

収集を試みます。疾患をお持ちの場合は、現在の主治医にご報告いただき、東京都健康長寿医療センターに一年に一回程度をめどに紹介受診をいただき、疾患治療へ何らかの貢献の努力を行います。遠方で受診が困難な場合は、主治医の方にアンケートをとることで、疾患の経過をお聞きすることを考えておりますので、登録されたことを主治医にお知らせいただければ幸いです。また、死後に医療情報を提供することに関する承諾を、あらかじめいただいておりますと、ありがたいです。

2 ご遺体の搬送が可能な範囲

献脳ドナー登録者が死亡された場合は、ご遺体を死亡された病院から、東京都健康長寿医療センターに搬送し、病理解剖終了後はご自宅等に搬送する必要があります。ブレインバンクの運営経費は研究費から支出されますので予算に制限があります。

そこで、病理解剖に関連して生じるご遺体の搬送費は、死亡病院と病理解剖実施病院を往復搬送するのに要する経費を上限としてブレインバンク事務局が負担させていただきます。また、献脳ドナー登録に基づいた病理解剖に際するご遺体の搬送の範囲は東京都およびその近県(島嶼部を除きます。具体的には事務局にお尋ねください)に限らせていただきます。

この範囲を超える場合も、ご遺族が登録同意を継続され、臨床主治医、剖検担当病理医の同意があれば、亡くなられた病院で剖検を行った後、脳を高齢者ブレインバンクに登録する方法があります。そのような可能性のある場合はあらかじめご連絡下さい。

3 献脳ドナー登録者が死亡された場合の手順

献脳ドナー登録者が死亡された時、ご遺族が登録の意志を継続される場合、東京都健康長寿医療センターに連絡いただきます。高齢者ブレインバンクは神経内科当直とともに、緊急対応システムを構築しており、病理解剖のためのご遺体の搬送について指示をいたします。なお、死亡診断書は献脳ドナー登録者が死亡された病院あるいは診療所などで発行していただきます。

献脳ドナー登録がある場合でも、ご遺族が病理解剖と病理検体の保存、および、病理検体をブレインバンクへの寄託に同意していただけない場合は病理解剖を行いません。これは、死体解剖保存法の規定により病理解剖と検体の保存を行うためにはご遺族の同意が必要であるからです。

病理解剖の実施と検体の保存は、死体解剖保存法に従ってご遺族の同意を根拠に行われますので、ご家族の同意が本人の死後継続されることが、前提となります。本説明文書の説明のほかに、ドナー登録者死亡後の手順についての説明文書を準備しておりますので、ご家族と検討される際の資料としてください。ご不明な点は電話などでお問い合わせいただければ高齢者ブレインバンクのコーディネーターがご説明いたします。

ご遺族の範囲について

原則として「配偶者、子、孫、祖父母及び同居の新属」が相当し、「喪主又は祭祀主催者となるべき者において、前記『遺族』の総意を取りまとめるものとするのが適当である」とされています。（「臓器の移植に関する法律の運用に関する指針」より）

4. 病理解剖

病理解剖とそれにより得られた脳組織などの病理検体の保存は、死体解剖保存法の規定に従って、ご遺族の同意を根拠に行われます。献脳ドナー登録の意思表示は、病理解剖の実施と病理検体の保存の正式の根拠ではありません。

患者の死亡後、ご遺族が病理解剖等に同意をしてくださった場合には、病理解剖実施病院にご同行いただきます。そこで、文書による同意が得られた後に初めて病理解剖を開始します。

病理解剖実施病院は東京都健康長寿医療センターが核ですが、ご遺族・臨床主治医・剖検担当病理医の三者同意が存在する場合は、外部病院での剖検後、高齢者ブレインバンクに搬送することも可能です。

病理解剖は、特にご指定のない場合は、全身解剖を行います。しかし、脳のみを解剖を選択することができます。全身の解剖では頭の最上部と胸から腹にかけて糸で縫った傷跡が残ります。この傷は服を着ていただくと外からは目立ちません。脳と脊髄は原則としてすべて摘出され、高齢者ブレインバンクに保存されます。東京都健康長寿医療センター外で剖検された場合は、脳・脊髄は高齢者ブレインバンクに移送され、保存されます。このほかに、心臓、肺、肝臓などの臓器や血液、脳脊髄液などの体液も、保存されます。これらの病理解剖時に得られた組織資料は剖検病理検体（略して検体）と総称されます。また、東京都健康長寿医療センターの場合は、生前に採取され、保存されている検体がある場合は、高齢者ブレインバンクに移行します。

病理解剖には通常は数時間かかります。病理解剖終了後はご遺体をご自宅まで搬送いたします。病理学的診断結果は、後ほどご遺族宛にお知らせいたします。

外部病院で死亡された場合

搬送圏内であれば、東京都健康長寿医療センターに搬送し、高齢者ブレインバンクに登録することが可能です。搬送圏外の場合、ご遺族が高齢者ブレインバンク登録の意志を継続され、臨床主治医、剖検病理医の協力が得られれば、死亡した病院で剖検後、脳・脊髄を、高齢者ブレインバンクに搬送し、登録することが可能です。

病理解剖の範囲について

病理解剖は、特にご指定のない場合は全身解剖をおこないますが、以下の理由により脳のみ解剖も選択できます。

病理解剖の第一の目的は患者の直接の死亡原因を最終診断することにあります。死因として最も多いのは三大死因、すなわち癌、心筋梗塞、脳梗塞です。直接死因としては肺炎が最も多いです。これらの病気を見逃さないために、通常は脳だけでなく、肺・心臓・肝臓・腎臓・腸などの内臓全般を検査しています。

脳のみ解剖を選択される場合には、例えば“アルツハイマー病”という疾患の臨床診断（生前の診断）正しかったのかどうか、偶然に合併する脳の病気がなかったのかという問題に答えることはできますが、脳以外の病気を確定診断することはできません。

高齢者ブレインバンクでは、解剖時に摘出した脳・脊髄・末梢神経系・筋肉のみを、専用保存庫に保存します。全身解剖にご同意いただいた場合は、心臓などの内臓諸臓器も重要な研究試料ですので、その一部も保存させていただきます。

5. 臨床情報の収集

病理診断と研究使用に際しては、臨床病名・直接死因・治療薬の内容などの臨床情報が不可欠です。欧米のブレインバンクでは、この情報を定期的に得ることで、診断・治療に関する重要な情報を、ブレインバンクから発信しています。献脳ドナー登録者が治療していた医療機関の主治医と共同で、疾患克服の市民運動としてのブレインバンク運動の意味がより強固となります。また、患者の死後ブレインバンク登録後も、死後脳検索の結果、病状に関して問い合わせをする必要が出る場合があります。高齢者ブレインバンクに登録したことを主事医にご報告下さり、情報の提供同意をあらかじめいただいていると、情報収集が行いやすく、また疾患克服の市民運動として、医師の参加者を増やすことで、より強力にすることができます。

6. 死後脳などの検体の保存

病理解剖により摘出された脳・脊髄などは、死体解剖保存法等を遵守して“ブレインバンク デポジトリー(保存庫)”で丁重に保存されます。保存においては、篤志に基づいており、無償で医療への貢献を目標としている点では同じである、輸血製剤と同様の、保管・管理体制がとられます。

リソースの保存の際は、下記のような方法がとられます。

- ①凍結し超低温槽で保存
- ②ホルマリンなどの固定液に入れて保存
- ③パラフィンなどの組織ブロックにして保存
- ④顕微鏡標本などにして保存、など

検体には個人名ではなく症例識別番号をつけて保存されます。また、症例識別番号と検体の情報はブレインバンクの検体データベースに保存されますが、個人名が登録されることはありません(匿名化と呼びます)。

