig. 8 最後野 (右: コンゴレッド染色, 左: 偏光)

このほか、消化管で、粘膜下層にある中・小動脈の血管壁にアミロイドの沈着を認めましたが、電顕レベルでアミロイドの存在を確認するのは難しかったと思います。肉眼的に心臓の断面をみると、心筋は保たれていますが、心外膜下の脂肪組織が線維質な、ゴワゴワした質感でした。また、脂肪組織と心筋の境界が不明瞭な部分を分散的に認めます。DFS 染色でアミロイドを染めてみたところ、心筋は保たれている一方、心外膜下の脂肪組織ならびに血管壁には、脂肪組織を置換するような極めて高度なアミロイド沈着を認めました。心筋の辺縁では、一部アミロイドの沈着を認めますが、心筋細胞自体はまったく保たれていました。また、洞房結節も、血管壁には沈着を認めますが、洞房結節の細胞は保たれていました。

腎臓はアミロイドで障害されることがよくありますが、肉眼的にはうっ血以外の所見は認められません。ただし、腎門部の脂肪組織がアミロイドに置換されていました。しかし、糸球体は保たれていました。

このように非常に特徴的な分布を示した全身性アミロイドーシスでした。以上になります。

司会 ありがとうございます。それではまず、中野先生のコメントをいただいてから、この症例に関してディスカッションしたいと思います。中野先生、よろしくお願いいたします。

コメント

中野 今回提示するものは、この症例とはじかには関係のないものですが、この症例のアミロイド沈着について1つの示唆を与えるのではないかとされる所見をお示しします。

Systemic amyloidosis では、血液のなかをアミロイドのもとになる蛋白が流れていて、それが血管の外に出て溜まります。この systemic amyloidosis にはいくつかの蛋白が関わっていますが、immunoglobulin light chains が先ほどの症例です。私がおみせするのは、二次的な amyloidosis, inflammation-associated amyloidosis (AA amyloidosis) で、これが BBB (blood-brain barrier) との関係でどう沈着するかということをお示しします。

BBB は、脳血管の、特に内皮細胞が担っていると言われていまして、脳の血管には tight junction があり、pores がない、pinocytotic vesicle が少ないということで、血管内の物質が外に出ないことが背景にあると考えられています。一般の血管は孔があったり、tight junction がなくて、血液内のものが外に出やすいと考えられているわけです。脳の中では、BBB の薄いところが脳室に沿ってありまして、いちばん有名なのは脈絡叢です。それからヒトでは松果体、最後野、正中隆起、神経下垂体といったものがあります。

今からおみせする症例は、22 年前からクローン病を

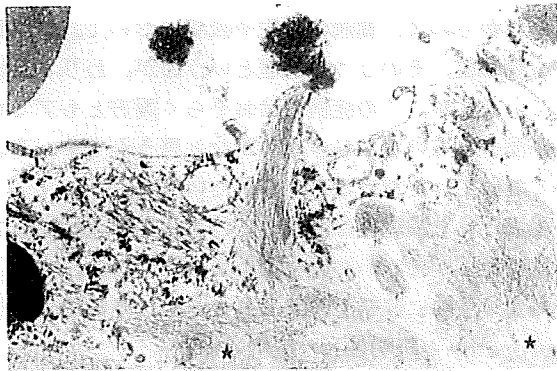


Fig. 9 側脳室脈絡叢 (★: 基底核)

患った患者さんですが、その方が全身のアミロイドーシスを起こして亡くなって、脳はどうかということでみたわけです。

Fig. 8 は、BBB のない最後野なのですが、コンゴレッド染色で赤く染まって、偏光でアップルグリーンを呈しています。これは、おそらく BBB がいないために溜まってきたと考えられます。松果体も同じです。いちばん多いのは側脳室の脈絡叢で、真っ赤に染まっていて、アップルグリーンのきれいな偏光を呈しています。これを電顕でみますと、先ほどの症例と同じぐらい、内膜の直下までアミロイド線維が溜まっているわけです。ただ、この場合はこれだけではなく、内膜直下に溜まったアミロイドの線維が束をなして、血管腔の中に再び突き出ているようにみえます。ここに孔が開いているかどうか、これではわかりませんが、下からアミロイド線維が押し上げてきている様子はわかります (Fig. 9)。

