

後の課題に言及した。

文献

- 1) Shiraki H and Yase Y: Amyotrophic lateral sclerosis in Japan. In: Handbook of Clinical Neurology, Vol. 22, System disorders and atrophies, Part II (Vinken PJ, Bruyn GW and Klawans HL ed) pp353-419, North Holland Publishing Company, Amsterdam, 1975
- 2) Kuzuhara S, Kokubo Y: Atypical parkinsonism of Japan: amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism-dementia complex of the Kii peninsula of Japan (Muro disease): An update Mov Disord 2005;20(Suppl. 12):S108-S113
- 3) Kuzuhara S, Kokubo Y, Sasaki R et al: Familial amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia complex of the Kii peninsula of Japan: clinical and neuropathological study and tau analysis. Ann Neurol 2001; 49:501-511
- 4) Galasko D, Salmon D, Gamst A, et al: Prevalence of dementia in Chamorros on Guam. Relationship to age, gender, education, and APOE. Neurology 2007;68:1772-1781
- 5) Geser F, Winton MJ, Kwong LK, et al: Pathological TDP-43 in parkinsonism-dementia complex and amyotrophic lateral sclerosis of Guam. Acta Neuropathol 2008; 115:133-145
- 6) 葛原茂樹: 紀伊半島 ALS/PDC と TDP-43. 神経内科 2008;68:565-570
- 7) Yase Y: The pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. Lancet 1972; 2: 292-296.
- 8) 葛原茂樹: 紀伊半島・グアム・ニューギニアの ALS・パーキンソン・認知症症候群. 神経心医学 2009;25:182-191

F.健康危険情報

なし

1. 論文発表

原著

1. Hara k, Kokubo Y, Ishiura H, Fukuda Y, Miyashita A, Kuwano R, Sasaki R, Goto J, Nishizawa M, Kuzuhara S, Tsuji S: TRPM7 is not associated with amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism dementia complex in the Kii peninsula of Japan. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 2010 ; 153B: 310-3

著書

1. 葛原茂樹: 内科学書 改訂第7版 Vol.6 血液・造血器疾患 神経疾患 神経変性疾患. 中山書店 p293-295, 2009

総説

1. 葛原茂樹: カラーグラフ 目で見るパーキンソン病診療の進歩. 日本医事新報 4460:65-68, 2009
2. 葛原茂樹: 紀伊半島グアム・ニューギニアの ALS・パーキンソン・認知症症候群. 神経心理学(学会セミナー2) 25:182-191, 2009
3. 葛原茂樹: パーキンソン病の病態生理 老年精神医学雑誌 19:1171-1177, 2008
4. 葛原茂樹: ALS患者の脳と脊髄への TDP-43 蛋白の異常蓄積と TDP-43 遺伝子変異の発見. 難病と在宅ケア 14:31-33, 2008
5. 葛原茂樹: ALS研究の最近の進歩: ALS と TDP-43. 臨床神経 48:625-633, 2008
6. 葛原茂樹: TDP-43 と神経変性疾患 紀伊半島 ALS/PDC と TDP-43. 神経内科 68:565-570, 2008

2. 学会発表

1. 葛原茂樹: パーキンソン病をめぐる最近の話題と治療の進歩. 第106回日本内科学会総会・講演会 招請講演、東京 4.12. 2009
2. 葛原茂樹: ALSの病態解明における TDP-43の意義 第27回日本神経治療学会総会教育講演、熊本 6.12, 2009

国際学会

1. Kuzuhara S: ALS/PD complex in Kii peninsula. Third International Research Workshop on Frontotemporal Dementia and Amyotrophic Lateral Sclerosis. London, Ontario, Canada, June 22, 2009

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

ALS 多発地における栄養摂取状況の解明に関する疫学的研究

岡本 和士¹⁾

紀平 為子²⁾、江上いすず³⁾、小久保 康昌⁴⁾、

¹⁾ 愛知県立大学看護学部・疫学

²⁾ 関西医療大学、³⁾ 名古屋文理大学、⁴⁾ 三重大学医学部・神経内科

研究要旨

本研究の目的は、紀伊半島における神経難病の原因の解明とこの病気の発症予防に寄与することを目的に、多発地と知られている和歌山県 K 地区と三重県 H 地区に居住する 20 歳以上の全住民を対象に郵送法によるアンケート調査を行い、食習慣および栄養摂取状況を把握することにある。栄養摂取量では K 地区と H 地区に顕著な差は認められなかった。しかし全国に比べ、糖質摂取割合は高く、脂質及びタンパク質摂取割合、抗酸化に関連するミネラル(亜鉛、マンガンなど)やビタミン諸量の摂取量は少なかった。食品摂取量に関して、魚類及び砂糖類の摂取量以外全国に比べその摂取量は少なかった。これらの結果から、高糖質摂取のような神経に対する攻撃因子(ストレス)と抗酸化に関連するミネラルやビタミン諸量の低摂取量のような防御因子(抗酸化力)のバランスの崩れた状態、すなわち防御因子よりも攻撃因子が優位な状態にある可能性が示唆されたことから、多発地に対する発症予防を目的とした栄養学的な介入の必要性が考えられた。

A. 研究目的

紀伊半島南部は、神経難病である筋萎縮性側索硬化症と認知症を伴うパーキンソン症候群の多発地帯であることが、以前から知られている。さらに、本地域にはパーキンソン病に似た運動障害と認知症を特徴とするパーキンソン認知症複合と呼ばれる疾患も多く見られる。これまでに飲み水や食べ物などの環境要因に関する調査研究は行われてきたが、未だその原因は不明である。そこで、本研究の目的は、紀伊半島における神経難病の原因の解明とこの病気の発症予防に寄与することを目的に、多発地と知られている和歌山県 K 地区と三重県 H 地区に居住する 20 歳以上の全住民を対象に郵送法によるアンケート調査を行い、食習慣および栄養摂取状況を把握することにある。

B. 研究方法

1. 調査対象：和歌山県 K 地区と三重県 H 地区とも住民基本台帳から抽出された 20 歳以上の全住民を対象とした。

2. 調査方法：調査は郵送による自記式のアンケート調査を行った。調査用紙の配布は事務局か

ら直接対象者に配布し、回収は直接事務局（愛知県立大学）への郵送とした。調査期間は約 1 ヶ月間とした。調査票の調査項目として、1) 生活習慣関連要因、2) 身体的および精神的ストレス関連項目を用い、さらに 3) 栄養摂取状況については食品摂取頻度調査票を用いた。

本研究計画は愛知県立看護大学倫理委員会の承認を受けた。

C. 研究結果

1. 回収状況について

K 地区では 2956 件に対し 526 件で回収率 17.8%、M 地区では 1096 件に対し 206 件で回収率 18.8%であった。

表 1 回収状況

| | K 地区 | H 地区 |
|---------|-------|-------|
| 発送数 | 2956 | 1096 |
| 回答者数 | 526 | 206 |
| 回答率 | 17.8% | 18.8% |
| 栄養調査回答者 | 521 | 176 |

2. 食生活関連要因の比較

野菜を好んで食べるおよび地元でとれた食材を半分以上使用するおよび割合は両地域ともほぼ同様であった。しかし、イタドリやゼンマイを食べる割合はK地区がM地区に比べ高かった。

表1 食生活習慣の比較

| | K地区 (n=515) | H地区 (n=189) |
|--------------|----------------|----------------|
| 色のついた野菜を食べる | 66.1% | 60.8% |
| 地元の食材を半分以上利用 | 42.1 | 38.0 |
| イタドリやゼンマイの摂取 | 32.0 | 9.0 |

