

就学のために入院する筋萎縮症児は徐々に減少し、現在、筋ジストロフィー病棟に入院する就学児はごく一部に限られる。筋ジストロフィー病棟は、その設立当時とは異なった社会的役割を持つようになり、現在、入院患者の半数以上は人工呼吸管理を要する成人患者が占めている。筋萎縮症の一部である SMA も、入院患者の高年齢化、気管切開例や NPPV などの人工呼吸器使用例の増加、経管栄養例の増加といった重症化が顕著である。

本データベースは、年度ごとの全国の筋ジストロフィー病棟の入院患者状況を記録し、筋ジストロフィー医療の現状を把握する上では非常に有用である。一方で、開始から 12 年が経過し、診断基準など一部で見直しが必要な項目もあり、これは今後正確な情報収集をするうえでの課題である。

特に、本検討での SMA1-3 病型分類には診断医毎あるいは施設毎の曖昧さがあることは否めず、病型別分類は再考の余地がある。2010 年現時点で、症例によっては連続 12 年の呼吸状態、栄養管理などの全身状態が把握できるデータベースである。今後、病型分類の再確認を行った上、病型別の経過把握・検討を行いたい。

E. 結論

SMA の病型分類の再確認が必要であるが、筋ジストロフィー病棟全体の傾向として認められる、入院患者平均年齢の上昇、呼吸管理状態、栄養管理状態の重症化は、SMA でも明らかであった。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(準備中)

2. 学会発表

本研究の要旨の一部は、第 64 回国立病院総合医学会（平成 22 年 11 月 26 日）にて発表した。

H. 知的財産権の出願・登録状況（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

脊髄性筋萎縮症による側弯に対する脊椎外科治療アンケート調査 齊藤利雄 国立病院機構刀根山病院 神経内科・小児神経内科

研究要旨

神経筋疾患側弯に対する、国内での脊椎外科治療アンケート調査を行った。日本側弯症学会 88 施設からの回答中、脊椎外科治療施行施設は 14 施設で、施設毎の症例数は大きく異なっていた。脊髄性筋萎縮症は 14 例の手術報告があり良好な結果が得られていたが、国内では一般的とは言い難い治療法で、治療選択肢として情報蓄積が重要と考えられた。

A. 研究目的

脊髄性筋萎縮症(SMA)など神経筋疾患による側弯に対する、国内での脊椎外科治療の状況は十分には把握されていない。神経筋疾患による側弯の国内の外科治療状況を調査し、今後の治療方針決定の一助とする。

B. 研究方法

日本側弯症学会ホームページに掲載されている学会員施設に、アンケート用紙を郵送し書面での回答を求めた。アンケート内容は、2005 年以降の神経筋疾患の側弯手術経験の有無、手術症例の情報、脊椎外科治療の適応症例、不適応症例に関する意見などである。

(倫理面への配慮)

アンケート調査施行にあたっては、日本側弯症学会に施行の旨の確認を行い、刀根山病院臨床研究審査委員会の承認を得た。

C. 研究結果

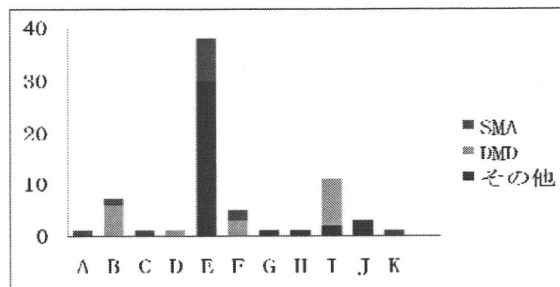
日本側弯症学会掲載施設 248 施設に郵送し、宛先不明返送 14 施設を除く、88 施設から回答を得た(回収率 38%)。内訳は大学病院 28 施設、公立総合病院 15 施設、国立病院機構 5 施設、医療法人など 40 施設であった。外科手術を施行していると回答したのは 14 施設(回答施設の 15%)で、うち 9 施設が大学病院、公立総合病院 2 施設、国立病院機構 2 施設、医療法人 1 施設であった。手術症例は 11 施設から 70 例の報告があった。疾患内訳は、SMA 14 例、筋ジストロフ

イー22例、脳性麻痺 16 例、二分脊椎 5 例、キアリ奇形 3 例などであった(表 1)。手術症例数、疾患内訳は施設によって大きく異なっていた(図 1)。

表 1 手術症例：70 例 11 施設から症例情報提供疾患内訳

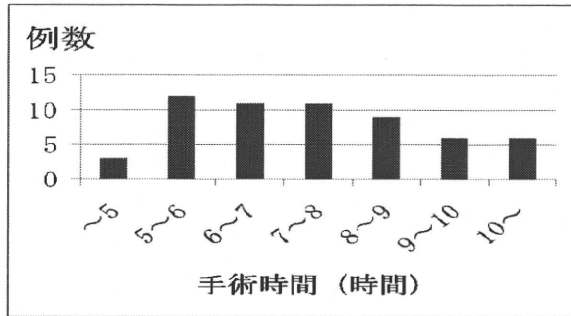
脊髄性筋萎縮症 14 例
筋ジストロフィー22 例
Duchenne 型筋ジストロフィー19 例
Ullrich 型筋ジストロフィー1 例
病型不明 2 例
脳性麻痺 16 例
二分脊椎 5 例
キアリ奇形 3 例
重症筋無力症 1 例
横断性脊髄炎 1 例
神経芽細胞腫術後麻痺 1 例
脊髄空洞症 2 例
脊髄梗塞 1 例
脊髄損傷 2 例
先天性ミオパチー1 例
脳炎後遺症 1 例

図 1 施設毎の手術症例数、疾患内訳 A~K：施設



手術時間は、4～16.7時間であった（図2）。

図2 手術時間の分布



術後合併症は、表2に示す内訳であった。

表2 報告された術後合併症内訳

術後合併症	例数
呼吸不全	4
感染	2
心不全	2
4本抜釘	1
食欲低下	1
脳梗塞	1
無気肺	1

SMA14例の内訳は、男6例、女8例、手術年齢は11～23歳（平均13.6歳）で、術前状態が、心不全+NPPV例1例、酸素投与1例が含まれていた。術前側弯は55～143度（平均106.7度）で左凸5例、右凸9例、術後矯正は17～83度（平均43.6度）であった（図3）。術前後弯は41～156度（平均104.2度）術後矯正24～72度（平均43.8度）であった。

一方、Duchenne型筋ジストロフィー19例の内訳は、全例男19例、手術年齢は12～22歳（平均13.9歳）で、術前状態が、心不全+気管切開例1例、心不全1例が含まれていた。術前側弯は35.7～115度（平均65.3度）で左凸10例、右凸8例、不明1例、術後矯正は5～50度（平均23.7度）であった。