では、実際に露出しているものがあるかということですが、基底膜を越えて内膜の直下までアミロイド線維が溜まっています。この部分を拡大しますと、アミロイド線維があって、外側には内皮細胞の細胞質がありますが、ちぎれています。この像だけみると、人工的なものと考えられるかもしれませんが、露出したアミロイド線維がみえますので人工産物とは考え難くなります。

それから、この溜まったアミロイドは、内皮細胞の細胞質だけでなく、核のなかにも陥入してみえます。指状に入り込む性質を持っている可能性がある。ただし、これは細胞間の接着は保たれていました。

私の呈示した症例では内皮細胞の直下まで溜まったアミロイド線維が外に出ているという像がみられています。今回の虎の門の症例は、細胞直下まで溜まっていますが、ここに突き出していくような像はみられませんでした。細胞接着の部分にはよく残っていました。

ポイントは、この虎の門の症例のアミロイドはあまり

方向性がなく、AA amyloidosis に比べると束のようなものがないので、線維配列の差から出てきたものかなと。そういうふうにこの症例をみておりました。

問題は、なぜ BBB のあるところに血管内の物質が出てきたか、ということではないかと思います。以上です。

ディスカッション

司会 それでは、病理を含めていかがでしょうか。

村山 生検における診断での疑問点が1点、それと病態所見における中枢の所見に関する疑問を1点、述べさせていただきます。

DFS 染色で陽性の場合には、私たちが末梢神経でアミロイドを疑うときに、AA とか、ApoE とか、associated protein を染めて、それが強く染まってくる場合には示唆する所見であると考えています。あの時点で診断が出ても、この方の臨床所見、臨床診断で治療がどう変わったかというのは問題にはなと思うんですけど、あの所見はもっと大事にしなければならないんじゃないのかなというのが、私の最初の生検に対する疑問です。

松坂 ご指摘のとおり、われわれが施行した IgGλ 型の抗体は、アミロイドに対する特異的な抗体ではなく、いわゆる正常の IgGλ に対する抗体です。ですから、アミロイドに変化した時点で、そのエピトープも変化している可能性がありますので、より詳細に診断するためには、そういう特異的な抗体で診断を下す必要があったと考えております。

司会 この方は低血圧などが何度もあったということですか。例えば watershed などに古い病変があったかどうか。あるいは、層状壊死のような所見は、捉えられなかったということでもよろしいでしょうか。

松坂 はい。確認できたのは新鮮な、非常に新しい虚血性変化だけでした。

村山 私たちは心肺停止後で6日経っている場合に、その背景病理を細かく調べる際には、非常に慎重にやっていますけれども、いろいろな所見が飛んでしまうということがあるのです。ですから、「なかった」というふうに表現されるのは適当でなくて、「superimpose しているからわからない」と表現されるほうが適切ではないかと思っています。

中野 1点伺いたいのですが、tangle も消えますか。

村山 しっかりした tangle とか、ghost tangle は残るかもしれませんが、例えば pre-tangle の類は全部飛んでしまいますし、tau の免疫染色も染まらなくなります。α シヌクレインの病理も飛んでしまいます。

ですから、虚血が加わったときには、かなり慎重に評価しなければならないと、私たちは考えています。

司会 中野先生にぜひ伺いたいのですが、この症例は、後根神経節を中心に、その遠位の神経根、そして近位の神経根にかなり強くアミロイドが沈着しています。最近読んだ本のなかに、後根神経節には blood nerve barrier がないと書いてあったのですが、それと今回の所見が、もしかしたらとても関連があるのかなと思ったのですが、いかがでしょうか。

中野 末梢神経には、溜まってきてもいいかなと思うんです。Barrier があるはずの馬尾、要するにくも膜下腔の中に、あれだけ溜まってきているというのは、本当に血管内のものが出て溜まったのか、あるいは別の機序で溜まったのか、わからないのです。全身性アミロイドーシスでは、barrier のある脳には溜まりませんので。

村山 後根神経節に関しては、多くの実験において BBB が存在しないということは報告されています。それが生理学的にどういう意味をもつかが問題なのですが、全身性アミロイドーシスのときにターゲットになる1つの理由とされています。