3. 栄養摂取状況の比較について

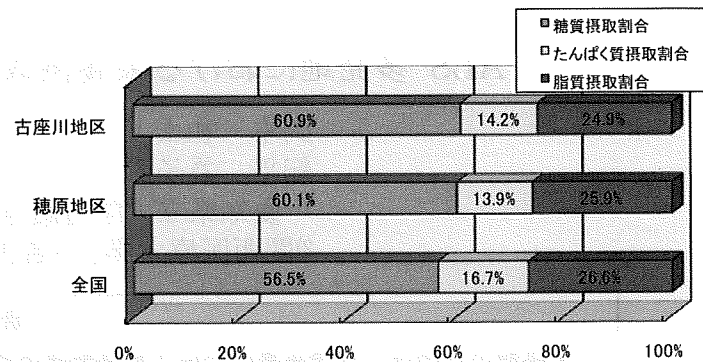
①栄養摂取量について

K地区とM地区の間で三大栄養摂取量、カルシウム、マグネシウム、鉄、銅、亜鉛、マンガンおよびビタミンB12を除くビタミン諸量に有意な差はなかった。平成18年の20歳以上の国民健康・栄養調査結果(以下全国)との比較では、それらの摂取量はいずれも低い傾向にあった

表2 栄養摂取量の比較

| | K地区 | H地区 | 全国 |
|----------|-------|-------|-------|
| エネルギー摂取量 | 1947 | 1963 | 1906 |
| 糖質 | 276 | 279 | 267.4 |
| 脂質 | 54.6 | 57.6 | 53.3 |
| タンパク質 | 69.3 | 68.7 | 70.0 |
| カルシウム | 555.0 | 551.2 | 520 |
| マグネシウム | 254.7 | 256.0 | 255 |
| 亜鉛 | 8.2 | 8.3 | 8.4 |
| 鉄 | 7.3 | 7.5 | 8.2 |
| 銅 | 1.15 | 1.15 | 1.21 |
| マンガン | 2.78 | 2.78 | 3.8 |
| コレステロール | 307.3 | 331.7 | 322 |
| ビタミンA | 53.1 | 52.8 | 1906 |
| ビタミンB1 | 0.84 | 0.83 | 267.4 |
| ビタミンB2 | 1.03 | 1.04 | 53.3 |
| ビタミンB6 | 1.18 | 1.12 | 70 |
| ビタミンB12 | 9.5 | 8.5 | 520 |
| ビタミンC | 97 | 95 | 255 |
| ビタミンD | 11.9 | 10.6 | 8.4 |
| ビタミンE | 7.7 | 8.0 | 8.2 |
| 葉酸 | 278 | 276 | 1.21 |
| 食物繊維 | 12.9 | 13.2 | 3.8 |

さらに、三大栄養素の摂取割合の比較では、K地区とM地区の糖質)は全国の結果に比べ高く、タンパク質および脂質は全国に比べ低かった。



②食品摂取量について

K地区の魚類及び砂糖類の摂取量のみM地区に比べ有意に高かったが、総食品摂取量およびその他の食品摂取量では有意差は認められなかった。

全国との比較では、K地区およびM地区の総食品摂取量は少なかった。しかし、全国では嗜好飲料の摂取量が顕著に高かったため、それを除いて比較しても両地区ともその摂取量は低かった。

各食品摂取量での比較では、全国に比べ魚類及び砂糖類の摂取量のみK地区およびM地区にて高かったが、その他の食品摂取量はいずれも低かった。

表3 食品摂取量の比較

| | K地区 | H地区 | 全国 |
|--------|-------|-------|-------|
| 総食品摂取量 | 1447 | 1421 | 2174 |
| 穀類 | 464.4 | 455.3 | 524.0 |
| 豆類 | 60.5 | 64.0 | 60.2 |
| 乳類 | 152.3 | 149.1 | 208.5 |
| 魚類 | 107.3 | 91.4 | 86.2 |
| 肉類 | 53.7 | 57.6 | 77.2 |
| 野菜類 | 224.1 | 216.4 | 239.0 |
| 果実類 | 102.4 | 105.2 | 110.1 |
| 油脂類 | 10.8 | 12.4 | 10.4 |
| 砂糖類 | 13.4 | 10.1 | 7.4 |
| 嗜好飲料 | 155.4 | 135.7 | 696.4 |

③食品摂取割合について

嗜好飲料を除いた食品摂取量の総食品摂取量に対する割合の比較では、いずれの食品摂取割合はK地区およびM地区に有意差はなかった。しかしK地区およびM地区の魚類、野菜類、油脂類及び砂糖類の摂取割合は全国に比べ高かった。

表4 食品摂取割合の比較

| | K地区 | H地区 | 全国 |
|--------|--------|--------|--------|
| 総食品摂取量 | 100.0% | 100.0% | 100.0% |
| 穀類 | 35.9 | 35.4 | 35.4 |
| 豆類 | 4.7 | 5.0 | 4.1 |
| 乳類 | 11.8 | 11.6 | 14.1 |
| 魚類 | 8.3 | 7.1 | 5.8 |
| 肉類 | 4.2 | 4.5 | 5.2 |
| 野菜類 | 17.3 | 16.8 | 16.2 |
| 果実類 | 7.9 | 8.2 | 7.4 |
| 油脂類 | 0.8 | 1.0 | 0.7 |
| 砂糖類 | 1.0 | 0.8 | 0.5 |

D. 考察

本研究において、ALSの多発地であるK地区およびM地区とも全国に比べ糖質摂取割合は高く、タンパク質及び脂肪摂取割合は低かった。さらに、神経や神経細胞に障害を与える活性酸素を取り除く役割を持つミネラルとして知られている亜鉛やマンガンの摂取量および、抗酸化ビタミンとして知られているビタミンA、ビタミンB1、ビタミンCおよびはビタミンEの摂取は低かった。この結果は、ALSの症例対照研究において認められた糖質の高摂取割合群は低摂取割合に比べオッズ比は有意に高いとする報告、食品摂取量において野菜及び果物全体および果物摂取量および緑黄色野菜摂取量での高摂取群は低摂取群に比べオッズ比は有意に低く、さらに抗酸化ビタミンにおいて、 β -caroteneのみ高摂取群では低摂取群に比べオッズ比は有意に低いとする報告とほぼ一致していた。高糖質摂取ではフリーラジカルの生成やsuperoxideやnitric oxide (NO-)の過剰産生を介し細胞のアポトーシスを誘発することが、一方、脂質では神経保護作用を有すること報告されている。

以上、本研究にて、栄養における疫学特性としてK地区とM地区共通に①糖質摂取割合が高いこと②食品摂取量が少ないため、絶対的なビタミン、ミネラルの摂取量の不足③神経髄鞘の保護作用を有する脂質摂取量および摂取割合が低いことが認められた。しかし、本研究では、多発地の比較対照として、全国の栄養結果を用いたため、今後この妥当性の高い疫学特性の妥当性を得るためには、対照地区との比較検討の必要性が考えられた。

しかし、今回、両地区共通の栄養に関する疫学特性が得られたこと、さらにこの疫学特性が症例対照研究とほぼ一致した結果であったことから、多発地においては、栄養面において神経に対する攻撃因子（ストレス）と防御因子（抗酸化力）のバランスの崩れた状態、すなわち防御因子よりも攻撃因子が優位な状態にある可能性が示唆された。

E. 結論

多発地である両地区共通の疫学特性から、栄養摂取状況に限った場合でも、神経に対する攻撃因子（酸化ストレス）と防御因子（抗酸化力）のバランスの崩れた状態、すなわち防御因子よりも攻撃因子が優位な状態が示唆されたことから、多発地に対する発症予防を目的とした栄養学的な介入の必要性が考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Okamoto K, Kihira T, Kondo T, Kobashi G, Washio M, Sasaki S, Yokoyama T, Miyake Y, Sakamoto N, Inaba Y, Nagai M, Nutritional status and risk of amyotrophic lateral sclerosis in Japan, Amyotroph Lateral Scler.2007; 8 : 300-304.

2. Kihira T, Kanno S, Miwa H, Okamoto K, Kondo T, The role of exogenous risk factors in amyotrophic lateral sclerosis in Wakayama, Japan, *Amyotroph Lateral Scler.* 2007; 8 : 150-156.
3. Okamoto K, Kihira T, Kondo T, Kobashi G, Washio M, Sasaki S, Yokoyama T, Miyake Y, Sakamoto N, Inaba Y, Nagai M, Fruit and Vegetable Intake and Risk of Amyotrophic Lateral Sclerosis in Japan, *Neuroepi.* 2009; 32 : 251-256.
4. Okamoto K, Kihira T, Kondo T, Kobashi G, Washio M, Sasaki S, Yokoyama T, Miyake Y, Sakamoto N, Inaba Y, Nagai M, Lifestyle Factors and Risk of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Case-Control Study in Japan, *Ann Epidemiol.* 2009; 19 : 359-364.