SMA術後の感想が得られた10例のまとめを表3に示す。多くの例で座位保持良好が挙げられる一方、介助しにくくなったとの感想もあった。

図3 SMA 手術前後での側弯の変化

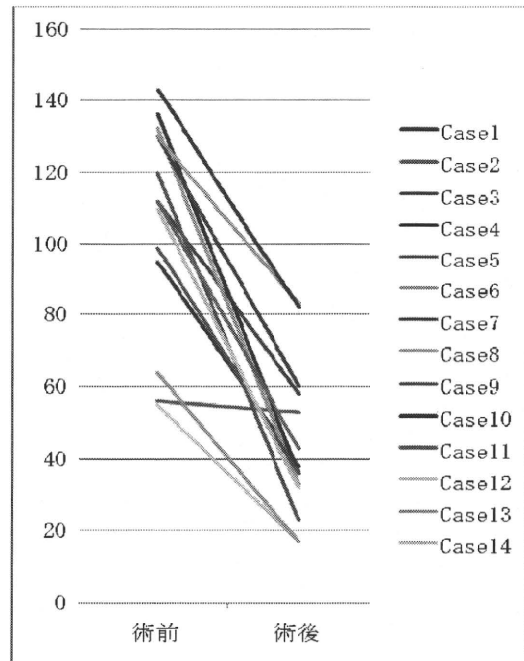


表3 SMA術後の感想

	例数 (延べ数)
座位保持が良好になった	7
気道感染症になりにくくなった	3
食事がとれるようになった	2
呼吸しやすくなった	1
便秘が治った	1
体重が増えた	1
視界が良くなった	1
寝返りしやすくなった	1
体調を崩さなくなった	1
介助しにくくなった	1

神経筋疾患側弯の手術療法の適応年齢幅を問うた設問では、下限3～15歳（n=34）、上限10～75歳未満（n=23）と回答範囲は幅広く、適応症例の脊椎変形の程度を問うた設問でも、下限25～90度（n=45）、上限60～150度（n=21）と幅広かった。

手術の積極的適応を自由記述で求めたまとめを表4に示す。内訳は、変形、合併症状、現症・術後の状態などに分類されたが、坐位バランス不良・座位保持困難を挙げた回答が11例と最も

多かった。

表4 積極的適応症例（自由記述） 返送 88 回答中

坐位バランス不良・座位保持困難 11 回答

変形に関するもの

- 変形が大きな症例
- 胸郭変形矯正可能例
- 進行性の脊柱変形
- 前弯，側弯が強い症例
- 補助具で代償できない側弯
- 頸胸移行部で前弯の強いもの
- 車いすで 20～30 度の変形は適応
角度では考えない

合併症状に関するもの

- 疼痛
- 呼吸器症状，神経症状出現

現症・術後の状態に関するもの

- 運動機能，座位保持能力のある例
- ADL 改善が期待できる
- 呼吸機能・心機能が～1000ml の出血に耐えられる

その他

- 画一的に決めがたい
- 保護者の希望
- 医療者・患者が信頼感で結ばれた環境

心肺機能に関する手術の不適状態の回答は表 5 の通りであった。

図5 手術適応とならない状態（複数回答）

返送 88 回答数中

心肺の状態	回答数
心不全（未治療）	47
心不全（治療あり）	7
心不全なし	1
呼吸不全(NPPV)	31
呼吸不全(TIV)	24
呼吸不全なし	4

D. 考察

国外では神経筋疾患側弯に対する脊椎外科治療は治療選択肢の一つとして広く行われているが，国内では一般的とは言い難い。本検討結果でも，手術施行施設は限られ，特定の施設に症例が集中していることが明らかになった。

脊柱外科手術は大規模な手術であり，患者への負担も大きく，決して多くの施設で手術可能となることを期待するわけではない。本検討で得られた手術施行症例の結果は，合併症や必ずしも満足とはいかない患者からの感想もあるものの，概ね良好と考えられるものが多い。通常，神経筋疾患を診察している医師は，神経内科や小児科といった内科系の医師が中心である。しかしながら，脊柱外科に関する情報を得る機会決して多くなく，これまで情報がないために，手術適応時期を逸した症例が数多くあったと推定される。いずれの施設で手術が可能かといった情報発信は必要であろう。

一方，側弯神経筋疾患側弯の手術経験の有無にも左右されると推定するが，整形外科医師や施設により脊椎外科手術の適応基準が異なることが伺われた。

内科系・整形外科ともに症例蓄積による情報分析を継続的に行う必要がある。

E. 結論

国内では一般的治療とは言い難い治療法であるが，内科系医師が治療選択肢の一つとして考慮できるような情報蓄積・発信が必要と考えられる。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

（準備中）

2. 学会発表

第 53 回日本小児神経学会総会（平成 23 年 5 月 26-28 日）にて発表予定。

H. 知的財産権の出願・登録状況（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

脳波異常を伴う脊髄性筋萎縮症患児に対するバルプロ酸投与
齊藤利雄 国立病院機構刀根山病院 神経内科・小児神経内科

研究要旨

脳波異常治療のため脊髄性筋萎縮症(SMA) 6歳女児にバルプロ酸(VPA)投与を行った。VPA投与後、脳波異常は改善したが、Hammersmith式機能的運動能力尺度、呼吸機能の改善は明らかでなかった。VPA投与後の末梢血白血球を用いたRT-PCR法による評価では、*FL-SMN*転写は投与前に比し若干ながら増加、 $\Delta 7-SMN$ は低下し、*Total-SMN*は若干増加していた。一方、*ASF/SF2*、*hnRNPA1*転写も若干ながら増加傾向であった。*SMN*、*ASF/SF2*、*hnRNPA1*転写は、VPA投与による影響を受けていると考えられるが、VPA投与によるSMA治療では、その評価方法を検討する必要がある。

共同研究者

西尾久英, Indra Sari Kusuma Harahap, 森川 悟
(神戸大学大学院医学研究科地域社会医学・健康
科学講座 疫学分野)
藤村晴俊, 佐古田三郎(国立病院機構刀根山病
院 神経内科)

A. 研究目的

抗てんかん薬のバルプロ酸(VPA)は、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(HDAC阻害剤)としても注目され、脊髄性筋萎縮症(SMA)の治療薬としての効果が期待される。われわれは、脳波異常治療のためVPA投与を行ったSMA患児で、VPA投与前後に、SMA臨床病状・検査所見、*SMN*転写を評価した。