7. 死後脳などの研究使用

(1) 検体の制度管理

ブレインバンクでは死後脳を研究に用いるための準備として“検体の制度管理”を行います。すなわち、個々の死後脳組織が実際の研究に使えるかどうかを調べるため、mRNAの保存状態などについて、解析を行います。なお、これらの結果はご遺族にはお知らせしません。

(2) 医学研究への検体の提供の可否の決定

高齢者ブレインバンクの最終的な目的は、医学研究を推進し、老化に伴う運動・認知機能障害の克服をめざすことです。

ブレインバンク内に“資料提供審査委員会”を設置し、研究計画の意義、倫理的問題の有無などを公正に審査した上で、検体を研究者に提供します。この際には、ご本人とご遺族から、あらかじめあらゆる公正な審査を経た研究にあれば使ってよいという同意をいただいておりますので、個別の研究計画についてご遺族にお問い合わせする事はありません。

(3) 検体の尊厳ある取り扱いと研究方法

検体を提供する場合は、死体解剖保存法等に従い、研究の実施に際して、検体は「ご遺体の一部であること」、「尊厳ある取り扱いが必要であること」、「保存に適さなくなった場合は、礼意を失しないよう火葬する必要があること」という意識を徹底させます。研究中に生じる小さな組織片などは研究実施者が回収し、焼却します。

研究使用にあたっては、病気の脳でおこっている機能異常を明らかにするために、脳組織を用いたタンパク質や mRNA や DNA の分析などを行います。研究の内容はヒトのゲノム解析の研究を含みますので、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守して研究が行われます。

(4) 研究内容などのホームページでの公開

寄託していただいた死後脳などの検体の医学研究への情報提供状況と、得られた研究成果はブレインバンクのホームページ上(<http://www.mci.gr.jp/BrainBank>)で公開します。

ブレインバンクでは、ご遺族から検体を医学研究に用いることについて、あらかじめ同意を得ています。そのため、倫理委員会から特別な指示がない限りは個別の研究計画については、ご遺族に連絡いたしません。

8. ブレインバンク検体の将来の保存

高齢者ブレインバンクでは、リソース及びその情報の管理を一義的に行います。しかし、東北大震災の時、東北大学や、筑波大学に保存されていた重要なリソースが、停電により室外温にまで上昇し、品質に重大な障害が加わった点をふまえ、寄託された検体の一部あるいは全部を、分散管理のため、他施設に委託する可能性がある点を、ご理解いただきますよう、お願いいたします。

5 献脳生前同意登録をお考えの方へ

1. 予想される不利益・利益とその対処

個人情報の漏洩の危険性があること、その防止対策については、二重連結可能匿名化を行うこと、情報の厳重な管理を行うことで対応します。

(1) 献脳ドナー登録

献脳ドナー登録自体は篤志の登録であり、いつでも撤回できますので、特に不利益はありません。また、生前からの同意があっても、ご遺族が同意されない場合は病理解剖を行いませんので、実質的な不利益はありません。

(2) 病理解剖

病理解剖は、専門の病理医が死体解剖保存法に従って実施する、法律で定められた行為で、献脳ドナー登録者の死亡診断書確認の後に行われます。したがって、直接の危害はなく不利益はありませんが、病理解剖を行うために、施設によりますが、数時間かかること、ご遺体の頭の最上部と胸腹部に縫合の傷跡が残ることをご理解ください。また、病理診断の結果、予期しなかった病気が発見されたり、遺伝性の病気が明らかになることがあります。この場合、必要があれば臨床担当医に相談していただき、ご希望により遺伝カウンセリングを行い、必要以上の不安を取り除くようにいたしますが、経費はご遺族の自己負担となります。

献脳ドナー同意登録をしたが、後日同意を撤回した方が、撤回の意思に反して病理解剖される危険がないように以下のようなしくみになっています。

- ① 献脳同意登録をしていただいた方が同意を撤回する場合、同意撤回書を郵送していただくことにより、事務局ではデータベースより情報を削除します。
- ② 献脳ドナー登録カードの裏面にも、不同意の意思表示ができるように欄を作っています。

この 2 段階の同意撤回の有無の確認により、同意撤回の意思は正しく伝わると考えています。

また、ご本人が献脳ドナー登録していても、下記のような場合は、ご遺族の同意が得られなかったとし、当然病理解剖は実施されません。

- ①ご遺族が事務局コーディネーターに電話をしてこられない。
- ②ご遺族が事務局コーディネーターとの電話で、病理解剖に対する意思確認に際して不同意を告げた場合。

さらに、病理解剖実施においては、ご遺族からの剖検同意書が必要ですので、ご遺族の意思に反して病理解剖が行われることは起こりえません。

(3)登録された検体に関して

ブレインバンクに提供(寄託)された検体はすべて匿名化した上で保存され、ご遺族の同意の範囲内に限って研究に使用します。そのため、患者ご自身、および、ご遺族ともに直接の不利益をこうむることはありません。

ご本人およびご遺族への直接の利益もありません。しかし、ご本人が生前に「社会への貢献、医学への貢献」を希望されていた場合はブレインバンクを通してその篤志が実現することになりますので、最終的にはご本人の社会貢献という形での利益になるといえます。

2. 登録の撤回

献脳ドナー登録は個人の自由意志によります。同意しない場合も、同意した後で撤回した場合も、診療上のいかなる不利益も受けません。いったん同意書を提出した後で、その同意を撤回する場合は、献脳生前同意登録撤回書を必ず事務局に郵送してください。

また、献脳ドナー登録がある場合でも、ご遺族の病理解剖と検体の保存およびブレインバンクへの寄託についての、同意がない場合は病理解剖を行いません。

さらに、病理解剖が実施され、検体がブレインバンク検体データベースに登録された後も、「ブレインバンクへの寄託の撤回と研究使用の中止」を同意書に署名したご遺族が要求できます。

この場合、高齢者ブレインバンクでは、病理学的診断に必須である顕微鏡標本と、パラフィンブロックは、診療情報として一定の期間保存しますが、検体の大部分の保存を中止し、丁寧に火葬します。ブレインバンクでは、検体を研究に用いることは中止します。研究者は、既に行った実験結果は知的資産として専有しますが、残存リソースは、茶毘に付すか、高齢者ブレインバンクに返送後、高齢者ブレインバンクで火葬に付します。

3. 個人情報の保護方針

(1)献脳ドナー登録

事務局員とコーディネータは、職務上の守秘義務を負うことを誓約したうえで業務に従事しています。献脳ドナー登録者の氏名、性別、生年月日、住所、電話番号、疾患名、同意登録の日時、同意の内容、ご家族の氏名とご家族の同意登録の状況などの情報は、事務局で紙に書かれた記録として保存され、またコンピュータ上の“献脳ドナー登録者データベース”に登録します。同意登録書などの紙に書かれた情報は、事務局の施錠できるキャビネットに厳重に保管されています。

献脳ドナー登録者データベースはブレインバンク専用サーバーに保存されます。このサーバーはファイアーウォールとアクセス制限および暗号化通信などにより厳重に保護されています。第三者による侵入を完全に阻止できない可能性もありますが、現時点で最善の個人情報漏洩対策をとり、今後も対策を強化していく予定です。

(2) 病理解剖

病理解剖実施病院では、正確な病理診断を行うために病理担当医に解剖される方のお名前、病気の状態などについて通知します。

しかし、病理担当医を含む病理検査実施者は病理検査から検体の保存まで、お名前を削除し番号で処理します。個人情報を含む書類は施錠できるキャビネットに保存されます。また、解剖された方のお名前とブレインバンク検体番号の対照表は事務局で施錠できるキャビネットに厳重に保管されます。

病理検査を担当する職員は職務上の守秘義務がありますので、個人情報は厳重に守られます。

(3) 登録された検体に関して

高齢者ブレインバンクでは、病理診断終了後に保存された組織をブレインバンク検体データベースに登録します。このとき、病理検体はすべてブレインバンク検体番号で登録されます。年齢、性別、臨床診断、病理診断、保存される検体の内容などは登録されますが、個人名は登録しません。したがって、ブレインバンク検体データベースからは個人情報が漏洩する危険性はありません。