2.学会発表

1. 岡本 和士、紀平為子、近藤智善、阪本 尚正、小橋 元、鷺尾 昌一、三宅 吉博、横山 徹爾、佐々木 敏、稲葉 裕、永井正規. 筋萎縮性側索硬化症発症関連要因解明に関する疫学的研究. 日本疫学会. 2008、東京.
2. Okamoto K , Kihira T, Fruits and vegetable intake and risk of amyotrophic lateral sclerosis in Japan. 第19回 ALS/MND 国際シンポジウム. 2008. Birmingham
3. Okamoto K , Kihira T, Dietary pattern and risk of amyotrophic lateral sclerosis in Japan. 第20回 ALS/MND 国際シンポジウム. 2009. Berlin

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

| 種別 | 件数 | 出願年 | 権利の帰属先 |
|--------|----|-----|--------|
| 特許 | 0 | 0 | なし |
| 実用新案 | 0 | 0 | なし |
| 商標 | 0 | 0 | なし |
| 意匠 | 0 | 0 | なし |
| 特許出願 | 0 | 0 | なし |
| 実用新案出願 | 0 | 0 | なし |
| 商標出願 | 0 | 0 | なし |
| 意匠出願 | 0 | 0 | なし |

古座川地区の生活習慣と環境要因に関する調査—特に最近の変化について

紀平為子¹⁾、吉田宗平¹⁾、岡本和士²⁾、小久保康昌³⁾

1: 関西医療大学保健医療学部、2: 愛知県立大学看護学部、
3: 三重大学大学院医学系研究科神経病態内科学

「研究趣旨」 和歌山県古座川地域は筋萎縮性側索硬化症(ALS)の多発地であるが、1960年代に比し最近では、ALS発症率が減少していることから、発症に環境要因や生活習慣の関与が推察されている。本研究では、古座川地域のALS発症率の変化を明らかにし、疾患に関連すると推察される外的要因として、生活習慣と飲用水の水質につき検討した。ALS発症率は、1960年代に比し2000年代で約1/3に減少を認めた。しかし、女性では2000年代の年齢性調整発症率が高値であった。さらに1960年代から1990年代までALS発症が認められなかった大島地区で2000年代にALS 2例、臨床的にALS/PDCと考えられる1例を認めた。生活習慣と水質調査では、古座川地区の飲用水中Ca含量は1960年代と同様低値を示し、住民の血中Ca値も対照に比し低値を示した。大島地区では1975年以降古座川を水源とした水道水を飲用としているが、今回の調査で同地区水道水のCa含量は低値を示すことが明らかになった。また、ALS発症頻度減少が臨床病型の変化による可能性につき検討するため、認知症スクリーニングを試みた。今後さらに環境の変化とALS発症の関連につき経時的に調査を継続し検討する必要がある。

A. 研究目的

和歌山県古座川地域では筋萎縮性側索硬化症(ALS)の発症率が1960年代に比し最近減少していることから、発症に環境要因や生活習慣の関与が推察されている。Gene-environmental interactionがALSの病因として注目されているが、多発地住民が仮に何らかの遺伝的素因を有するとしても、環境や生活習慣の変化で発症が抑制されるならば、この危険因子を探索することが多発地以外のALS発症予防にも繋がると期待される。本研究では、古座川地域のALS発症率の最近の変化を調査し、さらに疾患に関連する外的要因として生活習慣と飲用水の水質につき検討した。

B. 研究方法

1) ALS発症率の変化について、古座川町、串本町(大島地区を含む)でALS症例の診察と臨床症状の登録を継続した。同地区のALS調査は、和歌山県立医科大学木村、八瀬らを中心として継続的に実施されてきたが^{1,2)}、1967年から2008年間のうち以下に示す3期間では同一の調査方法にてALS頻度調査が実施された。このALS調査結果の記録から、年齢、性で補正した調整発症率を算出し、年代による頻度の変化を検討した。調査期間は、1967年から1971年間(第I期)³⁾、1989年から1999年間(第II期)、2000年から2008年間(第III期)である。調査方法は、地域の医師や保健師と役場職員に面接して情報収集し、対象疾患をもつ可能性のある住民を訪問診察するという方法で行った。本研究では症例の選択基準として、次の1)-3)を満たすこととした。1) El Escorial criteria ALS診断基準でprobableとdefinite ALS例とし、原発性側索硬化症、脊髄性進行性筋萎縮症(SPMA)、および痙性対麻痺と考えられる症例は除外した。2)生年月

日、発症年齢、初発症状、転帰が明らかな症例で、K地域出身・居住者であるALS症例のうち、同地域に18年以上居住歴を有するALS症例は採用し、それ以外のALS症例は除外した。3)パーキンソン症状や認知症で発症し、その後El Escorial criteria ALS診断基準を満たした症例も対象疾患として含めた。

2)住民の栄養調査

対象は、古座川町住民と、対照として1975年から2009年までALSの症例を認めていない和歌山県内山間部の花園地区住民とした。両地域住民には、住民検診に際し文書による同意を得て、生活習慣と食習慣に関するアンケート調査を面接法で実施した。さらに、血清元素分析、糖、蛋白、脂質などの生化学検査を実施した。

3)水質調査では、河川、水道水、井戸水のCa, Mg, Cu, Zn, Fe, Al, Mn, Mo, Se, Pb, HgについてICP発光分析とICP質量分析を行った。

4)住民の認知症スクリーニング調査の検討

古座川地区、穂原地区(紀伊半島のもう一つのALS/PDC多発地)、花園地区の20歳以上の全住民を対象に、認知症スクリーニングを目的とした自覚的症狀のアンケート調査を2009年10月から12月まで、郵送法自記式にて行った。アンケート票は群馬大学山口晴保先生から許可を得て「日常生活チェックリスト」を使用した⁴⁾。全質問項目は13あり、各質問項目はA, B, C, Dの4領域に分かれる。複数の領域に該当があると認知症が疑われるとされる

C. 研究結果

1) ALS発症率の変化について

古座川町における I, II, III 期の年齢性調整発症率 (2000 年の全国国勢調査人口を用いた) を算出した (表 1)。I 期に比し III 期では ALS 発症率は約 1/3 に減少を認めた。しかしながら、男女別に年齢性調整発症率をみると女性で III 期に著明な増加が認められた。臨床症状の比較では、I 期に比し III 期では、高齢化と男女比の逆転、球症状初発例の増加が認められた (表 2)。III 期に古座川町で新規の 3 症例、さらに 1960 年代から 1990 年代まで ALS 症例を認めなかった大島地区で III 期に新たな 3 症例が認められた。

表 1. 古座川町の ALS 発症率の年代による変化

| 期間 | 粗発症率 | 調整発症率 (M/F 比) (2000 census) | 95%CI |
|-----|------|-----------------------------|-------------|
| I | 6.0 | 12.4 (20.7/5.1) | -2.7, 12.0 |
| II | 3.8 | 9.4 (17.7/2.4) | -22.2, 53.0 |
| III | 5.7 | 4.5 (0/8.8) | -17.9, 26.9 |

I 期: 1967 年から 1971 年間、II 期: 1989 年から 1999 年間、III 期: 2000 年から 2008 年間 (第 III 期)。

表 2. 古座川地区、串本地区 ALS 症例の臨床症状

| 期間 | 患者数 | 発症年齢 (Mean ± SD) | 初発症状 (%) | | | パーキンソン症状、認知症、その他 |
|-----|-----|------------------|----------|-----|------|------------------|
| | | | U | L | B | |
| I | 10 | 54.9 ± 10.9 | 80 | 20 | 0 | 0 |
| II | 11 | 59.8 ± 11.3 | 36.4 | 9.1 | 18.2 | 36.4 |
| III | 12 | 68.6 ± 12.7 | 33.3 | 25 | 25 | 16.7 |

U: 上肢症状、L: 下肢症状、B: 球麻痺症状

2) 住民の栄養調査と血液検査

食習慣アンケートでは、古座川町住民 138 名、対照である花園地区住民 169 名から有効回答があった。古座川町住民では花園地区住民に比し糖摂取比率が高く脂質摂取比率の低値を認めた (図 1)。