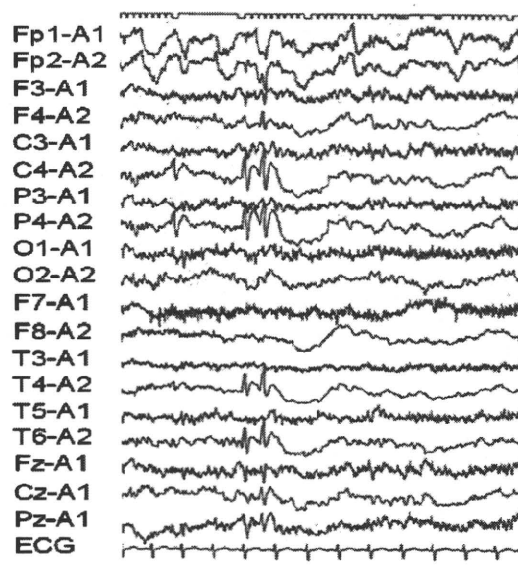
B. 研究方法

症例は6歳女児。*SMN1*遺伝子は欠失、*SMN2*遺伝子は存在し、コピー数は*SMN2*が3コピーであった。知能正常、起立歩行不能で、夜間中心にNPPVを施行している。脳波検査では、臨床症状は明らかでないが、右側頭から頭頂部にかけてスパイクなどの異常脳波頻発を認める(図1)。

(倫理面への配慮)

VPA投与・検査にあたり、両親・本人に了解を得、*SMN*解析に関して、神戸大学倫理委員会の承認を得た。

図1



C. 研究結果

VPAを25mg/日で投与開始し、開始後10月で225mg/日とした。開始後5月からカルニチン100mg/日の投与も併用した。脳波では、異常波の減少を認めた。Hammersmith式機能的運動能力尺度は、開始前1/40、開始後10月1/40でスコアの改善は認めなかった。開始前VCは610ml~700mlであったが、開始後10月も600mlと同程度であった。また、開始前MICは850ml、開始後10月700mlと若干減少、開始前CPFは50 l/min、開始後10月70 l/minで軽度ながら増加した。VPA血中濃度は11~16 μ g/mlで、肝機能異常は認めず、カルニチン分画も正常であった。末梢

血白血球を用いたRT-PCR法による評価を、GAPDH 転写を internal reference として、VPA 投与開始後 2 月 (VPA50mg/日), 5 月 (100mg/日), 7 月 (125mg/日) に行った。投与 2, 5, 7 月での *FL-SMN* の転写は投与前 0.69 に比し若干ながら増加し, 7 月では 0.87 であったが, コントロールの 87% に留まった (図 2)。 $\Delta 7$ -*SMN* は, 評価月ごとの変動が大きかったが, 投与前 1.92 に比し低下傾向を示し, 投与 7 月では 0.57 であった (図 3)。Total-*SMN* は, 投与前 1.83 に比し, 2 月では減少, 5, 7 月では若干増加し 7 月で 1.9 であった (図 4)。

図 2

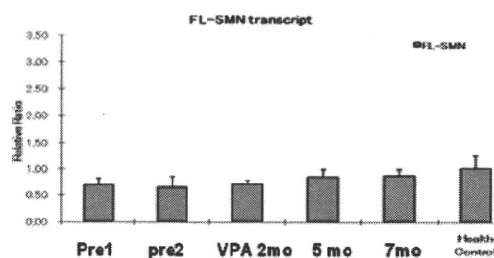


図 3

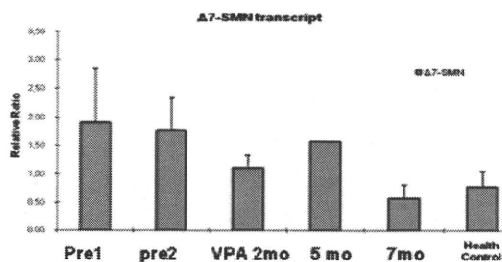
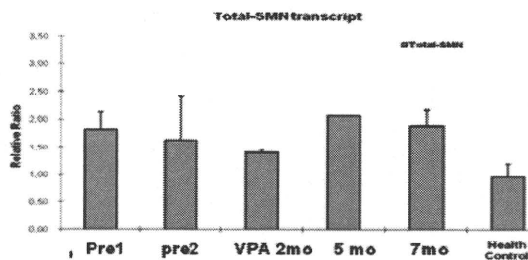


図 4



ASF/SF2 は, 評価月ごとの変動が大きく, 投与前 1.46 に対し, 投与 2 月で 2.93 と増加したが,

5, 7 月で減少し 7 月で 1.71 であった (図 5)。hnRNP1 は投与前 1.57 であったが, 5 月で 1.03 と減少, 7 月で 1.65 で若干増加傾向であった (図 6)。

図 5

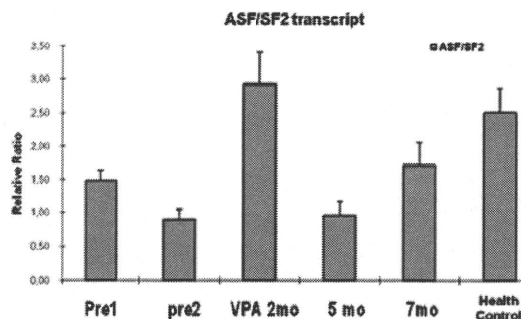
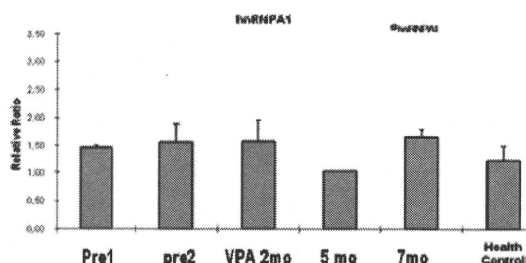


図 6



D. 考察

HDAC 阻害剤が SMN 蛋白量を増加させる機序として, SMN2 遺伝子プロモーターの活性化による SMN2 遺伝子転写の促進 (全長型 SMN2 mRNA 及び $\Delta 7$ -SMN2 mRNA の産生量増加), スプライシング関連蛋白をコードする遺伝子活性化による SMN2 遺伝子エクソン 7 のスプライシングの進行, これら 2 つの機序が組み合わせの 3 つの可能性が考えられている。

末梢血白血球を用いた本検討では, *FL-SMN* 転写は若干ながら増加していたが, $\Delta 7$ -*SMN* は変動あるものの, 投与前に比し低下, Total-*SMN* は投与前に比し若干増加していた。一方, SMN 遺伝子スプライシング制御に関連する ASF/SF2 は変動幅大きい若干増加, hnRNP1 転写も若干増加傾向であった。こうした, VPA 投与前後での変動

は、上述の VPA 投与による効果による影響のほか、測定系の fluctuation の影響など、複数の原因が考えられるが、既報告と同様、VPA は SMN 蛋白増加の方向に働いていると考えられる。