また、ブレインバンクに寄託された検体を医学研究に提供する際はさらに別の検体番号で整理して提供します。これを、二重匿名化といいます。

4 知的財産権の帰属

ブレインバンクに寄託された検体をもとにした研究により、特許権および、それに基づく経済的利益が生じることがありますが、その権利はブレインバンク、研究機関、および研究遂行者などに属します。

5 関連法律・指針

ブレインバンクは以下の法律等と倫理指針を遵守して運営されます。その内容はホームページ(<http://www.mci.gr.jp/BrainBank>)に掲載していますのでご覧ください。

「死体解剖保存法」(昭和 24 年 6 月 10 日公布)

「病理解剖指針」(昭和 63 年 11 月 7 日移動審議会死体解剖資格審査部会申し合わせ)

「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(平成 13 年 4 月 1 日思考、文部科学省、厚生労働省、経済産業省)

6 費用について

ブレインバンクでは、献脳ドナー登録などの費用負担はありません。

問い合わせ先

お問い合わせなどはブレインバンク事務局にご連絡ください。

〒173-0015 東京都板橋区栄町 3 5 - 2

東京都健康長寿医療センター高齢者ブレインバンク

電話 03-3964-3241 内 3046

ファックス 03-3579-4776

ホームページ <http://www.mci.gr.jp/BrainBank>

e メール : mci@tmig.or.jp

II. 分担研究報告書

「筋萎縮性側索硬化症・認知症を伴う筋萎縮性側索硬化症・ユビキチン化封入体を伴う前頭側頭型認知症死後脳脊髄資源の構築」

研究代表者 村山繁雄 東京都健康長寿医療センター 老年病理学研究チーム神経病理学（ブレインバンク）

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症（ALS）～前頭側頭葉変性症（FTLD）圏の疾患の大部分を TDP-43 異常蓄積症が占める。これら疾患の死後脳脊髄資源の構築には正確な病理学的評価を行うことが必須である。そこで TDP-43 の病的蓄積を高感度に検出できる抗体を作製した。脳脊髄に蓄積した TDP-43 には異常リン酸化が生じているため、リン酸化特異抗体の作製により選択的な標識が可能になった。病理組織標本の免疫組織化学染色に適した抗体として、pS403/404 と pS409/410 に対するウサギポリクローナル抗体、pS409/410 に対するマウスモノクローナル抗体を得た。本研究が開始された後、従来、ALS-6 と言われていた家族性 ALS が RNA 結合蛋白質 FUS（FUS）の遺伝子変異によること、ALS-6 の脊髄やタウ陰性・TDP-43 陰性 FTLD の脳に FUS が蓄積していることが報告された。そこで、東京都精神医学総合研究所に標本が所蔵されていた FTLD 全 66 例の再検討を行った。その結果 9 例の FTLD-FUS が見出され、本邦における FTLD の 10～20%が FTLD-FUS であることが推測された。異常蓄積した FUS はこれまでのところ明らかな生化学的異常は認められていないが、我々の検討では、核に局在する正常な FUS に比べて、FUS 分子の中間部分が露出するような構造変化を生じていることが示唆された。現時点では、病理標本のスクリーニングには FUS 中間部分に対する市販抗体の使用が勧められる。

研究分担者氏名：秋山治彦

所属機関名：東京都精神医学総合研究所

A.研究目的

リン酸化 TDP-43 は筋萎縮性側索硬化症（ALS）、認知症を伴う筋萎縮性側索硬化症（ALS-D）、ユビキチン化封入体を伴う前頭側頭葉変性症（FTLD-U）におけるユビキチン陽性封入体の主要構成成分であり、現在これらの疾患は TDP-43 proteinopathy と総称されている。これまでの各種変性疾患脳におけるタウ、 α シヌクレインの異常蓄積解析の経験から、我々は、TDP-43 においても異常リン酸化が病理プロセスの鍵であると推測している。そこで、ALS、ALS-D、FTLD-U の脳・脊髄に蓄積した TDP-43 の異常リン酸化部位を同定するとともに、病理組織標本で異常リン酸化 TDP-43 を選択的に検出する抗体の作製を行った。

ALS、ALS-D、FTLD-U 圏の一部は特定の遺伝子の変異により生ずる。そこで臨床診断の精度を上げ、剖検脳脊髄資源構築に資するために、臨床施設と連携して、これらの疾患の原因となる遺伝子変異の検索を進めた。当初は TDP-43 およびプログラニユリン（GRN）、2009 年度からはそれに FUS を加え、シーケンスを実施した。また脳脊髄液（CSF）を用いて CSF 中の TDP-43 の測定を試み、補助診断としての臨床応用の可能性をさぐった。

2009 年はじめに、2009 年に塩基性封入体を伴う家族性筋萎縮性側索硬化症（ALS-6）の原因が RNA 結合蛋白質 FUS の遺伝子異常であることが明らかになり、同時に、この疾患の塩基性封入体に FUS が異常蓄積していることが示された。その後、タウ陰性・TDP-43 陰性の FTLD の多くで細胞質封入体が FUS 陽性であることが明らかになった。これらの群には、従来、塩基性封入体病（basophilic

inclusion body disease: BIBD), 神経細胞中間径フィラメント封入体病(neuronal intermediate filament inclusion body disease: NIFID), 非定型的FTLD-U (aFTLD-U) と呼ばれていた疾患が含まれる。そこで東京都精神医学総合研究所に所蔵されていたFTLD 全例の病理診断について再検討を行い, 本邦におけるFTLD-FUSの頻度, 病型やその病理学的特徴を明らかにした。その上で, 見出されたFTLD-FUSの9症例を用い, FUSのさまざまな部位を認識する異なる抗体によってFTLD-FUS組織標本の免疫組織化学染色を行い, FUS陽性封入体の免疫化学的なプロファイルを検討した。

B. 研究方法

抗リン酸化TDP-43抗体作製と応用

TDP-43分子には50ヶ所を超えるリン酸化候補部位(セリン残基(S), スレオニン残基(T), チロシン残基)が存在する。これら多数のリン酸化候補部位について, それぞれを含む短いペプチドを合成し, それらに対する特異抗体を作製した。こうして得られた抗体の, 剖検脳サンプルに対する反応性を免疫組織化学とイムノブロットにより調べ, 陽性反応が得られた抗体が特異的に認識するリン酸化部位を, 疾患の異常蓄積TDP-43におけるリン酸化部位として同定した。さらに, ここで得られたリン酸化TDP-43特異抗体から, ホルマリンで固定された剖検脳組織標本における異常TDP-43検出に優れているものを選別し, ALS, ALS-D, FTLD-U, さらにアルツハイマー病(AD), レヴィー小体型認知症(DLB), 嗜銀顆粒病(AGD)における異常TDP-43蓄積の有無と広がり免疫組織化学染色により解析した。

ALS, ALS-D, FTLD-U 遺伝子解析

遺伝子解析には血液あるいは剖検脳試料から抽出したDNAを常法によりPCRにかけ, 自動シーケンサーにより塩基配列を判読した。

脳脊髄液(CSF)中のTDP-43測定

CSF中のTDP-43はELISAにより測定した。間接抗体法, サンドウィッチ法を用い, 市販および自家

製のさまざまな抗体の組合せを試みた。検出には通常発色による吸光度測定, および化学発光による測光定量を用いた。

FTLD-FUS 剖検脳組織標本の免疫学的解析

FTLDの病型分類には型どおり病理組織標本を作製し, リン酸化タウ, リン酸化TDP-43, α インターネキシン, ユビキチン, FUSに対する抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。異常蓄積FUSの免疫化学的プロファイルの検討には, 東京都精神医学総合研究所所蔵のFTLD-FUS例の脳皮質標本を用いた。FUSはホルマリン固定により容易に染色性が低下する。そこで予備的研究として, 市販されている抗FUS抗体十数種類をテストし, ホルマリン固定標本でもFUSを検出する抗体7種類を選び出した。次いでこの7種の抗体を用いて免疫組織化学染色を行い, 細胞核と封入体の染色性を比較した。切片は染色前にオートクレーヴにより前処理を行った。なお必要に応じて異なる抗体濃度を使用し, 抗体を希釈していく過程で, 核と封入体, どちらの染色が先に減弱~消失するかを決めた。