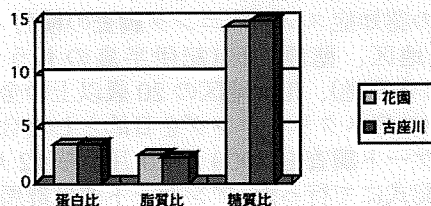
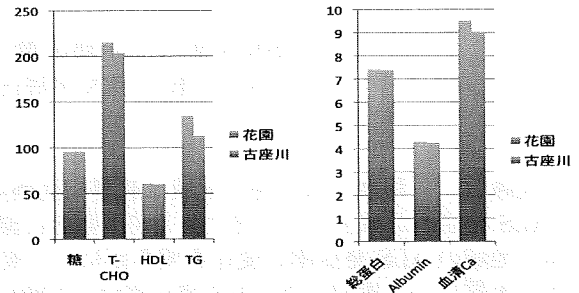


図 1. 総エネルギーに対する栄養摂取比率

血中栄養素と Ca, Mg などミネラルの測定は、古座川町住民 198 名、対照である花園地区住民 183 名に実施した。古座川町住民では花園地区住民に比し血清

総コレステロール値、中性脂肪、およびアルブミン値の低値と、血清 Ca 値の低値を認めた (図 2)。同地域住民のアルブミンによる補正 Ca 値も低値であった。

図 2. 血清中の栄養素、ミネラルの検討
3) 水質調査



水質の Ca 含量は、古座川町水道水では平均 4.2ppm、同井戸水 2.7ppm であり、花園地域水道水平均 11.8ppm、同井戸水 14.0ppm に比し低値を示した。Mg 含量も同様の傾向であったが、著明な変化は認めなかった。その他 Al, Fe, Mn, Cu, Zn, Mo, Pb, Hg は微量検出あるいは検出限度以下で、地区による差異は認めなかった。

大島地区では 1975 年から利用されている水道水の Ca 含量は平均 3ppm と低値を示した。一方大島地区の井戸水の Ca 含量は、24.3ppm、大島地区内の河川 (大川) 10.7ppm、山からの採り水 (天水) 6.4ppm であり、対照地区と同様の高値であった。

4) 認知症スクリーニング調査の検討

古座川町 526 人 (平均年齢 ± SD 68.1 ± 14.3 歳)、穂原 206 人 (63.1 ± 16.6 歳)、花園 66 人 (55.1 ± 13.9 歳) から回答を得た (回収率各々 17%, 17%, 11%)。質問は 13 項目、4 領域に分かれ、複数の領域に該当があると認知症が疑われるとされる。本研究では、総得点と領域数を年齢カテゴリー毎に検討した。3 地区住民で、総得点、領域数に有意な差を認めなかった (図 2)。領域数は 50 歳代では平均 1.5、80 歳代では平均 2 であった。総得点は 50 歳代平均 2.5、80 歳代で 3.5 であった。各領域の比較では D 領域において、穂原地区住民が有意に高い点数を示した ($p < 0.05$, 図 3)。

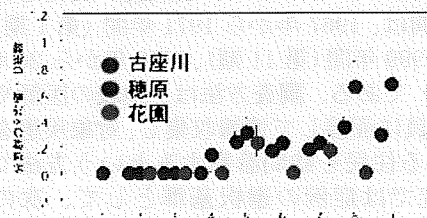


図 3. 認知症スクリーニング「日常生活チェックリスト」における D 領域の点数の比較

D. 考察

古座川地区における ALS の年齢調整発症率は 2000-2008 年間で年平均 4.5/10 万人であり、1960 年代に比し約 1/3 に減少した。しかし女性の発症率は 8.8/10 万人と高値を認めた。臨床病型では、2000 年代では、発症年齢の高齢化、球症状で初発する割合の増加、男女比の逆転が認められ、これは小久保らによる穂原地区症例の結果と同様であった⁵⁾。さらに本研究では、1960 年代から 1990 年代まで ALS 発症が認められなかった大島地区で、2000 年以降 ALS 2 例、臨床的に ALS/PDC と考えられる 1 例の新規 3 症例の発症が明らかになった。大島地区では従来飲用水として天水、「山からの採り水」、井戸水などを利用していたが、1975 年古座川を水源とした水道設備が完備され、現在ではほぼ全戸で水道水を利用している。今回測定した大島地区の天水や「山からの採り水」、井戸水の Ca, Mg 濃度は対照地区とほぼ同様高値であったが、水道水中の Ca, Mg 濃度は古座川地区の水道水、河川水と同様に低値であった。大島地区での新規症例は発症年齢平均 77 歳であり、新規発症の要因として、ひとつには高齢化の影響が考えられる。また、大島地区で飲用水の水源が変更されたことも環境変化としては大きいと考えられる。今後さらに大島地区での ALS 調査と病型、とくに認知症やパーキンソン症状を呈する ALS 例の有無の調査をする必要がある。認知症スクリーニングとして今回使用したアンケート票は、回答者から簡便で回答しやすいとの返答を得た。3 地区で明らかな差異を認めなかったが、自記式であった点が問題と考えられた。今後さらに、住民検診などの機会を利用して、本アンケート票と MMSE や HDS-R などの認知症検査を組み合わせた検討が必要である。

次に、栄養調査として古座川地区住民の血液検査では対照に比し血清 Ca と血清総コレステロールの低値を認めた。古座川地区では飲用水中の Ca 低値が以前より指摘されてきたが、住民の血清 Ca 低値は我々の研究で初めて明らかにされた。また、食習慣アンケート調査では、食事中の脂質摂取比の低値と Ca 摂取量の不足が認められた。古座川地区住民では、食品や飲用水からの摂取量低下に由来する血清 Ca やその他の栄養素不足があると考えられ、栄養指導などの介入と今後の経過観察が必要と考えられる。

E. 結論

飲用水中の Ca 低値、血清 Ca 低値、食物摂取割合の不均衡が古座川地区住民の特徴であり、ALS 発症に関連する環境・生活要因である可能性が考えられた。今後さらに本地域の症例を集積し検討する必要があると考えられた。

文献

- 1) Kimura K. Studies of amyotrophic lateral sclerosis in the Kozagawa district in the Kii Peninsula. *Jpn Wakayama Med J.* 9: 177-19, 1965
- 2) Yase, Y. The pathogenesis of amyotrophic lateral

sclerosis. *The Lancet* II: 292-296, 1972

- 3) 松本宣光：紀伊半島南部牟呂地方における筋萎縮性側索硬化症の疫学的・遺伝学的研究。和歌山医学 18: 33-45, 1967
- 4) 山口晴保編著「認知症の正しい理解と包括的医療・ケアのポイントー快一徹！脳活性化リハビリテーションで進行を防ごう」協同医書出版社、2005 年より) pp186-190.
- 5) 小久保康昌、葛原茂樹。紀伊半島多発地域の筋萎縮性側索硬化症とパーキンソン痴呆複合の臨床神経学および神経病理学的検討。臨床神経学 41: 769-774, 2002.

F. 健康危険情報 該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1-1. Kihira T, S Yoshida, K Okamoto, Y Kazimoto, M Ookawa, K Hama, H Miwa, T Kondo. Survival rate of patients with amyotrophic lateral sclerosis in Wakayama Prefecture, Japan, 1966 to 2005. *J Neurol Sci* 2008; 268: 95-101.
- 1-2. Okamoto K, Kihira T, Kobashi G, et al. Fruit and vegetable intake and risk of amyotrophic lateral sclerosis in Japan. *Neuroepidemiology* 2009; 32: 251-256.
- 1-3. Kihira T, Suzuki A, Kondo T., et al. Immunohistochemical expression of IGF-I and GSK in the spinal cord of Kii and Guamanian ALS patients. *Neuropathology*, 2009; 29: 548-558.