しかしながら、脳波の異常所見は改善したものの、SMA の臨床症状評価では、既報告のような明らかな変化は認めなかった。問題点としては、末梢血白血球での SMN 蛋白の増加が脊髄前角細胞レベルでの SMN 蛋白の増加を反映するか否か不明であること、病状変化が軽微であった場合、本検討での評価法では detect 出来ない可能性があること、などが挙げられる。

SMA 患者に VPA を投与し、その臨床効果を判定するためには、末梢血白血球での SMN 蛋白の増加が脊髄前角細胞レベルでの SMN 蛋白の増加を反映するか否かの検討、臨床症状の評価法の検討、さらに RT-PCR による評価も含め、簡便に評価できる新規マーカーの開発、などが課題としてあげられよう。

E. 結論

VPA は SMA 治療薬としての効果を期待できるが、評価方法の検討が必要である。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(準備中)

2. 学会発表

第 49 回日本小児神経学会近畿地方会(平成 23 年 2 月 19 日)にて発表予定。

H. 知的財産権の出願・登録状況 (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

High-Resolution Melting 解析を用いた脊髄性筋萎縮症の遺伝子診断

西尾久英 神戸大学 疫学分野

研究要旨

High-Resolution Melting 解析（HRMA）はその簡便さと高い検出力をもつことから、近年用いられるようになってきた新しい手法である。今回我々は HRMA を用いて、*SMN1* 遺伝子の欠失診断を行った。*SMN1* 遺伝子欠失を認める患者 41 例、*SMN2* 遺伝子欠失を認める症例 3 例、*SMN1* 遺伝子・*SMN2* 遺伝子ともに欠失を認めない症例 50 例を正確に分類可能であり、PCR-RFLP 法の結果と比較すると感度・特異度ともに 100%であった。

また、HRMA を用いた微小変異のスクリーニングを行い、エクソン 3、エクソン 6 の微小変異を検出できた。

HRMA は SMA の遺伝子診断に有用であり、同時に多くの検体を検査できるため、将来予想されうる新生児スクリーニングにも利用可能である。

共同研究者

齊藤利雄（国立病院機構刀根山病院 神経内科・小児神経内科）

森川 悟（神戸大学疫学分野）

A. 研究目的

脊髄性筋萎縮症（SMA）は *SMN1* 遺伝子の変異によって発症する最も頻度の高い神経筋疾患の一つで、常染色体劣性遺伝の形式をとる。最も頻度の高い変異は *SMN1* 遺伝子の欠失であり、ほぼ 90%以上の SMA 患者において、*SMN1* 遺伝子エクソン 7, 8 の両者もしくはエクソン 7 のみの欠失を認める。*SMN1* 遺伝子の欠失診断には PCR-RFLP 法が広く用いられているが制限酵素による不完全な切断が起こった際に欠失がマスクされてしまう可能性がある。他には SSCP や DHPLC などの手段が開発されているが、作業が複雑であったり時間を要したりすることから定着には至っていない。

近年 High-Resolution Melting 解析（HRMA）がその簡便さと高い検出力をもつことから、急速に用いられるようになってきた。HRMA は飽和型 DNA 結合蛍光色素を用いることにより高解像度の melting curve が得られ、その解析により 1 塩基の変異でも検出が可能である、解析を行う

上で PCR 後に特殊な処置を必要としない、約 1 時間 30 分という短時間で多検体を同時に解析可能であるという利点を有する。

2009 年に Chen らがプローブを用いた HRMA では非標識プローブを用いた HRMA による *SMN1* 遺伝子の欠失診断を報告したが、非標識プローブを用いない通常の HRMA では *SMN1* 遺伝子の欠失を診断できなかった。非標識プローブを用いた HRMA は特定の変異を高い感度・特異度で検出する点においては優れているが、未知の変異の検出などの応用性に乏しい。

そこで今回我々は、非標識プローブを用いない通常の HRMA を用いて *SMN1* 遺伝子の欠失診断を目的として本研究を行った。また、HRMA による点突然変異のスクリーニングを試みた。

B. 研究方法

SMA 患者 43 例と対照 67 例を本研究の対象とした。遺伝子は DNA 抽出キット「SepaGene」（三光純薬）を用いて抽出した。HRMA には Roche diagnostic 社 LightCycler®480 System II および Roche diagnostic 社 LightCycler®480 Gene Scanning Software を使用した。

①HRMA による *SMN1* 遺伝子の欠失診断

SMA 患者 41 例と対照 50 例を対象とした。*SMN1*

遺伝子の欠失を正しく検出できているか評価するため、まず PCR-RFLP 法による *SMN1* 遺伝子の欠失診断を行った。PCR-RFLP 法では 41 名の SMA 患者が *SMN1* 遺伝子の欠失を有した。対照 50 例中 3 例に *SMN2* 遺伝子の欠失を認めしたが、残り 47 例には *SMN1* 遺伝子・*SMN2* 遺伝子に欠失を認めなかった。

続いて *SMN* 遺伝子エクソン 7 に関する HRMA を行った。プライマーは R111 (5'-AGA CTA TCA ACT TAA TTT CT-3')、541C770 (5'-TAA GGA ATG TGA GCA CCT TCC TTC-3') を用いた (Lefebvre et al., 1995)。

②HRMA を用いた微小変異のスクリーニング

我々は、以前 *SMN1* 遺伝子エクソン 3 の Tudor domain に新規変異 (275G>C) を認めた SMA1 型の 2 例を報告した (Kotani et al., 2007)。この 2 例と対照 7 例を対象とし、HRMA によるエクソン 3 における既知の微小変異のスクリーニングを行った。

また、臨床症状からは SMA を疑い、遺伝子検査にて *SMN1* 遺伝子の片側アレルの欠失を認めた 1 例と対照 10 例に対し、*SMN* 遺伝子の全エクソンに関するスクリーニングを行った。その後変異の同定のためダイレクトシーケンスを行った。

(倫理面への配慮)