(倫理面への配慮)

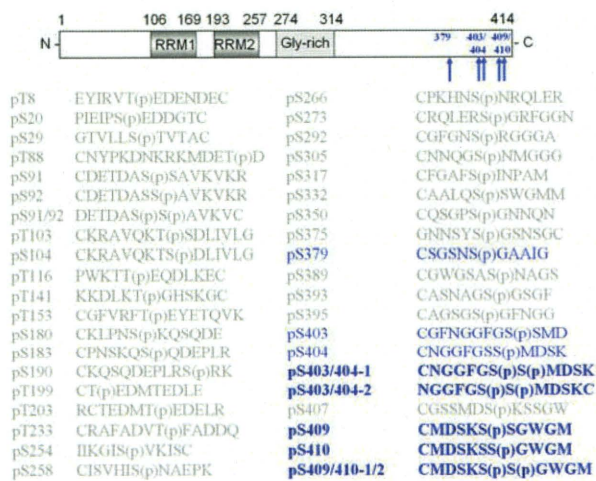
剖検脳の解析にあたっては, ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理基準に準拠することとし, 剖検時に遺族の承諾を得た場合のみ剖検材料を研究に使用した。同倫理指針策定以前に剖検になった症例については, 連結不可能匿名化による個人情報の保護を図った上で使用した。患者血液からのDNA抽出と遺伝子解析に際してはヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理基準に基づき, 試料採取を行う各施設において倫理委員会の承認を得た, あるいは当該臨床施設に倫理委員会が設置されていない場合は東京都精神医学総合研究所の倫理委員会の承認を得た, 本研究のための研究計画説明書, 試料提供承諾書等を用いて文書による提供者の承諾を得, 試料は連結可能匿名化を行った後に解析した。CSF中のTDP-43測定には, 協力病院において入院時に診断治療目的で採取した試料を臨床検査に使用しさらに一定期間保管した後廃棄する場合にその廃棄試料を研究に用いて良いとする, いわゆる包括同意を得た

試料が、保管期間を過ぎて廃棄処分になったもののみを、連結不可能匿名化の後に使用した。なおこれから研究計画全体について、東京都精神医学総合研究所における倫理委員会の承認を受けた。

C.研究結果 (図表を1~2点添付)

抗リン酸化 TDP-43 抗体作製と応用

TDP-43 のリン酸化候補部位のうち、S あるいは T 残基 36 ヶ所について当該 S または T がリン酸化されたペプチドを合成して、それぞれのペプチドに対する抗体を作製した。ALS/FTLD-U 剖検脳固定標本の免疫組織化学染色および新鮮凍結脳不溶画分のイムノブロットにおいてリン酸化抗体の陽性反応が得られたのは、今回検索した部位の中では、pS379, pS393, pS403, pS404, pS409, pS410 であった。S403 と S404 は両部位がともにリン酸化されたペプチドに対する抗体のみが強く反応したが、S409, S410 はどちらか片方および両方がリン酸化されたペプチドのいずれに対する抗体でも反応が認められた。そこで pS409/410 に対するモノクローナル抗体を作製し、そのうちから S409, S410 単独のリン酸化ペプチドとは反応しないクローンを得た。このクローンは ALS/FTLD-U 剖検脳サンプルと強く反応し、疾患脳に蓄積した TDP-43 では 409/410 両方の S がリン酸化されていることが確認された。



上の図にテストしたペプチドのうち反応が認められたリン酸化ペプチドを示す。これらのリン酸化部位は、ALS, ALS-D, FTLD-U の脳・脊髄に蓄積した

TDP-43 に共通していた。リン酸化 TDP-43 特異抗体のうち、pS403/404 (ウサギポリクローナル抗体) および pS409/410 (ウサギポリクローナル抗体とマウスモノクローナル抗体) は、剖検脳ホルマリン固定パラフィン標本における異常 TDP-43 の選択的検出に用いることができた。

つぎに作製したリン酸化 TDP-43 特異抗体を用いて様々な神経変性疾患剖検脳における異常 TDP-43 蓄積出現について検討を行った。AD および DLB における TDP-43 蓄積出現については、既に文献上複数の報告があるが、我々の検討では従来言われていたよりも高頻度に認められることがわかった。今回検討し得た症例において、AD では 53 例中 19 例 (36%)、DLB では 15 例中 8 例 (53%)、AGD では 15 例中 9 例 (60%) にリン酸化 TDP-43 の蓄積が見られた。AD/DLB における TDP-43 異常蓄積は、扁桃核、海馬辺縁系皮質などに限局して少量出現する場合から、大脳新皮質にも広がって FTLD-U に匹敵する蓄積が認められる場合まで様々であった。新皮質における広がり方としては、側頭葉→前頭葉→頭頂葉の順であると考えられた。また AD/DLB において、TDP-43 とタウあるいは α シヌクレインとの共存を調べたが、どちらの場合も共存する異常蓄積は低い頻度で観察されたのみであった。

ALS, ALS-D, FTLD-U 遺伝子解析

全国的共同研究先である臨床施設から ALS 患者の血液、あるいは血液から抽出した DNA の提供を受け、あるいは剖検脳新鮮凍結試料から抽出した DNA を用いて、TDP-43 および FUS の遺伝子変異を調べた。対象とした約 200 例のうち約 8 分の 1 が家族性 ALS であったが、これは家族性 ALS に限ってサンプル提供を受けた施設があるためであり、実際の家族性発症の頻度とは異なっている。

上記のサンプルにおいて、本邦では非家族性 ALS の 1%未満に、また SOD-1 変異のない家族性 ALS の 10%ほどに TDP-43 変異が認められた。また、SOD-1 変異陰性の家族性 ALS において、TDP-43 変異とほぼ同じ頻度で FUS 変異が認められた。TDP-43 変異を認めた 2 家系、FUS 変異を認めた 1

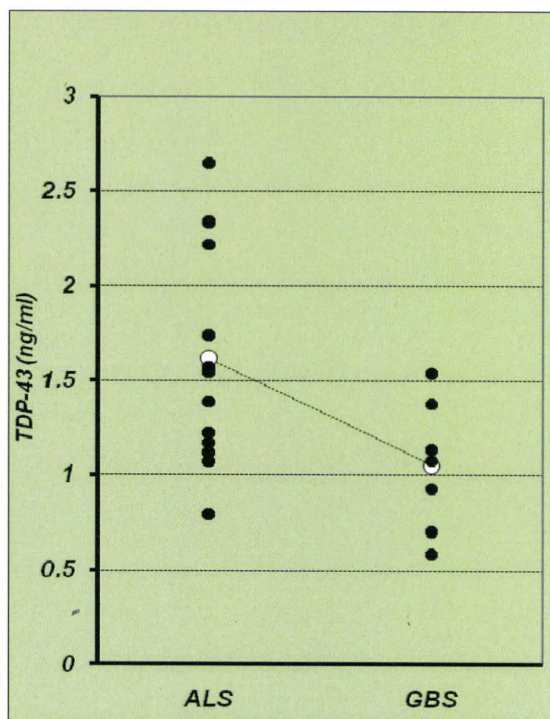
家系については症例報告を行った。

脳脊髄液 (CSF) 中の TDP-43 測定

剖検脳脊髄試料に異常蓄積した TDP-43 を選択的に検出できる間接抗体法による ELISA を開発した。

しかし脳脊髄液中あるいは血液中に微量存在すると思われる異常 TDP-43 を検出するには感度を高める必要がある。そこで様々な TDP-43 抗体を用いてサンドウィッチ ELISA を試作したが、現状で実用レベルに達したのは全長 TDP-43 のみを検出できる系であり、主要画分である C 末断片を含めて検出するには、この C 末断片をすべてキャプチャできる新たな抗体の作製が必要であると考えられた。