馬尾が傷害されることに関してはよくわかっていませんが、髄液に浸かっているところは、どういうわけか非常に溜まりやすいということはあります。

それからいま、髄液の産生や吸収において、脈絡叢とくも膜顆粒、その2つの病理というのが、わりと注目されていますが、この症例ではおそらく両方ともアミロイドが溜まっているんじゃないかなと思うんです。それをみておいていただけるとありがたいです。

松坂 くも膜顆粒は評価していませんが、脈絡叢には、非常にわずかにしか沈着を認めませんでした。

司会 生前に診断が困難であったが、剖検で amyloid neuropathy と証明された症例です。

皮膚や大腸の粘膜、末梢神経の生検で、それぞれアミロイドーシスの存在を9割前後は確認できるということが知られていますから、そのいずれもが陰性ということになると、確率としてはそうとう低くなるわけで、臨床の先生方がご苦労なさったというのがよくわかる、貴重な症例だと思います。

どうもありがとうございました。

(了)

発言者一覧

大矢 寧	国立精神・神経センター病院神経内科
中瀬 浩史	虎の門病院神経内科
長谷川 修	横浜市立大学附属市民総合医療センター総合診療科
村山 繁雄	東京都健康長寿医療センター

症例報告

左中前頭回後部限局性梗塞により不全型 Gerstmann 症候群・ 超皮質性感覚失語を呈した 65 歳男性例

安藤 喜仁¹⁾ 澤田 幹雄¹⁾ 森田 光哉¹⁾ 河村 満²⁾ 中野 今治^{1)*}

要旨: 左中前頭回後部限局性梗塞により、高度の失算と失書 (不全型 Gerstmann 症候群) および超皮質性感覚失語を呈した 65 歳男性、右きき症例を報告した。症例は右手のしびれ感・脱力・呼称障害で発症。高度の失算・失書および病初期に超皮質性感覚失語をみとめ、頭部 MRI で左中前頭回後部の限局性梗塞と診断された。発症 23 日目の ¹²³I-IMP SPECT (Single photon emission computed tomography) で MRI 病変を中心にその前方の前頭葉広範領域、さらに同側下頭頂小葉 (縁上回、角回) 周囲、大脳病変の反対側小脳に血流低下をみとめた。これらの病巣が不全型 Gerstmann 症候群および超皮質性感覚失語発現に関連していると考えた。

(臨床神経, 49: 560—565, 2009)

Key words: 左中前頭回後部梗塞, 不全型 Gerstmann 症候群, 超皮質性感覚失語, 遠隔機能障害

はじめに

失算・失書・左右失認・手指失認の 4 つの症候を同時に呈する現象は Gerstmann 症候群と称され、その原因病巣は優位半球下頭頂小葉 (縁上回、角回) と考えられている。しかし、左前頭葉病変でも Gerstmann 症候群をきたした症例が報告されている^{1)~3)}。また、超皮質性感覚失語は優位半球頭頂後頭葉または頭頂側頭葉で生じるとされているが、まれながら前頭葉病変でおこるばあいがある⁴⁾。

われわれは、左中前頭回の限局性梗塞により、通常、頭頂葉症状とされている Gerstmann 症候群 (不全型) および超皮質性感覚失語を呈した右きき男性症例を経験した。

症 例

患者: 65 歳、右きき男性。

主訴: 右手のしびれ感、ものの名前が出てこない、計算障害。

現病歴: 2004 年 8 月某日起床時に右手にしびれ感が出現し、急須と茶わんの呼称ができなかった。使用法は理解しており、実使用可能であった。徐々に右手の脱力が出現したため近医を受診し、頭部 CT を施行されたが、陈旧性脳梗塞のみで新規の病変は指摘されなかった。

翌日には右手の脱力は改善したが、違和感が持続していたため当院を受診した。

家族歴: 母に脳梗塞、父に心筋梗塞、弟に脳出血がみられた。

既往歴: 60 歳より高血圧に対し塩酸プラソジン 1mg/日、無症候性ラクナ梗塞に対しアスピリン 100mg/日を内服中であつた。

生活歴: 最終学歴は通信専門学校。60 歳まで船舶の通信士として勤務し日常的に 4 桁以上の数字を扱っていた。飲酒、喫煙習慣はなかった。

入院時現症: 意識状態は良好で血圧 162/92mmHg、心拍数 72/min 整。右手の違和感を訴えていたが、他覚的には感覚障害も筋力低下もみられなかった。8+5、100-7 などの簡単な計算ができず、重度の失算が明らかであった。本人はこれを頭から数が消えてしまうと表現した。自発書字にて文字の変形はなかったが、日付、AM/PM の書きまちがいや、語順の入れ替え、不必要な文字のくりかえしがある文章であった (Fig. 1, 上段)。後日、本人自身が読み返しても「意味が解らない」と述べた。