本研究は神戸大学医学倫理委員会による承認を得て行われた。

C. 研究結果

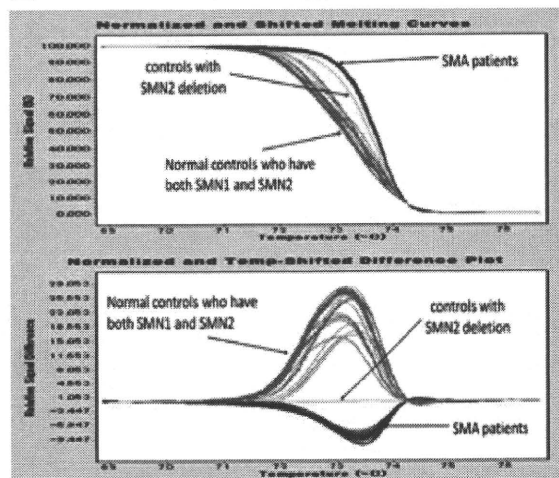
①HRMA による *SMN1* 遺伝子の欠失診断

HRMA では図 1 上に示すように 3 種類のパターンの melting curve を認めた。LightCycler®480 Gene Scanning Software による解析を行ったところ、図 1 下に示すように、*SMN1* 遺伝子と *SMN2* 遺伝子をどちらも有しているグループ、*SMN2* 遺伝子の欠失を認めるグループ、*SMN1* 遺伝子の欠

失を認める SMA 患者グループに分類することが可能であった。

PCR-RFLP 法との比較を行ったところ、PCR-RFLP 法で *SMN1* 遺伝子欠失を認めた患者 41 例は全て HRMA でも *SMN1* 遺伝子欠失群に分類され、PCR-RFLP 法で *SMN1* 遺伝子欠失を認めない症例 50 例は、HRMA でも全て *SMN1* 遺伝子欠失を認めないグループ (*SMN1* 遺伝子と *SMN2* 遺伝子をどちらも有しているグループ、*SMN2* 遺伝子の欠失を認めるグループ) に分類され、感度・特異度ともに 100%であった。

図 1 HRMA による *SMN1* 遺伝子の欠失診断



②HRMA を用いた微小変異のスクリーニング

HRMA によるエクソン 3 における既知の微小変異のスクリーニングでは、図 2 に示すように、患者 2 例と対照 7 例は異なるグループに分類することができた。HRMA による微小変異のスクリーニングが有用である可能性が示唆された。

次に臨床症状からは SMA を疑い、遺伝子検査にて *SMN1* 遺伝子の片側アレルの欠失を認めた 1 例に対する HRMA では、全エクソンに関して HRMA による解析を行ったところ、図 3 に示すようにエクソン 6 で明らかに正常対照とは異なる HRMA のパターンを取ることが判明した。

患児がエクソン 6 に変異を有している可能性が強く示唆されたため、エクソン 6 のダイレク

トシークエンスを行った。ダイレクトシークエンスでは Exon6 の Y-G box 内に位置する c. 830 A >G 変異が判明した（新規変異）。

図2 HRMAによる既知の変異のスクリーニング
(エクソン3)

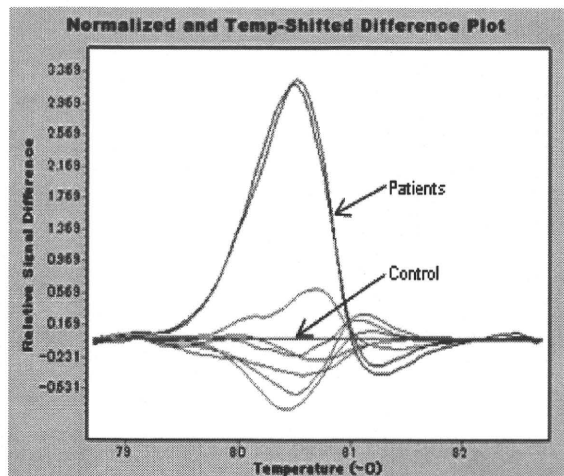
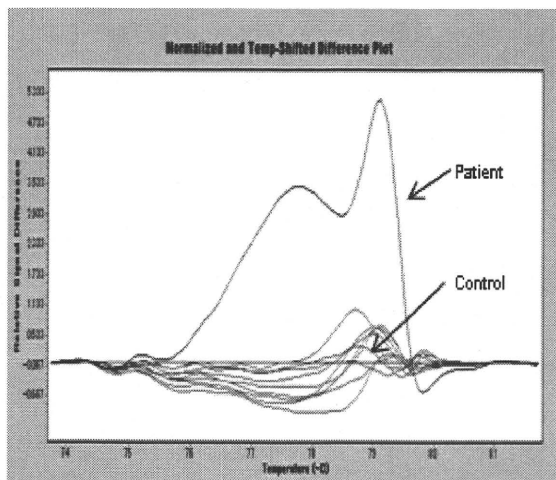


図3 HRMAによる未知の変異のスクリーニング
(エクソン6)



D. 考察

本研究では HRMA を用いることにより、*SMN1* 遺伝子の欠失が検出できた。PCR-RFLP 法の結果と比較すると感度・特異度ともに 100%であった。HRMA は短時間で非常に高精度の *SMN1* 遺伝子の欠失診断が可能であることが判明した。

また、HRMA によってエクソン3、エクソン6の微小変異を検出することができた。*SMN1* 遺伝

子の欠失診断で変異を認めなかった症例に対しても、HRMA で微小変異のスクリーニングを行う事により *SMN1* 遺伝子の変異を検出することが可能であると考えられた。

以上より HRMA は SMA の遺伝子診断に有用であると考えられた。

HRMA は同時かつ短時間で多検体を解析することが可能であり (Roche 社 LightCycler®480 では 1 時間 30 分で最高 384 検体を同時に解析可能)、新生児スクリーニングにも利用可能な検査法である。

E. 結論

HRMA は *SMN1* 遺伝子の欠失診断、微小変異のスクリーニングに有用である。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

投稿中。

2. 学会発表

なし。

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (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

特記事項なし

神経・筋疾患患者に対する装着型ロボットの臨床研究・開発に関する研究
中島孝 国立病院機構新潟病院 神経内科 副院長

研究要旨

脊髄性筋萎縮症（SMA）、シャルコーマリートゥース（CMT）、筋萎縮性側索硬化症などの進行性の神経原性筋萎縮を来す疾患群は根本的な治療法の開発が望まれているが、現時点では成功していない。本研究では、この様な疾患患者に対して、随意的な筋収縮を意図した際に、装着型ロボット HAL（hybrid assistive limb）が患者の表面筋電図などの生体情報をもとに適切なアシスト量を決めて、筋収縮を助けることにより、筋の過疲労を減少させ、筋力低下の進行を抑制できるのではないかとという仮説に基づいて、研究をおこなう。今回、それに必要な機器の開発研究と治験・臨床試験にむけた探索的検討を安全性も含めておこなった。上記の治験・臨床試験を行うに際しての神経筋疾患用の HAL の開発に成功し、必要な安全性を保証する方法も確立できた。