作製した全長型 TDP-43 を検出する ELISA について化学発光を直接測定することによる増感を試みた。感度上昇に伴うノイズ上昇を避けるため、試料は測定前に吸着カラムを通して IgG とアルブミンを除去した。この方法により測定した ALS 患者 CSF 中の TDP-43 と、比較対照に用いたギランバレー症候群の CSF 中 TDP-43 の濃度を下図に示す。両群間では統計学的には有意差が



認められるが、現状では cut-off 値を設定して鑑別診断に使用できるものではないと判断された。

FTLD-FUS 剖検脳組織標本の免疫学的解析

全 66 例の FTLD 中、9 例の FTLD-FUS が見だし

れた。タウ、TDP-43、FUS いずれの蓄積も確認できなかったのは 66 例中 1 例であった。FTLD-FUS の病型の内訳は、好塩基性封入体病 (BIBD) が 5 例、神経細胞中間径フィラメント封入体病(NIFID) が 2 例、非定型的 FTLD-U (aFTLD-U) が 1 例、分類不能の FTLD-FUS が 1 例であった。すべての例が臨床的には behavioral variant of FTD として発症していた。

なお分類不能の 1 例は、病理学的には、大脳皮質の FUS 蓄積が主として変性神経突起の形をとっており、細胞質封入体はむしろ少ない点が従来の FTLD-FUS の報告にない特徴であった。皮質下構造では細胞質封入体が比較的多く認められた。さらに、FTLD 発症後十数年の経過を経て ALS の徴候を呈し、病理学的には TDP-43 蓄積を伴う (通常の) ALS 病変を示した。偶然の合併とするには両疾患の頻度が低いが、現時点では、同一症例における FUS 蓄積と TDP-43 蓄積の同時出現 (出現部位は基本的には異なっている) を説明することは難しい。

次いで、これら FTLD-FUS 例の大脳皮質について、FUS 分子の様々な部位に対する抗体 (市販) 7 種を用いて免疫染色を行った。それぞれの抗体は FUS のアミノ酸配列のうちアミノ末端側から順に [1-50] (2 種類), [52-400], [86-213], [250-300], [400-450], [500-526] を抗原として作製されたものである。その結果、FUS のカルボキシル末端側部分 ([400-450], [500-526]) を抗原とする抗体では、核の染色性が封入体の染色性より高かった。一方 FUS の中間部分 ([52-400], [86-213], [250-300]) を抗原とする抗体では、封入体の染色性の方が核の染色性より高かった。アミノ末端側 ([1-50]) に対する抗体は症例により異なる染色結果を示した。

D. 考察

ALS, ALS-D, FTLD-U に異常蓄積する TDP-43 が C 末端側の複数部位においてリン酸化されていること、主要な蓄積分子種は全長 TDP-43 ではなく、長さが異なる複数の C 末フラグメントであり、そのフラグメント・パターンは異常蓄積の形態学的特徴

と対応していた。これらの特徴はタウとよく類似している。タウの場合も、同じ4リピートタウ蓄積疾患であるPSPとCBDは、異常蓄積の形態の違いに対応して、不溶性タウのC末フラグメント・パターンが異なる。このような事実は、TDP-43異常蓄積の過程で蛋白分解～C末フラグメント形成が重要な役割を果たしていることを示唆している。現時点ではまだ、異常リン酸化とC末フラグメント形成のどちらが異常蓄積形成過程で先行する病態であるかはわからない。全例で異常リン酸化された全長TDP-43が検出されるが、たとえば、まずC末フラグメントの蓄積が生じ、それに全長TDP-43が巻き込まれる形で蓄積する可能性も考える必要がある。

またADやDLB, AGDなど、tauopathy, α synucleinopathyの一部の症例において、従来考えられていた以上の頻度でTDP-43異常蓄積が認められたことは、すでにタウと α シヌクレインとの間で示唆されていたように、これらの蛋白質異常蓄積が相互に無関係な独立した病態ではなく何らかの関連があることを示している。これらの異常蓄積には共通の病理プロセスと、それぞれの蛋白質に固有の因子、標的となる細胞の脆弱性などが関わっていると考えるべきである。TDP-43異常蓄積のスクリーニングは神経変性疾患を有する全剖検例について実施する必要があると考えられる。

診断に関しては、家族性ALSについては、従来、行われてきたSOD-1のみでなく、TDP-43, FUSの変異解析が発病予測（保因者の同定）や診断確定に有用であることが明らかになった。一方、TDP-43異常蓄積のバイオマーカー開発には、今後さらなる研究の積み重ねが必要であると思われる。CSF中のTDP-43測定は、今後さらに高感度化を図り、かつそれに伴う非特異反応増加を低減するような方法論的な改善を行う予定である。

本邦のFTLD-FUSに関して、特定の研究室に集積された標本から人口全体の発症率を推測することはできないが、FTLDの病型分類が整備されたのが最近であることを勘案すると、FTLDの中での亜型の割合は、実態に近いと考えられる。したがって、

本邦ではFTLD-FUSがFTLD全体に占める割合は欧米とほぼ同様、FTLD全体の10～20%を占めると思われる。異常より、タウ, TDP-43, FUSの免疫染色はFTLD～ALS圏の剖検脳脊髄資源構築にあたっては必ずスクリーニングを行う必要があると考えられた。なおFTLD-FUSの亜型分類では、本邦ではaFTLD-Uの頻度が欧米より低かい点を考慮すべきである。

またFTLD-FUSの異常蓄積～封入体形成過程においてFUS分子のコンフォメーションが変化している可能性が示された。FTLD-FUSについては今後、凍結脳脊髄資源を整備してFUSの生化学的解析を行う必要がある。なお、上述した異常蓄積FUSのスクリーニングにおいては、FUS分子の中間部分を認識する抗体（たとえば抗FUS [86-213]抗体）の使用が推奨される。抗FUS [52-400]抗体については、TDP-43異常蓄積の一部を（すべてではない）認識することから、スクリーニングでの使用に用いることが可能かどうかは、今後さらなる検討を要する。