日付や曜日のいいまちがいもみられ、本人は「なかなか言葉が出てこない」と訴えていたが、物品呼称にはあきらかな障害はなく、「遠くの青い海に白いヨットが浮かんでいます。」という比較的長い文章の復唱は可能であった。閉眼指示に対して閉口してしまうなど、単純な言語命令にしたがえず、言語理解は明らかに障害され、失語症のタイプは超皮質性感覚性失語と診断した。

入院時の頭部 MRI (Fig. 2): 拡散強調画像、T2 強調画像にて左中前頭回後部に限局した高信号域がみられた。MRA で

*Corresponding author: 自治医科大学内科学講座神経内科部門 [〒329-0498 栃木県下野市薬師寺 3311-1]

¹⁾自治医科大学内科学講座神経内科部門

²⁾昭和大学医学部内科学講座神経内科部門

(受付日: 2008 年 2 月 19 日)

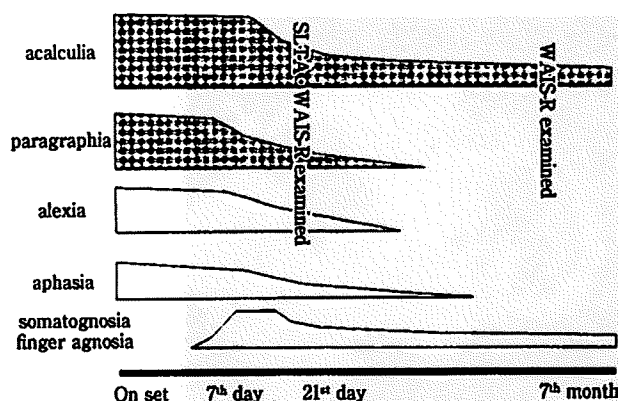


Fig. 3 Clinical course.

なかった。「青い空」「海にヨットがうかんでいます」といった簡単な文章の書きとりについては、漢字・ひらがな・カタカナをもちいて可能であった。文章の読みでは、内容が理解できず何度も読み返す必要があり、とくにひらがなでその傾向が強かった。また、この時点においても手の親指を指示させても示すことができなかった。

発症21日後、 $18 \div 3$ などの繰り上がりのある足し算、 4×3 程度のかけ算、 $9 \div 3$ 、 $8 \div 4$ など一桁の割り算はできるようになったが、 $12 - 7$ という引き算はできなかった。

発症22日にSLTA (Standard Language Test of Aphasia) を施行した。障害は計算と書きに強く、計算では正答が9/20、書き命令にしたがう項目で6/10と高度に低下がみられ、口頭命令にしたがう項目で9/10、単文以上の読解で8/10、語の列挙で9/10、仮名単語の書きの項目で4/5と軽度の低下がみとめられた。

発症23日にWAIS-R (Wechsler adult intelligence scales-revise) を施行し、verbal IQ 91, performance IQ 85, total IQ 87であった (Fig. 4)。知識や語彙力に問題はないが、抽象化、時間的順序因果関係の予測が困難であった。象や手指の形を完成させるパズル問題にて本人は完成像がわかっているにもかかわらず完成できないという症状がみられた。

同日施行した ^{18}F -IMP SPECTでは、左中前頭回中心にその前方の前頭葉広範領域、さらに同側の下頭頂小葉 (角回、縁上回) 周囲と反対側小脳に血流低下がみられた (Fig. 5)。

発症7ヵ月後にWAIS-Rを再施行したところ全体的に改善をみとめ (Fig. 4)、とくに言語性検査での語彙に関する項目においては平均以上に改善しており、この時点で失語は消失しているものと判断した。しかし、 $53 - 7$ 、 $13 + 12$ 、 16×3 、 $84 \div 4$ などの四則演算についてはかなりできるようになっていたが、 $42 \div 7$ ができないなど失計算は依然残存していた。