2. 学会発表

- 2-1. 近藤智善、紀平為子、榎本紗耶香、吉野孝、石口宏、廣西昌也、入江真行。PC による在宅医療支援体制構築の研究-問題点の検討。厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 重症難病患者の地域医療体制の構築に関する研究班 平成 20 年度班会議、平成 21 年 1 月、東京。
- 2-2. 紀平為子、浜喜和、吉田宗平、近藤智善、岡本和士、永井正規。紀伊半島筋萎縮性側索硬化症の背景要因の検討。第 50 回日本神経学会総会、2009、5 月、仙台。
- 2-3. 紀平為子、村田頭也、森田修平、鈴木愛、中峯寛和、近藤智善。封入体筋炎における TDP-43 陽性構造物の検討。第 50 回日本神経病理学会総会 2009、6 月高松。
- 2-4. Kihira T, Okamoto K, Yoshida S, Hama K, Kondo T, Nagai M. Essential minerals and risk of

amyotrophic lateral sclerosis on the Kii Peninsula,
Japan. 20th International Symposium on ALS/MND.
Berlin, Germany, 8-10 December, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

特許庁 特許出願番号 特許願 特許出願日
特許庁 特許出願番号 特許願 特許出願日
特許庁 特許出願番号 特許願 特許出願日
特許庁 特許出願番号 特許願 特許出願日
特許庁 特許出願番号 特許願 特許出願日

特許庁 特許出願番号 特許願 特許出願日
特許庁 特許出願番号 特許願 特許出願日
特許庁 特許出願番号 特許願 特許出願日
特許庁 特許出願番号 特許願 特許出願日
特許庁 特許出願番号 特許願 特許出願日

特許庁 特許出願番号 特許願 特許出願日
特許庁 特許出願番号 特許願 特許出願日
特許庁 特許出願番号 特許願 特許出願日
特許庁 特許出願番号 特許願 特許出願日
特許庁 特許出願番号 特許願 特許出願日

特許庁 特許出願番号 特許願 特許出願日
特許庁 特許出願番号 特許願 特許出願日
特許庁 特許出願番号 特許願 特許出願日
特許庁 特許出願番号 特許願 特許出願日
特許庁 特許出願番号 特許願 特許出願日

特許庁 特許出願番号 特許願 特許出願日
特許庁 特許出願番号 特許願 特許出願日
特許庁 特許出願番号 特許願 特許出願日
特許庁 特許出願番号 特許願 特許出願日
特許庁 特許出願番号 特許願 特許出願日

牟婁病の実態の把握と治療指針作成班（分担）

2009 年度 研究報告書原稿

「牟婁病の候補遺伝子解析」

富山弘幸¹⁾，小久保康昌²⁾，佐々木良元²⁾，李元哲¹⁾，今道洋子¹⁾，船山学³⁾，
水野美邦³⁾，服部信孝¹⁾，葛原茂樹⁴⁾

研究分担者氏名 富山弘幸¹⁾

研究協力者氏名 服部信孝¹⁾，葛原茂樹⁴⁾

順天堂大学脳神経内科¹⁾，三重大学神経内科²⁾，

順天堂大学老人性疾患・病態治療研究センター³⁾，国立精神・神経センター病院⁴⁾

研究要旨

牟婁病と呼ばれる紀伊半島の Amyotrophic Lateral Sclerosis /Parkinsonism-dementia complex (ALS/PDC)の遺伝的背景を明らかにする目的で，病理診断された3例の紀伊半島 ALS/PDC 患者を対象とし，ALS/frontotemporal lobar degeneration (FTLD)関連遺伝子，タウオパチー関連遺伝子，パーキンソニズム関連遺伝子の，計20を超える候補遺伝子解析を行った。本候補遺伝子解析で病的変異は特定できなかったものの，牟婁病，紀伊半島 ALS/PDC の発症には，未知の遺伝的因子が関わっている可能性が高いと考えられ，候補遺伝子解析とともに，今後のより大規模な多型解析や連鎖解析の成果が期待される。

A.研究目的

牟婁病，紀伊半島の Amyotrophic Lateral Sclerosis /parkinsonism-dementia complex (ALS/PDC)への遺伝子異常の関与の有無を明らかにする。

B.研究方法

病理学的に確定診断された3例の紀伊半島 ALS/PDC 患者において、関連が推定される候補遺伝子につき変異解析を行った。直接塩基配列決定法で、以前解析した *MAPT* や *SOD1* の他に、amyotrophic lateral sclerosis (ALS) / frontotemporal lobar degeneration (FTLD) 関連遺伝子(*SOD2*, *SOD3*, *ALS2/alsin*, *SMN1*, *PGRN*, *ANG*, *VEGF*, *VCP*, *VAPB*, *DCTN1*, *CHMP2B*, *TARDBP/TDP-43*)、タウオパチー関連遺伝子(*GSK3β*)、パーキンソニズム関連遺伝子(*alpha-synuclein*, *LRRK2*, *parkin*, *DJ-1*, *PINK1*, *ATP13A2*, *PLA2G6*)のさらに計20の候補遺伝子解析を行った。Gene dosage study として、*MAPT*, *APP*, *alpha-synuclein*, *TDP-43/TARDBP*, *GSK3β*, *parkin* の欠損や重複の有無についても TaqMan 法、SYBR Green 法を用いて解析した。

C.研究結果

これら20遺伝子には病的変異を認めなかった。*MAPT*, *APP*, *alpha-synuclein*, *TDP-43*, *GSK3β*, *parkin* にエクソンの欠損や重複を認めなかった。3例に共通し疾患への関与が疑われる SNP も認めなかった。

D.考察

今のところ、主要な ALS, FTLD, パーキンソニズム, シヌクレイノパチー, TDP-43 プロテインパチー, タウオパチーの原因および感受性遺伝子の異常は特定できていないが、家族例が多く発症者の家系内集積が強いこと、環境因子として確立したものはないことか

らも、牟婁病には未知の遺伝的因子が強く発症に関わっている可能性が考えられた。

E. 結論

本候補遺伝子解析では特定できなかったものの、牟婁病、紀伊半島 ALS/PDC の発症には、未知の遺伝的因子が関わっている可能性が高い。ALS/PDC の研究が孤発性 ALS、TDP-43 プロテインオパチー、タウオパチー、シヌクレイノパチーの病態解明に大きな役割を果たす可能性がある。牟婁病、ALS/PDC において、候補遺伝子解析とともに、グアム島やパプアニューギニアにみられる ALS/PDC ともあわせ民族や地域特異性も考慮した、より大規模な多型解析や連鎖解析の成果が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

Tomiya H, Kokubo Y, Sasaki R, Li Y, Imamichi Y, Funayama M, Mizuno Y, Hattori N, Kuzuhara S. Mutation analyses in amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex of the Kii peninsula, Japan. *Mov disord* 23;2344-2348,2008.

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服事業）
牟婁病の実態の把握と治療指針作成班 分担研究報告書

紀伊筋萎縮性側索硬化症・パーキンソニズム認知症複合 (ALS/PDC) に関する分子遺伝学的検討

辻省次¹⁾、石浦浩之¹⁾、福田陽子¹⁾、中原康雄¹⁾、後藤 順¹⁾
原賢寿²⁾、桑野良三³⁾、宮下哲典³⁾、小久保康昌⁴⁾、佐々木良元⁴⁾、葛原茂樹⁵⁾

- 1) 東京大学神経内科
- 2) 新潟大学神経内科
- 3) 新潟大学脳研究所
- 4) 三重大学神経内科
- 5) 国立精神・神経センター病院

研究要旨

紀伊筋萎縮性側索硬化症・パーキンソニズム認知症複合 (ALS/PDC) の発症要因には不明な点が多いが、家族性が強く、地域集積性も考慮すると何らかの遺伝的背景が強く関与していると示唆される。紀伊 ALS/PDC の遺伝学的検討と発症要因の解明を目的として本研究を行った。本研究ではまずゲノムリソースの収集に力点を置き、コントロールも合わせて 144 名のゲノムリソースを収集した。またその中から、グアム ALS/PDC で報告された *TRPM7* 遺伝子の関与を調べるため、紀伊 ALS/PDC 検体を用いて塩基配列解析、二点連鎖解析を行った結果、紀伊 ALS/PDC においては *TRPM7* が関与していないことを示すことができた。今後、原因遺伝子同定の検討のため、ゲノムワイド連鎖解析を行うことが必要と考えられ、紀伊 ALS/PDC 大家系について、マイクロサテライト、一塩基多型 (SNP) を用いたタイピングを行った。今後ゲノムワイド連鎖解析を行っていく予定である。