共同研究者

山海嘉之（筑波大学大学院システム情報工学研究科）

HAL ワークグループ（国立病院機構新潟病院リハビリテーション科）

A. 研究目的

脊髄性筋萎縮症（SMA）、シャルコーマリートゥース（CMT）、筋萎縮性側索硬化症などの進行性疾患群、慢性炎症性脱髄性神経炎の一部、軸索型ギラン・バレー症候群などの治療困難な疾患群、などを含む神経原性筋萎縮を来す疾患群は難治性な上、障害が高度であり根本的な治療法の開発が望まれているが、現時点では成功しておらず、多専門職種ケアによる生活の質（QOL）の向上がおこなわれているだけである。本研究では、この様な疾患患者に対して、随意的な筋収縮を意図した際に、装着型ロボット HAL（hybrid assistive limb）が患者の表面筋電図などの生体情報をもとに適切なアシスト量を決めて、筋収縮を助けることにより、筋の過疲労を減少させ、筋力低下の進行を抑制できるのではないかとという仮説に基づいて、臨床研究をおこなう。それに必要な機器の開発研究と臨床試

験にむけた探索的検討を安全性も含めておこなう。

B. 研究方法

探索的な対象を SMA、CMT などの神経筋疾患として、HAL の福祉モデルを装着して、電極の装着方法、HAL と関節運動の評価、安全性の評価などに関して検討をおこなった。さらに、神経筋疾患に適した HAL の開発のために、生体電位データを共有し、山海嘉之教授（筑波大学大学院システム情報工学研究科）に開発を依頼した。

（倫理面への配慮）

臨床研究の倫理指針、ヘルシンキ宣言などに従った。

C. 研究結果および考察

被験者として SMA3 型 51 代の男性に対して、HAL-福祉用（両脚型）を装着したが、生体電極からの電位は HAL のアクチュエータトルクを発生させるにいたらなかった。このため HAL-HT01（両脚型）を基に、実際の SMA 患者の表面筋電図から生体信号処理の方法の変更を（筑波大学山海研究室にて）おこなった。さらに、SMA 患者で、関節運動意図を示す有効な表面筋電図をスクリ

ーニングする方法を検討した。その結果、微弱的な表面筋電図であっても HAL は駆動し、今まで動かなかった関節運動をおこなうことが可能になった。

CMT の 37 歳女性患者に対して、HAL-福祉用(両脚型)を同様な方法で表面筋電図をスクリーニングした上で電極を装着して HAL によるアシストが可能か検討したが、安定した随意運動のトルクを発生させることはできなかった。SMA 用に開発された HAL の生体信号処理方法を使うことで、安定した随意運動トルクを発生させることができた。また、リフターを用いた安全な歩行方法を検討した。HAL+リフターによる歩行を行うことで使用後に患者は主観的な両脚の動きの改善と杖歩行の改善を感じた。今回の検討により、臨床試験にむけた探索的な研究をすすめていく上で、基盤的な検討結果として十分な成果をあげることができた。

E. 結論

今回の検討で、神経筋疾患用の HAL の開発に成功し、HAL を使った神経筋疾患に対する治験・臨床試験での必要な安全性を保証する方法も確立できた。HAL が SMA などの神経筋疾患で障害された機能の補完以上の効果、すなわち疾患の自然経過を改善する治療効果をもたらすかどうかの検証にむけた探索的な検討として成功し、治験・臨床試験にむけた準備をおこなうことが可能となった。さらに、将来、HAL 装着による介入効果と薬物治療や遺伝子治療を組み合わせた治療を構築する可能性も検討できると思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

共同研究者に問い合わせ中

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

ベクターとしてのポリオウイルスに関する研究

野本明男 財団法人微生物化学研究会微生物化学研究所 所長

研究要旨

運動神経向性を持つポリオウイルスのゲノムの内、キャプシド蛋白質コーディング領域を欠失したゲノムを持つ欠陥干渉粒子（DI 粒子）に肝細胞増殖因子（HGF）の mRNA を組み込み、ポリオウイルス感受性トランスジェニックマウスの筋肉内に接種し、中枢神経系内での分泌型蛋白質 HGF（Hepatocyte growth fact）発現を観察した。その結果、筋肉内接種 16 時間後から、脊髄内で HGF が発現し始めることを明らかにした。ポリオウイルスベクターによる、分泌型蛋白質の発現に成功したのは、この研究が最初である。

共同研究者

千葉妃織（東京大学大学院医学系研究科）

端川勉（理化学研究所研究基盤センター）

五十嵐博子（東京大学大学院医学系研究科）

大岡静衣（東京大学大学院医学系研究科、現在
国立がん研究センター）

大谷若菜（大阪大学大学院医学系研究科）

船越 洋（大阪大学大学院医学系研究科）

中村敏一（大阪大学先端イノベーションセンタ
ー）

A. 研究目的

ポリオウイルス（PV）は運動神経向性を持つウイルスである。したがって、運動神経細胞の疾患に関し、PV を発現ベクターとして使い、有用蛋白質を効率的に運動神経細胞に発現させる事ができると考えられる。PV は、中枢神経系に毒性を示すので、複製能を欠失したウイルスを使用することが望ましい。幸い PV には自己複製能を持たず 1 回限りの感染が成立する DI が存在する。ここでは、ALS の病態進行の遅延に有益な分泌蛋白質である HGF の mRNA を PV DI に導入し、運動神経細胞特異的に HGF を発現する PV ベクターを開発することを目指した。また、これまで、このベクターでは、分泌型蛋白質の発現は困難であるとの報告がある。この点を、克服することも、

目的である。

B. 研究方法

PV 構造蛋白質コード領域を分泌蛋白質であるヒト HGF のシグナル配列付き mRNA に置換し、この HGF コード領域を PV internal ribosome entry site (IRES) で、PV の RNA 複製用蛋白質コード領域を encephalomyocarditis virus (EMCV) IRES で発現させるよう設計したダイシストロニック型 PV DI プラスミド pDI (HGF)d を作製し、これに由来するウイルス粒子 DI (HGF)d を得た。PV 感受性のヒト PV 受容体発現トランスジェニックマウス (hPVR-Tg) に DI (HGF)d を筋肉内接種し、経時的に脊髄を採取し、PV 抗原および HGF 抗原を免疫組織染色法により観察した。

（倫理面への配慮）

動物実験は東京大学が定める指針にしたがって遂行した。また、組換え生物実験に関しても東京大学の指針にしたがって行った。

C. 研究結果

DI (HGF)d を筋肉内接種 16 時間後から、脊髄前角の α 運動神経細胞で PV 抗原ならびに HGF 抗原が検出された。

D. 考察

PV は筋肉内接種 16 時間後から脊髄内で PV 力価の上昇が確認され始めることを既に我々は明らかにしており、DI (HGF)d が筋肉内接種 16 時間から脊髄内で PV・HGF 抗原が検出され始めることと一致している。また、 α 運動神経細胞は筋肉へ直接軸索を伸ばしているものもあることから、DI (HGF)d の筋肉内接種 16 時間後に α 運動神経細胞で見られた PV・HGF 抗原は、接種された DI (HGF)d 粒子を取り込んだ運動神経細胞の細胞体で、接種された DI (HGF)d が複製したものを検出したと考えられる。