考 察

本症例は左前頭葉梗塞により高度の失算、失書を呈し、手指失認がうたがわれた不全型 Gerstmann 症候群および超皮質性感覚失語を呈した症例である。これら症状の組み合わせは

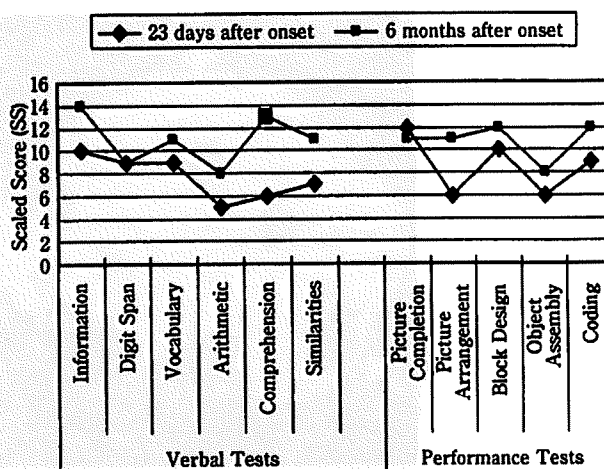


Fig. 4 Results of WAIS-R examination.

The first examination was performed on 23 days after onset, the total IQ being 87, verbal IQ 91 and performance IQ 85, and the second one on 6 months after onset, the total IQ being 107, verbal IQ 105 and performance IQ 106.

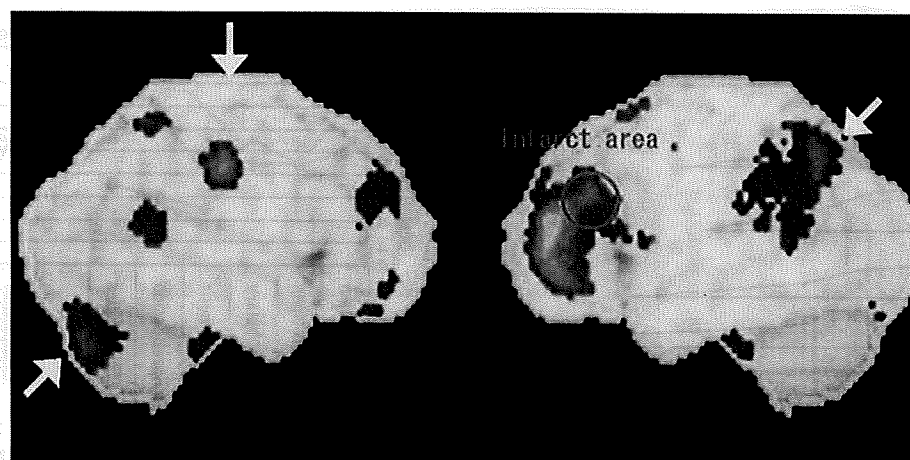
The second examination revealed prominent improvement in comparison with the first, especially in comprehension, similarities and picture arrangement. But obvious improvement could not be seen in arithmetic and object assembly.

通常優位側頭頂葉の病変を示唆するものである。本例においてMRIで確認された梗塞巣は左中前頭回後部に限局していたが、脳血流シンチグラム (^{18}F -IMP SPECT) ではMRI病変を中心にその前方の前頭葉広範領域、さらに反対側小脳にも血流低下がみとめられていた。MRAでは梗塞巣の領域以外に血流低下をきたすような狭窄病変は確認されなかった。これらの結果は左中前頭回後部の梗塞により、同部位と神経結合を有する下頭頂小葉 (縁上回、角回) へいたる経路の機能障害をきたした (遠隔機能障害 (diaschisis)) 可能性を示唆するものである。

失算、失書の個別の検討では優位半球中前頭回後部領域の障害でそれぞれが単独に発症しうることが報告されているが、本症例のように失算と失書の両方を呈し、Gerstmann 症候群類似の症状をみとめた症例報告はまれである^{1)~4)}。本症例をふくめて報告された症例すべてに超皮質性の運動性もしくは感覚性の失語がみとめられている。また、これらの症例のうち脳血流をシンチグラムにて評価したのは2例である³⁾⁴⁾が、いずれの症例でも本症例にみられた遠隔機能障害を示唆する所見は指摘されていない (Table 1)。