A. 研究目的

紀伊筋萎縮性側索硬化症・パーキンソニズム認知症複合 (ALS/PDC) の発症要因に関しては不明な点が多く、従来からミネラル説、神経毒説などが提唱されているが確実に証明

されたとは言いづらい。ALS/PDC に関しては 70-80% の症例が家族性に発症すること、また集積地の存在からは、何らかの遺伝的背景が強く疑われるが紀伊 ALS/PDC に関しては遺伝学的検討があまりなされてこなかった。

今回、紀伊 ALS/PDC に関して遺伝学的検討を行い、原因遺伝子の同定を目指して以下の研究を行った。

一つには、グアム ALS/PDC で報告されたような *TRPM7* の T1482I 多型が紀伊 ALS/PDC において発症に関与するかどうかを検討するために *TRPM7* に関する塩基配列解析および周囲のマイクロサテライトマーカーによる二点連鎖解析を施行した。

さらに原因遺伝子の同定を進めるために、ゲノムワイドの DNA タイピングを行った。

B. 研究方法

2002 年より主に家系例を中心に DNA サンプルの収集を進めている。現在までに発症者 31 名 (家族例 18 名、孤発例 13 名)、発症疑い例 2 名、非発症者 84 名、地域コントロール 27 名の合計 144 名について、書面による同意を得た後末梢血採血を行いリンパ球より DNA を抽出した。一部の症例については、リンパ芽球 cell line も作成した。

TRPM7 については、発症者 1 名について全 coding 領域の塩基配列解析を行った。また、最大家系内の発症者 7 名+発症疑い 2 名、その他の家系の発症者 16 名、地域コントロール 27 名において、T1482I アミノ酸置換の頻度について、直接塩基配列決定法を用いて検討し、HapMap-JPT におけるデータと合わせて χ^2 乗検定による統計解析を行った。発症者 6 名、発症疑い 2 名、非発症者 15 名に関しては *TRPM7* の近傍のマイクロサテライトマーカー (D15S978、D15S1016) を用いてタイピングを行い、同領域における Lod Score を、Superlink を用いた二点連鎖解析により算出した (常染色体優性モデル、常染色体劣性モデルの両方を検討し、また疾患の浸透率を 0.9 および 1 と仮定して各々計算を行った)。

次に最も大きな家系に関してゲノムワイド連鎖解析を試みるために、発症者 8 名、発症疑い 2 名、非発症者 16 名についてマイクロサテライトマーカーを用いたタイピング (ABI PRISM Linkage Mapping Set ver. 2.5, 常染色体に 745 個のマーカー) を行った。また同家系の発症者 8 名、発症疑い 2 名、非発症者 24 名については、Affymetrix 社の GeneChip Human Mapping 100K Set を用いて 10 万以上の一塩基多型 (SNP) についてタイピングを行った。

(倫理面への配慮)

三重大大学、東京大学の倫理委員会で承認されたプロトコールに基づき、研究協力にあたり十分な説明を行い、事前に書面による同意を得ている。

C. 研究結果

同意が得られた方より、前述のように 144 名のゲノムリソースを収集することができた。

グアム ALS/PDC において、*TRPM7* の T1482I 多型が発症者に有意に多いとの報告を受け、紀伊 ALS/PDC においても T1482I 多型の頻度を検討した。大家系において、発症者 7 名+発症疑い 2 名におけるアレル頻度は 11.1%、他の家系の発症者 16 名におけるアレル頻度は 18.8%であった。これは、地域コントロール集団 27 名におけるアレル頻度は 20.4%と比較して有意な差を認めなかった。HapMap-JPT サンプルにおける同多型のアレル頻度は 22.2%と報告されており、これとも比較しても有意差は認めなかった。

また、発症者 1 名において *TRPM7* の coding 領域の塩基配列決定を行ったが、IVS3-26(rs2063011)と IVS22-41(rs675011)多型を認めるのみで、明らかな病的変異を認めなかった。

さらに、二点連鎖解析では、D15S978、D15S1016 の座位において、いずれのモデルにおいても有意な lod score を認めず、*TRPM7* 遺伝子座への有意な連鎖は認めなかった。

以上より、グアム ALS/PDC で認められたような *TRPM7* 遺伝子の紀伊 ALS/PDC への関与は否定的と考えられた。

ゲノムワイド連鎖解析を行うためのマイクロサテライトタイピング、SNP タイピングについては終了した。今後、データの quality check を行った後、連鎖解析を行うことを予定している。

D. 考察

グアムにおいては、13 名のグアム ALS 患者中 2 名、9 名のグアム PDC 患者中 3 名の T1482I 多型を認め、23 名のチャモロ人には同多型を認めなかったことから、同多型が ALS/PDC 発症に関与しているとの報告があった (Hermosula et al. 2005, PNAS)。グアム ALS/PDC と紀伊 ALS/PDC は病理学的には同一の疾患であると考えられており、紀伊 ALS/PDC においてこの多型の関与が疑問となっていたが、本研究によって本多型は紀伊 ALS/PDC においては強い関連を示す訳ではないことが判明した。このことより、ALS/PDC の真の原因が他に存在する可能性が示唆され、今後ゲノムワイド連鎖解析を行って解析を進めていくと共に、検体の収集を進めていきたいと考えている。

E. 結論

紀伊 ALS/PDC の遺伝学的検討を行うために、合計 144 名のゲノムリソースの収集を行った。

紀伊 ALS/PDC において、*TRPM7* 遺伝子の関与は認めなかった。

紀伊 ALS/PDC 大家系について連鎖解析を行うためのゲノムワイドの DNA タイピングを終了した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kenju Hara, Yasumasa Kokubo, Hiroyuki Ishiura, Yoko Fukuda, Akinori Miyashita, Ryoza Kuwano, Ryogen Sasaki, Jun Goto, Masatoyo Nishizawa, Shigeki Kuzuhara, Shoji Tsuji. *TRPM7* is not associated with amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism dementia complex in the Kii peninsula of Japan. *Am J Med Genet Part B* 153B:310-313.

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

表題：Multiple phosphorylated proteinopathy としての牟婁病の神経病理

研究分担者氏名 村山繁雄¹⁾

研究協力者氏名 齊藤祐子²⁾ 初田裕幸¹⁾、足立正¹⁾、舟辺さやか¹⁾、杉山美紀子¹⁾

1) 所属 東京都健康長寿医療センター高齢者ブレインバンク

2) 所属 国立精神・神経センター病院臨床検査部（病理）

研究要旨

牟婁病は、タウ、 α シヌクレイン、TDP43 の三種の蛋白が蓄積するが、いずれもリン酸化を受けている。前二者が蓄積する疾患として、石灰化を伴うびまん性神経原線維変化病（DNTC）と比較した。DNTCでも、免疫組織化学的に、TDP43 神経細胞内沈着を、側頭葉・海馬に確認できたが、脊髄に陽性所見はなかった。両者とも multiple phosphorylated proteinopathy に分類可能だが、脳と脊髄に、この病態が生じることが、牟婁病の独自の点であり、脊髄の解析が、病態解明に貢献する可能性が示唆された。

A. 研究目的

牟婁病（Kii ALS/ PDC）は、最初 Bielschowsky 鍍銀染色で、神経原線維変化が記載された。神経原線維変化の構成蛋白としてタウが同定され、免疫組織化学的・免疫化学手法により牟婁病でもアルツハイマー病で蓄積する神経原線維変化（ADNFT）と同様であることが確認され、タウオパチーとしての地位が確立された。その後レビー小体の構成要素として α シヌクレインが同定され、牟婁病において免疫組織学的に α シヌクレインの存在が明らかとなり、タウと α シヌクレインの両者の共存を示す疾患と認識されるに至った。次いで、筋萎縮性側索硬化症（ALS）の原因蛋白として TDP43 が同定され、またこれを用いた免疫組織化学的手法により TDP43 の蓄積が確認され、牟婁病は複合型 TDP43 蓄積症に分類されるに至った。タウ、 α シヌクレイン、TDP43 ともリン酸化を受けており、共通のリン酸化酵素の異常により、これらの蛋白が重複し蓄積する可能性が考えられて