E. 結論

本研究で明らかになった蛋白質異常蓄のオーバーラップを考慮すると、ALS, ALS-D, FTLDの根本解決をめざすための脳脊髄資源構築を行うには、臨床像からこれらの疾患が示唆される症例に加え、すべての変性疾患例、老化性変化を有する症例において、網羅的にタウ, α シヌクレイン, TDP-43, FUSの異常蓄積の検索を免疫組織化学的に実施する必要があると考えられる（それぞれの蛋白質の異常蓄積に特異的な抗体を使用した免疫組織化学を行う）。また今回の遺伝子検索において孤発例にも稀に変異が認められたことから、可能な限り全例にSOD-1, GRN, TDP-43, FUS, MAPT等、該当する遺伝子の変異検索を行うのが好ましいと思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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* 117:125-136, 2009
2. Fujishiro H, Uchikado H, Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Yokota O, Tsuchiya K, Togo T, Iseki E, Hirayasu Y. Accumulation of phosphorylated TDP-43 in brains of patients with argyrophilic grain disease. *Acta Neuropathol* 117: 151-158, 2009
 3. Nonaka T, Arai T, Buratti E, Baralle FE, Akiyama H, Hasegawa M. Phosphorylated and ubiquitinated TDP-43 pathological inclusions in ALS and FTLN-U are recapitulated in SH-SY5Y cells. *FEBS Lett* 583:394-400, 2009
 4. Mackenzie IRA, Neumann M, Bigio EH, Cairns NJ, Alafuzoff I, Kril J, Kovacs GG, Ghetti B, Halliday G, Holm IE, Ince PG, Kamphorst W, Revesz T, Rozemuller AJM, Kumar-Singh S, Akiyama H, Baborie A, Spina S, Dickson DW, Trojanowski JQ, Mann DMA. Nomenclature for neuropathological subtypes of frontotemporal lobar degeneration. *Acta Neuropathol* 115:15-18, 2009
 5. Yokota O, Tsuchiya K, Terada S, Ishizu H, Uchikado H, Ikeda M, Oyanagi K, Nakano I, Murayama S, Kuroda S, Akiyama H. Basophilic inclusion body disease and neuronal intermediate filament inclusion disease: a comparative clinicopathological study. *Acta Neuropathol* 115:561-575, 2008
 6. Inukai Y, Nonaka T, Arai T, Yoshida M, Hashizume Y, Beach TG, Buratti E, Baralle FE, Akiyama H, Hisanaga SI, Hasegawa M. Abnormal phosphorylation of Ser409/410 of TDP-43 in FTLN-U and ALS. *FEBS Lett* 582:2899-2904, 2008
 7. Hasegawa M, Arai T, Nonaka T, Kametani F, Yoshida M, Hashizume Y, Beach TG, Buratti E, Baralle F, Morita M, Nakano I, Oda T, Tsuchiya K, Akiyama H. Phosphorylated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 64:60-70, 2008
 8. Kobayashi Z, Tsuchiya K, Arai T, Yokota O, Watabiki S, Ishizu H, Akiyama H, Mizusawa H (2010) Pseudopolyneuritic form of ALS revisited: Clinical and pathological heterogeneity. *Neuropathology*. doi:10.1111/j.1440-1789.2009.01084.x
 9. Foulds PG, Davidson Y, Mishra M, Hobson DJ, Humphreys KM, Taylor M, Johnson N, Weintraub S, Akiyama H, Arai T, Hasegawa M, Bigio EH, Benson FE, Allsop D, Mann DM (2009) Plasma phosphorylated-TDP-43 protein levels correlate with brain pathology in frontotemporal lobar degeneration. *Acta Neuropathol* 118:647-58
 10. Yanagida K, Okochi M, Tagami S, Nakayama T, Kodama TS, Nishitomi K, Jiang J, Mori K, Tatsumi S, Arai T, Ikeuchi T, Kasuga K, Tokuda T, Kondo M, Ikeda M, Deguchi K, Kazui H, Tanaka T, Morihara T, Hashimoto R, Kudo T, Steiner H, Haas C, Tsuchiya K, Akiyama H, Kuwano R, Takeda M (2009) The 28-amino acid form of an APLP1-derived Abeta-like peptide is a surrogate marker for Abeta42 production in the central nervous system. *EMBO Mol Med* 1:223-235
 11. Nonaka T, Kametani F, Arai T, Akiyama H, Hasegawa M (2009) Truncation and pathogenic mutations facilitate the formation of intracellular aggregates of TDP-43. *Human Mol Genet* 18:3353-3364
 12. Yamashita M, Nonaka T, Kametani F, Arai T, Akiyama H, Buchman VL, Zibac S, Goedert M, Hasegawa M (2009) Methylene blue and dimebon inhibit aggregation of TDP-43 in cellular models. *FEBS Letters* 583:2419-2424
 13. Davidson Y, Amin H, Kelley T, Shi J, Tian J, Kumaran R, Lashley T, Lees AJ, Duplessis D, Neary D, Snowden J, Akiyama H, Arai T, Hasegawa M, Bandopadhyay R, Sikkink S, Pickering-Brown S, Mann DM (2009) TDP-43 in ubiquitinated inclusions in the inferior olives in frontotemporal lobar degeneration and in other neurodegenerative diseases: a degenerative process distinct from normal ageing. *Acta Neuropathol* 118:359-369.
 14. Schwab C, Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Yu S, McGeer PL (2009) TDP-43 pathology in familial British dementia. *Acta Neuropathol* 118:303-311.
 15. Honda M, Arai T, Fukazawa M, Honda Y, Tsuchiya K, Salehi A, Akiyama H, Mignot E (2009) No ubiquitinated inclusions in hypocretin neurons of narcolepsy patients. *Neurol* 73:511-517
 16. Beach TG, Adler CH, Lue LF, Sue LI, Bachalakuri J, Henry-Watson J, Sasse J, Boyer S, Shirohi S, Brooks R, Eschbacher J, White CL III, Akiyama H, Caviness J, Shill HA, Connor DJ, Sabbagh MN, Walker DG and the Arizona Parkinson's Disease Consortium (2009) Unified Staging System for Lewy Body Disorders: Correlation with Nigrostriatal Degeneration, Cognitive Impairment and Motor Dysfunction. *Acta Neuropathol* 117:613-634
 17. Kametani F, Nonaka T, Suzuki T, Arai T, Dohmae N, Akiyama H, Hasegawa M (2009) Identification of casein kinase-1 phosphorylation sites on TDP-43. *Biochem Biophys Res Commun* 382:405-9
 18. Yokota O, Tsuchiya K, Arai T, Yagishita S, Matsubara O, Mochizuki A, Tamaoka A,