これまで報告されている Gerstmann 症候群とされる症例の多くは経過中に失語が合併しており、Gerstmann 症候群における失算・失書と失語との独立性についてはかなり以前より議論がなされている⁵⁾。近年失語をみとめないいわゆる「pure Gerstmann's syndrome」が報告されるようになってきているが^{6)~9)}、その中には角回周辺に病巣がない症例もふくまれる⁶⁾。

本症例についても急性期に超皮質性感覚失語を呈した。

Fig. 5 ^{123}I -IMP SPECT (3D-SSP) on the 23rd hospital day.

Cerebral blood flow decreased in not only the infarction lesion but also the ipsilateral inferior parietal lobe, cerebellar cortex and contralateral premotor area (arrows).

Table 1 Reported cases of acalculia and aphasia due to left frontal lobe injury (including Gerstmann syndrome).

	Patient (age/sex) (all: right handed)	Injury portion and origin	Acalculia	Agraphia	Aphasia	Duration of impairment
Mabuchi Y. et al (1995)	55/M	left frontal lobe-insula /infarction	+	++/kana > = kanji	++/transcortical sensory	over 16 months
Miyake Y. et al (1997)	31/F	left middle frontal gyrus /brain tumor operation	++	+ /kana < kanji	—	2 months
Okazaki T. et al (1997)	77/M	left frontal lobe, partial parietal lobe/infarction	+	++	+ /transcortical motor	over 13 months
Tohgi H. et al (1995)	59/M	left middle frontal gyrus/infarction	+	++/kana >> kanji	+ /transcortical motor	over 7 weeks
This case	65/M	left psoterior area of mid- dle frontal gyrus/infarction	++	+ /kana = kanji	+ /transcortical sensory	over 7 months

超皮質性感覚性失語は通常、頭頂葉と側頭葉の境界領域の障害で生じるといわれているが、中・下前頭回後部や中心前回下部などの前頭葉病変でもおこるとの報告もあり¹⁰⁾、この点は本症例に合致する。

本症例の失算は発症当初には失語の影響を受けている可能性が否定できないが、失語がみとめられなくなった後も持続しており、改善はあるものの発症後7カ月の長期にわたり障害がみとめられていたので、失語とは独立した症候であったものとする。

演算操作が障害される失演算の責任病巣として優位半球の角回、頭頂間溝周辺の皮質・皮質下白質、大脳基底核などが知られ、左頭頂葉病変で失算のみを呈する症例の報告もあり¹¹⁾、計算機能の責任部位として優位側頭頂葉の果たす役割は大きいと思われる。一方、最近の脳機能画像研究では両側大脳皮質のさらに広い領域が計算に関与していることが示されており、より複雑な計算をおこなうためには左頭頂葉だけではなく左下前頭回を中心とした前頭葉後部領域も活動すると考えられている^{12)~14)}。また計算のプロセスでは、視覚や聴覚情報からの入力をもとに演算処理をおこなうが、その間その情

報を保持し続ける必要がある。この際に主に前頭連合野の機能であるワーキングメモリーの関与が大きくとくに中前頭回の重要性が報告されている¹⁵⁾。われわれの症例は「計算しようとする数字が頭の中から消えてしまう。」と表現しており、ワーキングメモリーの障害の結果として失算が生じた可能性も否定はできない。本症例でみられた失計算が下頭頂小葉(縁上回、角回)、または前頭葉後部領域のいずれか、あるいは両者の障害によるのかを判断するのは難しいが、失算の責任病巣として両領域いずれの可能性も否定できない。

発症初期には錯書が明らかで、文字そのものの形態異常はほとんどみられず書きまちがいや語順の入れ替え、不必要な文字のくりかえしなどがみられた。また、読書をしていても内容が理解できないという失読症状もみられ、発症22日のSLTAでは書字命令にしたがう項目で高度の低下が、単文以上の読解、仮名単語の書字でも障害がみとめられた。

本症例にみられた失書や失読は、左中前頭回後部の梗塞により同部位と神経結合を有する下頭頂小葉にいたる経路の機能障害をきたしたために生じた可能性が考えられる。しかし通常、角回病変による失読失書では仮名一文字レベルでの障