きた。一方、長谷川らの TDP43 蓄積に関する知見よりは、むしろ異常切断の後に、リン酸化、ユビキチン化が起きる可能性が提唱されている。この場合は、ひとつの蛋白が seed となり、複数の蛋白の cross seed が起きうるのかが問題となる。

我々は、牟婁病とほぼ同じように、タウオパチー、次いで α シヌクレイノパチーの共存が指摘され、牟婁病と同様の疾患概念の変遷をとったと考えられる、石灰化を伴ったびまん性神経原線維症（diffuse neurofibrillary tangle with calcification: DNTC）において、TDP43 蓄積がみられるか、牟婁病と細胞病理所見が類似するか否かを検討することで、牟婁病の病態解明に手がかりが得られるのではないかと考え、以下の検討を加えた。

B. 研究方法

高齢者ブレインバンク登録例中の、DNTC 例に関し、抗リン酸化タウ（AT8）、抗リン酸化 α シヌクレイン（psyn#64）、抗リン酸化 TDP43（pSer409/410 monoclonal: pTDP43）抗体で脳・脊髄の免疫染色を

行うことで、牟呂病との比較検討を行った。また、二重染色で、これらのエピトープの細胞内共存の有無についても、検討を加えた。

(倫理面への配慮)

高齢者ブレインバンクを用いた病理学的研究に関しては、施設倫理委員会の承認済みである。

C. 研究結果

DNTCは、高齢者ブレインバンク内に3例存在した(表1.)。いずれもび慢性に神経原線維変化の出現をみる他に、大脳基底核、歯状核に加え、大脳白質、小脳顆粒細胞層に石灰沈着を認めた。

| 年齢/性 | 神経病理診断 | 老年性変化 | | | | p-TDP-43 ステージ | 脊髄ステージ | |
|-------|---------|-------|----|------|----|------------------|--------|-------|
| | | NFT | SP | LB | AG | | p-tau | p-syn |
| 82/女 | DNTC | VI | C | V | 0 | 3T0M0S | 1S | 2S |
| 81/女 | DNTC | VI | A | V | 0 | 3T0M0S | 1S | 2S |
| 79/女 | DNTC | VI | 0 | V | 0 | 3T0M0S | 1S | 2S |
| 00-02 | PDC | >IV | A | >IV? | 0? | 3T?M? | 2S | 2S |
| 01-01 | ALS/PDC | >IV | A | >IV? | 0? | 3T?M? | 2S | 2S |
| 04-03 | ALS/PDC | >IV | A | >IV? | 0? | 3T?M? | 2S | ? |
| 05-03 | ALS/PDC | >IV | 0? | >I | 0? | 3T?M? | 2S | 2S |
| 98-01 | ALS/PDC | >IV | A | ? | 0? | 3T?M? | 2S | ? |
| 99-01 | ALS/PDC | >IV | ? | ? | 0? | 3T?M? | 2S | ? |

表1. DNTCとALS/PDCとの比較。DNTCではALS/PDCと異なり、脊髄に陽性所見はみられない。NFT: 神経原線維変化、SP: 老人斑、LB: レビ小体病理、AG: 嗜銀顆粒。pTDP43ステージ: 0: 陽性所見なし、1: 突起ないシグリア細胞内陽性; 2: 神経細胞体内陽性、3: 神経細胞体内、突起内陽性所見を多数認める。T: 側頭葉、M: 延髄、S: 脊髄。脊髄ステージ: ptau: リン酸化タウ、p-syn: リン酸化 α シヌクレイン。

牟呂病では、脊髄前角細胞内(図1, 2)、延髄、側頭葉・海馬(図3)のいずれの部位においても、リン酸化タウ、 α シヌクレイン、TDP43の沈着を認め、ひとつの神経細胞内に複数のエピトープの共存をしばしば認めた。

DNTCにおいても側頭葉・海馬(図4-6)においては同様の共存を認めたが、延髄、脊髄では共存は全く認められなかった。

同一細胞内の共存の所見についても、牟呂病ではリン酸化タウとリン酸化TDP43のエピトープの同一細胞内蓄積の頻度は明らかにDNTCに比べ多かった。一方、タウと α シヌクレインの同時沈着はまれであり、両者で頻度に大きな差は認められなかった。

D. 考察

牟呂病においては、新皮質・海馬を中心とするタウオパチーと、歯状核顆粒細胞層を中心とするproteinopathy、さらに、脊髄前角細胞を中心とするTDP43 proteinopathyが合併した上に、 α シヌクレイノパチーが、むしろタウオパチーと相関を持ちながら蓄積している病理像と解釈するのが最も適切と考えられた。一方、DNTCにおいては、最も沈着のレベルが強いのはtauであり、この変化は側頭葉・海馬を含む新皮質に強いが、延髄以下には認められず、リン酸化 α シヌクレインは側頭葉内側面・海馬に比較的限局しており、TDP43は、移行嗅内野、扁桃核・歯状核顆粒細胞層に限局して認められた。

これは、牟呂病においては、原発性タウオパチーと、FTLD-TDP43、ALS-TDP43型蓄積が合併しているとする、これまでの見解を支持するだけでなく、 α シヌクレイン沈着は、タウパチーに付随するものである可能性が考えられる。

一方DNTCにおいては、原発性タウオパチーに付随し、 α シヌクレイン、TDP43が蓄積している可能性が考えやすく、従って、脊髄にはいずれの陽性所見も認めないと考えられる。

高齢者連続剖検例における観察でも、タウ、 α シヌクレインの両方の沈着を認める時に、TDP43蓄積を認める頻度が相対的に高く、DNTCは、この理解の範囲にとどまるのに対し、牟呂病においては、この範囲を明らかに逸脱していると、考えられる。

両者とも表面的には multiple phosphorylated proteinopathyをとる点では共通するが、DNTCではタウをコアとして、 α シヌクレイン、次いでTDP43がクロスシードして

いる可能性が考えられる。一方牟呂病においては、タウと TDP43 の蓄積の上流にある変化により、それぞれ異なった解剖学的部位に、重み付けの異なった病変を引き起こしている可能性が考えられた。

従って、脳と脊髄の両方を、蛋白化学、遺伝子発現の両面で検索することが、牟呂病の病因解明には生産的と考えられる。

E. 結論

牟呂病は、DNTC と、リン酸化タウ、 α シヌクレイン、TDP43 の同時蓄積の点では共通するが、蓄積部位、及び蓄積様式の両方で異なっている。

図の説明：

図 1. 牟呂病脊髄前角の、抗リン酸化タウ (AT8: 赤) と TDP43 (茶) の二重免疫染色所見。脊髄前角に、顆粒状の AT8 沈着と、刷毛状の TDP43 同時蓄積所見を認める。核の染色性は低下している。

図 2. 牟呂病前角細胞内抗リン酸化 α シヌクレイン抗体陽性像 (psyn64 抗体免疫染色)。

図 3. 牟呂病歯状回顆粒細胞層、抗 TDP43 抗体 (茶)、リン酸化タウ抗体 (AT8、赤) 二重免疫染色所見。一部の神経細胞 (矢印) に、重複蓄積を認める。

図 4. DNTC 海馬・側頭葉の抗リン酸化タウ抗体 (AT8) 免疫染色。海馬内に多数の陽性所見を認めるほか、嗅内野、移行嗅内野、側頭葉に二相性の陽性所見を認める。

図 5. 外側膝状体を通る後方海馬の抗リン酸化 α シヌクレイン抗体 (psyn64) 免疫染色セミマクロ像。海馬内 CA2 に多数の Lewy neurites, dots からなる陽性所見を認めるとともに、嗅内野、移行嗅内野、側頭葉の皮質深部に陽性所見がみられる。

図 6. 歯状回顆粒細胞 TDP43 抗体免疫染色。牟呂病や認知症を伴う筋萎縮性側索硬化症に類似した、帽子型封入体を認める。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表 (英文オリジナルのみ)

1. Tokumaru A, Saito Y, Murayama S, Kanemaru K, Sakiyama Y, Toyoda M, Yamakawa H, Terada H: Imaging-Pathologic Correlation in Corticobasal Degeneration. Am J Neuroradiol 2009; 30: 1884-1892

2.