- Kawamura M, Yoshida H, Terada S, Ishizu H, Kuroda S, Akiyama H (2009) Clinicopathological characterization of Pick's disease versus frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin/TDP-43-positive inclusions. *Acta Neuropathol.* 117:429-444
19. Beach TG, White CL, Hladik CL, Sabbagh MN, Connor DJ, Shill HA, Sue LI, Sasse J, Bachalakuri J, Henry-Watson J, Akiyama H, Adler CH (2009) Olfactory bulb α -synucleinopathy has high specificity and sensitivity for Lewy body disorders. *Acta Neuropathol* 117:169-174
 20. Kobayashi Z, Tsuchiya K, Takahashi M, Yokota O, Taki K, Ishizu H, Arai T, Akiyama H, Mizusawa H (2010) Morel's laminar sclerosis showing apraxia of speech: Distribution of cortical lesions in an autopsy case. *Neuropathology* 30:76-83
 21. Oshima K, Tsuchiya K, Niizato K, Akiyama H, Arai T, Nagashima K (2009) Clinicopathological study of early progressive multifocal leukoencephalopathy incidentally found in a schizophrenia patient. *Neuropathology* 29:684-688
 22. Kobayashi Z, Tsuchiya K, Machida A, Goto J, Yokota O, Miake H, Watabiki S, Taki K, Ishizu H, Haga C, Arai T, Akiyama H, Mizusawa H (2009) Metastatic CNS lymphoma presenting with periventricular dissemination - MRI and neuropathological findings in an autopsy case. *J Neurol Sci* 277:109-113
 23. Kobayashi Z; Tsuchiya K; Uchihara T; Nakamura A, Haga C; Yokota O; Ishizu H; Taki K; Arai T; Akiyama H; Mizusawa H (2009) Intractable hiccup caused by medulla oblongata lesions: a study of an autopsy patient with possible neuromyelitis optica. *J Neurol Sci* 285:241-245
 24. Kobayashi Z, Tsuchiya K, Yokota O, Haga C, Arai T, Akiyama H, Kotera M, Mizusawa H (2009) Japanese encephalitis - serial CT findings and neuropathology in an autopsy case. *Clin Neuropathol* 28:422-429.
 25. Tetsuaki Arai, Masato Hasegawa, Takashi Nonoka, Fuyuki Kametani, Makiko Yamashita, Masato Hosokawa, Kazuhiro Niizato, Kuniaki Tsuchiya, Zen Kobayashi, Kenji Ikeda, Mari Yoshida, Mitsumoto Onaya, Hiroshige Fujishiro and Haruhiko Akiyama (2010) Phosphorylated and cleaved TDP-43 in ALS, FTLD and other neurodegenerative disorders and in cellular models of TDP-43 proteinopathy. *Neuropathol* doi:10.1111/j.1440-1789.2009.01089.x
 26. Mackenzie IR, Neumann M, Bigio EH, Cairns NJ, Alafuzoff I, Kril J, Kovacs GG, Ghetti B, Halliday G, Holm IE, Ince PG, Kamphorst W, Revesz T, Rozemuller AJ, Kumar-Singh S, Akiyama H, Baborie A, Spina S, Dickson DW, Trojanowski JQ, Mann DM (2010) Nomenclature and nosology for neuropathologic subtypes of frontotemporal lobar degeneration: an update. *Acta Neuropathol* 119:1-4
 27. Asaoka T, Tsuchiya K, Fujishiro H, Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Iseki E, Oda T, Onaya M, Tominaga I, Argyrophilic grain disease with delusions and hallucinations: a pathological study., *Psychogeriatrics*, 10, 69-76, 2010
 28. Beach TG, Adler CH, Sue LI, Vedders L, Lue L, White Iii CL, Akiyama H, Caviness JN, Shill HA, Sabbagh MN, Walker DG; Arizona Parkinson's Disease Consortium, Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders, *Acta Neuropathol*, 119, 689-702, 2010
 29. Habuchi C, Iritani S, Sekiguchi H, Torii Y, Ishihara R, Arai T, Hasegawa M, Tsuchiya K, Akiyama H, Shibayama H, Ozaki N, Clinicopathological study of diffuse neurofibrillary tangles with calcification With special reference to TDP-43 proteinopathy and alpha-synucleinopathy, *J Neurol Sci*, 301, 77-85, 2010
 30. Kobayashi Z, Tsuchiya K, Arai T, Aoki M, Hasegawa M, Ishizu H, Akiyama H, Mizusawa H, Occurrence of basophilic inclusions and FUS-immunoreactive neuronal and glial inclusions in a case of familial amyotrophic lateral sclerosis, *J Neurol Sci*, 293, 6-11, 2010
 31. Kobayashi Z, Tsuchiya K, Arai T, Yokota O, Yoshida M, Shimomura Y, Kondo H, Haga C, Asaoka T, Onaya M, Ishizu H, Akiyama H, Mizusawa H, Clinicopathological characteristics of FTLD-TDP showing corticospinal tract degeneration but lacking lower motor neuron loss, *J Neurol Sci*, 298, 70-77, 2010
 32. Kobayashi Z, Tsuchiya K, Kubodera T, Shibata N, Arai T, Miura H, Ishikawa C, Kondo H, Ishizu H, Akiyama H, Mizusawa H, FALS with Gly72Ser mutation in SOD1 gene: Report of a family including the first autopsy case, *J Neurol Sci*, 300, 9-13, 2010
 33. Kuwahara H, Tsuchiya K, Saito Y, Kobayashi Z, Miyazaki H, Izumiya Y, Akiyama H, Arai T, Mizusawa H, Frontotemporal lobar degeneration with motor neuron disease showing severe and circumscribed atrophy of anterior temporal lobes, *J Neurol Sci*, 297, 92-96, 2010

34. Nozaki I, Arai M, Takahashi K, Hamaguchi T, Yoshikawa H, Muroishi T, Noguchi-Shinohara M, Ito H, Itokawa M, Akiyama H, Kawata A, Yamada M, Familial ALS with G298S mutation in TARDBP: a comparison of CSF tau protein levels with those in sporadic ALS, Intern Med, 49, 1209-1212, 2010
35. Tamaoka A, Arai M, Itokawa M, Arai T, Hasegawa M, Tsuchiya K, Takuma H, Tsuji H, Ishii A, Watanabe M, Takahashi Y, Goto J, Tsuji S, Akiyama H, TDP-43 M337V mutation in familial amyotrophic lateral sclerosis in Japan, Intern Med, 49, 331-334, 2010
36. Yokota O, Davidson Y, Bigio EH, Ishizu H, Terada S, Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Sikkink S, Pickering-Brown S, Mann DM, Phosphorylated TDP-43 pathology and hippocampal sclerosis in progressive supranuclear palsy, Acta Neuropathol, 120, 55-66, 2010
37. Yokota O, Davidson Y, Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Ishizu H, Terada S, Sikkink S, Pickering-Brown S, Mann DM, Effect of topographical distribution of α -synuclein pathology on TDP-43 accumulation in Lewy body disease, Acta Neuropathol, 120, 789-801, 2010

2.学会発表

1. Akiyama H, Arai T, Hasegawa M, Nonaka T, Kametani F, Tsuchiya K, Yoshida M, Hashizume Y, Onaya M, Oda T, Beach TG, Buratti E, Baralle F. Production of antibodies to abnormally phosphorylated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and

- amyotrophic lateral sclerosis. FTD2008, Rotterdam, The Netherlands [2008/09/03]
2. Nonaka T, Kametani F, Arai T, Akiyama H, Hasegawa M (2009) Truncation and pathogenic mutations facilitate the formation of intracellular aggregates of TDP-43. The 12th International Conference on Alzheimer's Disease 2009, Vienna, Austria [2009/07/12]
3. Arai T, Mackenzie IRA, Hasegawa M, Fujishiro H, Nonaka T, Niizato K, Tsuchiya K, Kobayashi Z, Iritani S, Onaya M, Akiyama H (2009) Phosphorylated TDP-43 in neurodegenerative disorders. The 12th International Conference on Alzheimer's Disease 2009, Vienna, Austria [2009/07/15]
4. Akiyama H, Kobayashi Z, Arai T, Hosokawa M, Tsuchiya K, Yokota O, Shimomura Y, Kondo H, Haga C, Hasegawa M (2010) Screening for FUS proteinopathy in the institutional brain collection. The 7th International Conference on Frontotemporal Dementias, Indianapolis, USA [2010/10/06]

G.知的所有権の取得状況

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

ALS 脊髄資源の現状と資源構築に関する問題点の検討

清水 潤、高橋祐二、辻 省次
 東京大学大学院医学系研究科神経内科

研究要旨

ALS 症例の死後脳脊髄資源の現状と問題点を明らかにする目的で、当科における資源の採取状況を確認し、資源確保における問題点をあきらかにした。ALS 剖検数は過去 13 年で 10 例であり、内訳は ALS 9 例、ALSD 1 例、FTLD 0 例であった。ALS 入院症例のフォロー状況の解析からは、剖検が得にくい社会状況への変化、ALS 入院症例数の増加に比して経過観察中の脱落例が多い状況が明らかになった。資源の充実のためには、剖検数の確保するためのシステム構築と多施設参加のバンク構築が必要である。

A. 研究目的

当施設における筋萎縮性側索硬化症 ALS 症例の死後脳脊髄資源の現状と資源蓄積のための問題点を明らかにする。

B. 研究方法

1) 資源症例に関しては、剖検台帳を用いて確認。2) 資源確保の問題点の把握のためには、2010 年度に当科入院症例の ALS 臨床例フォロー状況を解析した。

(倫理面への配慮)

検体採取に関しては、文書にて患者家族の同意を得た。(東京大学医学部倫理申請許可)

C. 研究結果

(1) 当科における ALS 症例の剖検数

過去 10 年間の病院全体の剖検数は徐々に低下傾向にあったが、当科の剖検数は 3~7 例/年間で変動していた。ALS 症例の剖検数は過去 13 年で 10 例であり、内訳は ALS 9 例、ALSD 1 例、FTLD 0 例であった。一方、ALS の入院数自体は増加傾向であった。(Fig.1)