HGF は、分泌型の蛋白質である。これまで、文献的にはポリオベクターでは分泌型蛋白質の発現は出来ないことになっていたが、我々は、ダイシストロニック型にしたベクターを使用し、発現が可能であることを示すことが出来た。この原因は、現在のところ不明であるが、モノシストロニック型にすると、PV の RNA 複製用蛋白質も分泌される方向に運ばれるためではないかと考えている。

E. 結論

ポリオウイルスをベクターとし、外来の分泌型蛋白質を中枢神経系で発現させることが可能であることを示した。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

2A protease is not a prerequisite for poliovirus replication. Hiroko Igarashi, Yasuko Yoshino, Miwako Miyazawa, Hitoshi Horie, Seii Ohka, & Akio Nomoto. J. Virol., 84(12): 5947-5957, 2010

Poliomyelitis. Satoshi Koike, & Akio

Nomoto. The Picornaviruses, Chapter 21: 339-351, 2010

2. 学会発表

Molecular mechanisms of poliovirus dissemination pathways. Akio Nomoto. BIT's 1st World Congress of Virus and Infections-2010, July 31-August 3, Busan, South Korea

ポリオウイルスの血液脳関門透過機構. 二瓶浩一、野本明男. 第 58 回日本ウイルス学会. 2011 年 11 月 7 - 9 日、徳島

運動神経初代培養細胞の分離培養系におけるポリオウイルス感染. 大岡静衣、金田祥平、藤井輝夫、五十嵐博子、野本明男. 第 58 回日本ウイルス学会. 2011 年 11 月 7 - 9 日、徳島

H. 知的財産権の出願・登録状況（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

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ito Y, Shibata N, Saito K, Kobayashi M, Osawa M.	New insights into the pathogenesis of spinal muscular atrophy.	Brain Dev.	33	321-331	2011
Kawamichi Y, Cui CH, Toyoda M, Makino H, Horie A, Takahashi Y, Matsumoto K, Saito H, Ohta H, Saito K, Umezawa A.	Cells of extraembryonic mesodermal origin confer human dystrophin in the mdx model of Duchenne muscular dystrophy.	J Cell Physiol.	223(3)	695-702	2010
斎藤加代子、伊藤万由里、荒川玲子	脊髄性筋萎縮症	J Clinical Rehabilitation.	19(6)	601-606	2010
斎藤加代子	日常診療に必要な臨床遺伝学と遺伝カウンセリング	日本医師会雑誌	139(3)	573-576	2010
斎藤加代子	保因者診断と遺伝カウンセリング	日本臨牀	68	183-188	2010
斎藤加代子	脊髄性筋萎縮症 (SMA) の遺伝子診断法	難病と在宅ケア	16(6)	13-15	2010
Hashimoto R, Tanaka Y, Nakano I.	Heading Disorientation : A new test and a possible underlying mechanism.	Eur Neurol.	63	87-93	2010
Muramatsu S, Fujimoto K, Kato S, Mizukami H, Asari S, Ikeguchi K, Kawakami T, Urabe M, Kume A, Sato T, Watanabe E, Ozawa K, Nakano I.	A phase I study of aromatic L-amino acid decarboxylase gene therapy for parkinson's disease.	Molecular Therapy.	18(9)	1731-35	2010
Doi Y, Yokoyama T, Tango T, Takahashi K, Fujimoto K, Nakano I.	Temporal trends and geographic clusters of mortality from amyotrophic lateral sclerosis in Japan, 1995-2004.	J Neurol Sci.	298	78-84	2010
Ishihara K, Ichikawa H, Suzuki Y, Shiota J, Nakano I, Kawamura M.	Is lesion of Exner's area linked to progressive agraphia in amyotrophic lateral sclerosis with dementia? An autopsy case report.	Behav Neurol.	23	153-158	2010
中野今治	パーキンソン病の遺伝子治療-実用化に向けて	日本医事新報	4482	73-80	2010
中野今治	古典型ALSの神経病理-下位運動ニューロンにみられるもの	医学のあゆみ	235	220-226	2010
Yuki N, Watanabe H, Nakajima T, Späth PJ.	IVIg blocks complement deposition mediated by anti-GM1 antibodies in multifocal motor neuropathy.	J Neurol Neurosurg Psychiatry.	82	87-91	2011
Yuki N, Takahashi Y, Ihara T, Ito S, Nakajima T, Funakoshi K, Furukawa K, Kobayashi K, Odaka M.	Lack of antibody response to Guillain-Barre syndrome-related gangliosides in mice and men after novel flu vaccination.	J Neurol Neurosurg Psychiatry.			2010 Nov 7. [Epub ahead of print]

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Original article

New insights into the pathogenesis of spinal muscular atrophy

Yasushi Ito^{a,*}, Noriyuki Shibata^b, Kayoko Saito^c, Makio Kobayashi^b, Makiko Osawa^a

^a Department of Pediatrics, School of Medicine, Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan

^b Department of Pathology, School of Medicine, Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan

^c Institute of Medical Genetics, Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan

Received 8 November 2009; received in revised form 10 June 2010; accepted 12 June 2010

Abstract

To clarify the pathomechanism of spinal muscular atrophy (SMA) with mutations in the gene for survival motor neuron (SMN) protein, postmortem neuropathological analyses were performed on spinal cords obtained at autopsy from 2 fetuses with SMA, 5 infants and a low teenager with SMA type 1, and a higher teenager with SMA type 2; the diagnosis of all of them was confirmed clinically and genetically. Histopathologically, it was noted that lower motor neurons (LMNs) in the SMA cases showed immature profiles characterized by fine Nissl bodies restricted to the periphery of small round somata with a few cell processes in the fetal period, and showed small-sized profiles in the postnatal period. LMNs began to reduce in size and number in the fetal period, ballooned neurons (BNs) appeared postnatally, and the remaining LMNs including BNs diminished with age. BNs were filled with phosphorylated neurofilament protein, and morphologically similar to but smaller than typical chromatolytic neurons as axonal reaction. The population of survived LMNs was relatively preserved in an SMA type 2 case, who lived to 17-year-old, as compared to SMA type 1 cases. Immunohistochemical analysis demonstrated expression of Bcl-2, Bax, activated caspase-3 and SMN in the LMNs prominent in the fetal cases. There was no significant difference in staining for these substances between the control and SMA cases. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling assay revealed no significant signal in the control and SMA cases. Given that downregulation of SMN leads to a failure in neurite outgrowth and neuromuscular contact of LMNs, the present results suggest the involvement of a fetal developmental maturation error as well as a postnatal retrograde dying-back degeneration of LMNs in SMN-mutated SMA.