2. 学会発表 (国際学会のみ)

1. Adachi T, Saito Y, Hatsuta H, Funabe S, Murayama S: Laterality in argyrophilic grain disease. 2009 Annual Meeting of the American Association for Neuropathologists, 2009.7. 13, San Antonio, U.S.A, JNEN 2009; 68: 573

2. Murakami K, Horikoshi-Sakuraba Y, Murata N, Noda Y, Masuda Y, Kinoshita N, Murayama S, Shirasawa T, Shimizu T, Irie K: Development of a monoclonal antibody against the toxic conformer of the 42-mer amyloid β protein. 2009 Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2009.10.17-21, Chicago, U.S.A.

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

牟婁病患者脳に蓄積する TDP-43 の解析

研究分担者：長谷川成人¹⁾

研究協力者：新井哲明¹⁾、野中隆²⁾、秋山治彦¹⁾、小久保康昌³⁾、葛原茂樹⁴⁾

¹⁾ 東京都精神医学総合研究所 分子神経生物学研究チーム

²⁾ 東京都精神医学総合研究所 老年期精神疾患研究チーム

³⁾ 三重大学医学部神経内科

⁴⁾ 国立精神神経センター病院

研究要旨

前頭側頭葉変性症（FTLD）や筋萎縮性側索硬化症（ALS）患者脳に出現するユビキチン陽性の細胞内凝集体の主要構成成分として TDP-43 が同定され、運動神経変性病態への関与が注目されている。そこで牟婁病患者脳に蓄積する TDP-43 の免疫組織化学、生化学解析を行った。その結果、形態的にも生化学的にもグアム ALS/PDC 症例とよく似た TDP-43 の病変が観察され、生化学的には FTLD と ALS の中間的な特徴を示した。また、異常リン酸化タウの蓄積と TDP-43 の蓄積に相関があることが示唆された。

A. 研究目的

前頭側頭葉変性症（FTLD）や筋萎縮性側索硬化症（ALS）患者脳に出現するユビキチン陽性の細胞内異常構造物の主要構成成分として TDP-43 が同定された。TDP-43 は核に局在し、転写制御などに関与する不均一核リボヌクレオタンパク質（hnRNP）の一種である。ALS、FTLD のユビキチン陽性構造物の主要構成成分としてリン酸化 TDP-43 が同定されたこと、さらに 2008 年、家族性および孤発性 ALS 患者に多数の TDP-43 の遺伝子変異が発見されたことから、TDP-43 の機能、構造変化と神経変性疾患、特に ALS を中心とする運動神経系の変性の関係に注目が集まっている。TDP-43 の異常蓄積はグアム ALS パーキンソン認知症複合において頻度高く検出されることから、牟婁病においても病態への関与が示唆される。そこで牟婁病患者脳に蓄積する TDP-43 の免疫組織化学、生化学解析を行った。

B. 研究方法

牟婁病患者剖検脳（3 症例の前頭葉、側頭葉の凍結組織）を 1% Triton, 1% Sarkosyl, 8 M urea を含む

緩衝液で順次可溶化し、それぞれの画分を電気泳動後、PVDF 膜に転写し、抗リン酸化 TDP-43 抗体（pS409/410, pS403/404）、抗タウ抗体（HT-7）にてイムノブロット解析を行った。また生化学解析に用いた組織の近傍をホルマリン固定後、ビブラトームにて 50 μ の切片を作製し、それぞれの抗体で免疫組織染色を行い、TDP-43 とタウの病変の有無、形態などを確認した。

（倫理面への配慮）

剖検脳の生化学解析については当研究所の倫理委員会に申請を提出して承認をうけ、実験指針に従って行った。

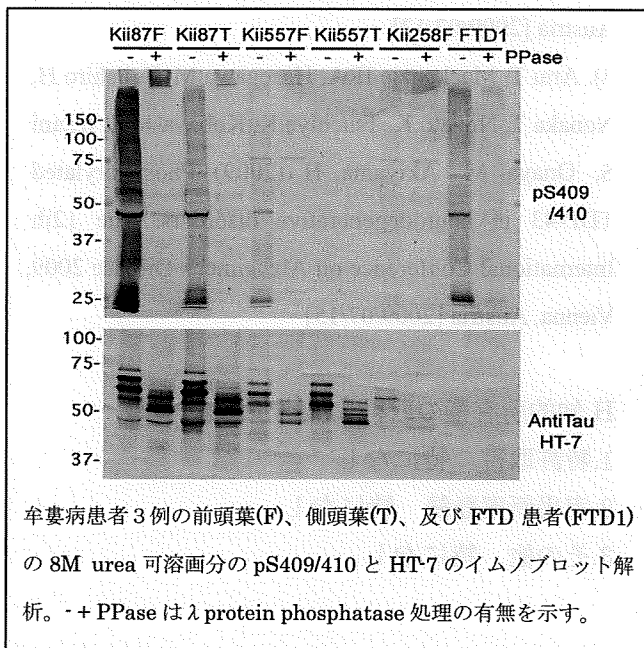
C. 研究結果

症例や部位により TDP-43 の蓄積の量にばらつきがみられたが、TDP-43 の異常リン酸化を認識する pS409/410 抗体、pS403/404 抗体により、45kDa の高リン酸化 TDP-43 バンドや、18~28kDa の異常 TDP-43 断片バンド、さらにはレーン全体がスメア状に染まる陽性所見が検出され

た。抗体陽性反応は λ protein phosphatase による脱リン酸化処理により消失したことから特異的の反応であると確認された。18~28kDa の C 末端断片のパターンについて、FTLD, ALS の試料と並べて比較した結果、牟婁病患者に蓄積する TDP-43 断片のバンドパターンは FTLD と ALS の中間的な特徴を有する type 3 が示唆された。

一方、同じ画分を抗タウ抗体 HT-7 で解析した結果、60~72kDa の異常リン酸化タウのバンドが検出され、それらは脱リン酸化処理により移動度が変化した。興味深いことにタウ蓄積が強く検出される症例や部位と相関して TDP-43 の異常も強く検出され、両タンパク質の蓄積に相関があることが示唆された。

免疫組織染色では、それぞれの症例、部位の病変の程度が生化学で検出される異常と一致していることが確認された。また、形態的には円形の細胞内封入体と短い突起様封入体やグリア細胞内封入体を主体とする、いわゆる type 3 の TDP-43 の病理を示すことが示唆された。



D. 考察

今回の解析から、牟婁病患者の大脳皮質において、免疫組織学的にも、生化学的にも異常リン酸化 TDP-43 が蓄積していることが確認された。牟婁病とよく似た疾患であるグアムの ALS/PDC に異

常リン酸化 TDP-43 が蓄積していることがすでに報告されているが、形態的にも生化学的にもよく似ていた。蓄積 TDP-43 断片が疾患や病理によって特徴的なバンドパターンを示すことがわかっているが、今回の一例の解析からはそのバンドパターンは FTLD と ALS の中間的な特徴を示していた。このバンドパターンを示す代表的な疾患はプログラニューリン(PGRN)変異を有する FTLD であるが、AD や DLB などの疾患に蓄積する TDP-43 も同様のパターンをとることから、二次的に TDP-43 が蓄積している可能性も示唆される。今回の解析からタウ病変との相関が高いことが示されたことから、今後タウとの関連を検討する必要があるかもしれない。

E. 結論

牟婁病患者脳の前頭葉、側頭葉にリン酸化 TDP-43 の蓄積を免疫組織化学的、生化学的に認めた。その蓄積様式は FTLD と ALS、両疾患の特徴を有すると考えられた。また、異常リン酸化タウの蓄積と TDP-43 の蓄積に相関があることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1). Nonaka T, Arai T, Buratti E, Baralle FE, Akiyama H, Hasegawa M. Phosphorylated and ubiquitinated TDP-43 pathological inclusions in ALS and FTLD-U are recapitulated in SH-SY5Y cells. FEBS Lett 583: 394-400, 2009.
- 2). Arai T Mackenzie IR, Hasegawa M, Nonaka T, Niizato K, Tsuchiya K, Iritani S, Onaya M, Akiyama H, Phosphorylated TDP-43 in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies Acta Neuropathol. Online Jan 13, 2009.