Fig.1 当科における ALS 症例の剖検数

| | 病院病理 剖検数 | 剖検数 | ALS 剖検 | ALS 入院 数 |
|-------|-------------|-----|-----------|----------------|
| 2010年 | 68 | 3 | 0 | 39 |
| 2009年 | 87 | 3 | 2 | 24 |
| 2008年 | 100 | 5 | 0 | 34 |
| 2007年 | 78 | 3 | 0 | 33 |
| 2006年 | 84 | 4 | 1 | 33 |
| 2005年 | 114 | 2 | 0 | 32 |
| 2004年 | 109 | 7 | 1 | 22 |
| 2003年 | 115 | 4 | 2 | 14 |
| 2002年 | 108 | 7 | 0 | 11 |
| 2001年 | 113 | 5 | 0 | 11 |
| 2000年 | 107 | 5 | 1 | 8 |
| 1999年 | | | 2 | 10 |
| 1998年 | | | 1 | 11 |

(2) ALS の剖検が得られない状況解析

入院数の増加が ALS の剖検症例の増加につながる理由に関して、2010 年の入院状況を解析した。2010 年の ALS 入院数は 39 名であり、入院目的は評価(診断確定) 24 名、胃瘻交換(造設) 12 名、合併症治療 3 名であった。入院症例の過去の入院回数は、初回 2 名、2 回め 8 名、3~5 回め 4 名、6 回~10 回 2 名、11 回以上 3 名であった。39 名のうち、転医 18 名、フォロー中 20 名、死亡 1 名であった。1 名の死亡例は剖検が得られなかった。転医例の大部分(15/18)はフォロー開

始 18 ヶ月以内であり、現在フォロー中の症例の半数(11 例)がフォロー開始 18 ヶ月以内であり、フォローから脱落する可能性が推測された。個々の事例解析からは、脱落の理由としては、ADL の悪化に伴い通院できず近医へ転医、状態悪化後療養長期になるため転院、などがめだった。

(3) 当科における ALS 症例の凍結資源

当科では、剖検時に脳(半脳)、脊髄(頸髄、胸髄、腰髄)、後根神経節、交感神経節、末梢神経(大腿神経、腓腹神経、横隔神経)、骨格筋(短腓骨筋、大腿直筋、上腕二頭筋)を採取し、ホルマリン固定パラフィン包埋ブロック、グルタルアルデヒド固定エポキシ包埋ブロック、凍結ブロックにて保存をしていた。凍結ブロックは将来の資源活用として欠かすことができない。疾患コントロール症例とあわせて、ALS 症例の凍結資源を確認した。(Fig.2) 資源は、ティッシュテックを用いてコルクの上で凍結しており脊髄の厚さは 1 cm 以内であった。採取部位は、おおよその部位で採取されており、正確な髄節同定後に採取されたものは少なかった。

Fig. 2 当科におけるバンク症例の凍結資源

| | 全体 | ALS | PD | MSA | KAS | Cont. |
|--------------|----|-----|----|-----|-----|-------|
| 症例数 | 28 | 9 | 6 | 3 | 1 | 11 |
| ブロック数 | | | | | | |
| 頸髄 | 8 | 7 | 0 | 1 | 1 | 4 |
| 胸髄 | 6 | 6 | 0 | 0 | 1 | 3 |
| 腰髄 | 7 | 7 | 1 | 2 | 1 | 2 |
| レベル不明 | 2 | | 1 | 0 | | 1 |
| DRG頸髄 | 4 | 2 | 0 | 0 | | 1 |
| レベル不明 | 16 | 2 | 4 | 2 | 1 | 6 |
| DRG腰髄 | 9 | 3 | 1 | 2 | | 4 |
| 交感神経 | 11 | 4 | 1 | 3 | 1 | 4 |
| 腓腹神経 | 26 | 7 | 5 | 3 | 1 | 11 |
| 大腿神経 | 17 | 7 | 1 | 1 | 1 | 7 |
| 横隔神経 | 8 | 5 | 1 | 1 | 1 | 1 |

PD=パーキンソン病、MSA=多系統萎縮症、KAS=球脊髄性筋萎縮症、Cont.=中枢神経、末梢神経に異常を認めない症例(ミオパチーなど)

D. 考察

大学病院の性質上、多数の ALS 症例の評価(診断)入院がありながら、剖検症例数の確保が困難になってきている現状が明らかになった。剖検が得られない背景には、1) 剖検自体が好まれなくなってきた社会的状況、2) ADL が悪化して通院しきれなくなった症例の脱落(在宅療養のサポート体制の充実に伴い近医、往診医への転医する例の増加)、3) 重症化例の転院例の増加(大学病院での入院期間短縮に伴い、急変後に多少でも全身状態が安定すると転院となるケースが増加)などに大きく事例分類された。解決策として症例の登録システムの充実、転院先の病院との連携などをとおし、剖検例をふやす体制づくりが必要であることがあきらかになった。

凍結脊髄の採取に関しては、採取方法、採取部位、保存方法など、利用する立場に立った方法での採取と保存が必要と考えられた。各研究施設との連携により統一的な企画での資源蓄積が必要である。症例数は少ないことから多施設参加のバンク構築の必要性があきらかになった。

E. 結論

ALS/ ALS/D/ FTL/DU 資源確保が困難となってきた実態があきらかになった。

ALS の剖検は希少であり、資源の充実のためには、剖検数の確保するためのシステムの構築と、多施設参加のバンク構築が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

研究発表

1) 国内

そのうち主なもの

論文発表

1. 清水 潤 悪性腫瘍関連筋炎 Brain and Nerve 62(4):427-432;2010
2. 清水 潤 膠原病・類縁疾患に伴う神経・筋障害の診断と治療 多発筋炎・皮膚筋炎 日本内科学会雑誌 99(8):45-52;2010
3. 久保田暁、清水 潤 Sporadic Inclusion body myositis. Annual Review 神経 2010 鈴木則宏ら中外医学社東京 2010 208-215
4. 橋本 明子、清水 潤自己抗体を伴う炎症性筋疾患の筋病理神経内科 71: 385-391; 2009
5. 清水 潤 多発筋炎・皮膚筋炎 Clinical Neuroscience Vol28:194-198 2010

学会発表

1. 清水 潤 サルコイドミオパチーの筋病理所見～炎症性筋疾患の中での位置づけ～第172回日本サルコイドーシス／肉芽腫性疾患学会関東地方会,東京,2010
2. 清水 潤 抗SRP抗体陽性ミオパチーについて 第2回筋炎ワークショップ,東京,2010
3. 清水 潤 末梢神経障害の臨床と病理 第38回倉敷脳疾患研究会, 倉敷 2010
4. 清水 潤 筋炎の病理所見について 第4回膠原病臨床病理研究会,東京,2009

2)海外

そのうち主なもの

論文発表

1. Takada K, Shimizu J, Kusunoki S. Apoptosis of primary sensory neurons in GD1b-induced sensory ataxic neuropathy. Exp Neurol. 209:279-83,2008

2. Ishiura H, Matsuda S, Higashihara M, Hasegawa M, Hida A, Hanajima R, Yamamoto T, Shimizu J, Dalmau J, Tsuji S. Response of anti-NMDA receptor encephalitis without tumor to immunotherapy including rituximab. Neurology. 2008 Dec 2;71(23):1921-3.
3. Shimizu J, Hatanaka Y, Hasegawa M, Iwata A, Sugimoto I, Date H, Goto J, Shimizu T, Takatsu M, Sakurai Y, Nakase H, Uesaka Y, Hashida H, Hashimoto K, Komiya T, Tsuji S. IFN β -1b may severely exacerbate Japanese optic-spinal MS in neuromyelitisoptica spectrum. Neurology. 2010 Sep 8;75:1423-142

学会発表

1. Immunohistochemical and electron microscopy study of myositis with rheumatoid arthritis. Shimizu J, Hashimoto M, Kadoya M, Koide Y, Kubota A, Tsuji S XII ICNMD, 2010, Naples, Italy.
2. Clinical and pathological features of myopathy associated with antimitochondrial antibodies Hashimoto M, Kowa H, Iwata A, Kadoya M, Tsuji S, Shimizu J, XII ICNMD, 2010, Naples, Italy.