© 2010 The Japanese Society of Child Neurology. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Spinal muscular atrophy (SMA); Clinicopathological study; Ballooned neuron; Survival motor neuron (SMN); Programmed cell death

1. Introduction

Spinal muscular atrophy (SMA) is an autosomal-recessive neurological disorder characterized by progressive loss of lower motor neurons (LMNs) in the spinal cord and lower brain stem, associated with a resultant neurogenic muscular atrophy [1,2]. SMA is subclassified into three clinical phenotypes: Werdnig-Hoffmann disease (type 1), intermediate form (type 2) and Kugel-

berg-Welander disease (type 3). SMA type 1 is the most severe form, with clinical onset before 6 months of age; the majority of the affected patients naturally die by 1-year-old (y), although some survive beyond 2 y with artificial ventilation. SMA types 2 and 3 patients are affected before and after 18 months of age, respectively.

The gene for survival motor neuron (SMN) protein, responsible for the majority of SMA cases, was identified in 1995 on human chromosome 5q13 [3]; this gene is duplicated with a telomeric copy (SMN1) and a centromeric analogue copy (SMN2) [3]. The SMN1 gene produces full-length SMN transcript, whereas the SMN2 gene produces mainly SMN transcript lacking exon 7

* Corresponding author. Address: 8-1 Kawada-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8666, Japan. Tel.: +81 3 3353 8111x31230; fax: +81 3 5269 7338.

E-mail address: ymitoh@cf6.so-net.ne.jp (Y. Ito).

and to a lesser extent reduced levels of full-length SMN transcript [3,4]. The reduced levels of full-length SMN transcript result in downregulation of SMN protein, thereby causing SMA. Modifier genes such as the neuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP) gene [5] and the p44 gene [6] are located on the same locus to that of the SMN gene. SMN protein is ubiquitously distributed in the fetal period and markedly reduced in the postnatal period, indicating that this substance is required for embryonic-fetal development [7,8]. Studies using immunochemical and immunohistochemical approaches disclosed a significant downregulation of SMN protein in the spinal cords of SMA patients as compared to normal controls [9,10]. The SMN1 gene is homozygously mutated in more than 90% of the SMA patients [3]. Therefore, many of the SMN1-mutated SMA patients have only the SMN2 gene, leading to reduced levels of full-length SMN protein. In particular, deletion of the SMN1 gene, which does not alter the number of SMN2 copies, causes severe SMA phenotype, whereas the conversion of the SMN1 gene to the SMN2 gene, which could increase the number of SMN2 copies, causes the milder SMA 2 or 3 phenotype [11].

Although there have been only a few postmortem studies on SMA spinal cords particularly from types 2 and 3 [12,13], the pathological differences between SMA type 1 and milder phenotypes including SMA fetus have not yet been fully understood. Furthermore, little is known about the precise mechanism underlying various onset ages of the three SMA phenotypes with a common genetic error. While programmed cell death (PCD) has been shown to be involved in the pathogenesis of SMA type 1 [14–16], mechanisms by which LMNs are degenerated in SMA types 2 and 3 remain to be determined. To address this issue, we examined postmortem spinal cords obtained at autopsy from fetal and postnatal SMA cases by morphological approaches to LMN pathology, focusing on histopathological verification and the state of expression of apoptosis-related proteins and SMN as well as DNA fragmentation. We also assessed the significance of our results in comparison with the literature.

2. Materials and methods

2.1. Subjects and tissue preparation

This investigation was carried out on spinal cords removed at autopsy from 9 SMA cases and 13 control cases (Table 1), and performed after obtaining written informed consent from the family members by clinical geneticists of the Japan Society of Human Genetics in our department of genetic counseling, in accordance with the “Guidelines Concerning Genetics Research” of eight gene research-related societies. Of the 9 SMA cases, two were fetuses with unknown type, five were infants with type 1, one was a low teenager with type

1, and the rest was a higher teenager with type 2. The postnatal 7 SMA patients demonstrated the characteristic clinical features of SMA meeting clinical criteria [2]. An SMA type 1 Case S7, who did not undergo genetic examinations, was an elder brother of an SMA type 1 Case S5, who presented deletions in exons 7 and 8 in the gene for SMN.

Multiple 6- μ m-thick sections were cut from formalin (10%)-fixed, paraffin-embedded spinal cord materials of each case. Sections were then used for histopathological, immunohistochemical and terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP) nick end labeling (TUNEL) analyses.

2.2. Histopathological and immunohistochemical analyses

The primary antibodies used for immunohistochemistry were mouse monoclonal IgG₁ against phosphorylated neurofilament protein (p-NFP) (Clone No. SMI31; diluted 1:10,000; Sternberger Monoclonals, Baltimore, MD, USA), rabbit polyclonal IgG against ubiquitin (Cat. No. Z458; diluted 1:500; Dako, Glostrup, Denmark), mouse monoclonal IgG₁ against Bcl-2 (Clone No. 124; diluted 1:500; Dako), rabbit polyclonal IgG against Bax (Cat. No. Ab-1; diluted 1:20; Oncogene Research Products, San Diego, CA, USA), rabbit polyclonal IgG against activated caspase-3 (Cat. No. 42835; diluted 1:500; Genzyme, Cambridge, MA, USA), and mouse monoclonal IgG₁ against SMN protein (Clone No. 2B1; diluted 1:100; gifted from Dr. Gideon Dreyfuss) [17].

Sections were deparaffinized, rehydrated, quenched with 3% hydrogen peroxide for 5 min at room temperature to inhibit endogenous peroxidase activity, rinsed in phosphate-buffered saline, pH 7.6 (PBS), pretreated for 30 min at room temperature with 3% nonimmune animal serum to block nonspecific antibody binding, and then incubated overnight at 4 °C with the primary antibodies. Prior to staining for Bcl-2 and SMN protein, antigen retrieval was performed by microwaving sections in 100 mM citrate buffer, pH 6.0 (400 W, 95 °C, 35 min). Immunoreaction products were visualized by the avidin–biotin–immunoperoxidase complex (ABC) method. 3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) and hematoxylin were used as the chromogen and counterstain, respectively. Sections from which the primary antibodies were omitted served as negative reaction controls. Immunohistochemical localization of the examined substances were observed by light microscopy, and verified by comparison with consecutive sections stained with hematoxylin–eosin (H&E).

2.3. TUNEL analysis

Sections were deparaffinized, rehydrated, digested with 20 μ g/mL proteinase K (Sigma Chemical, St.