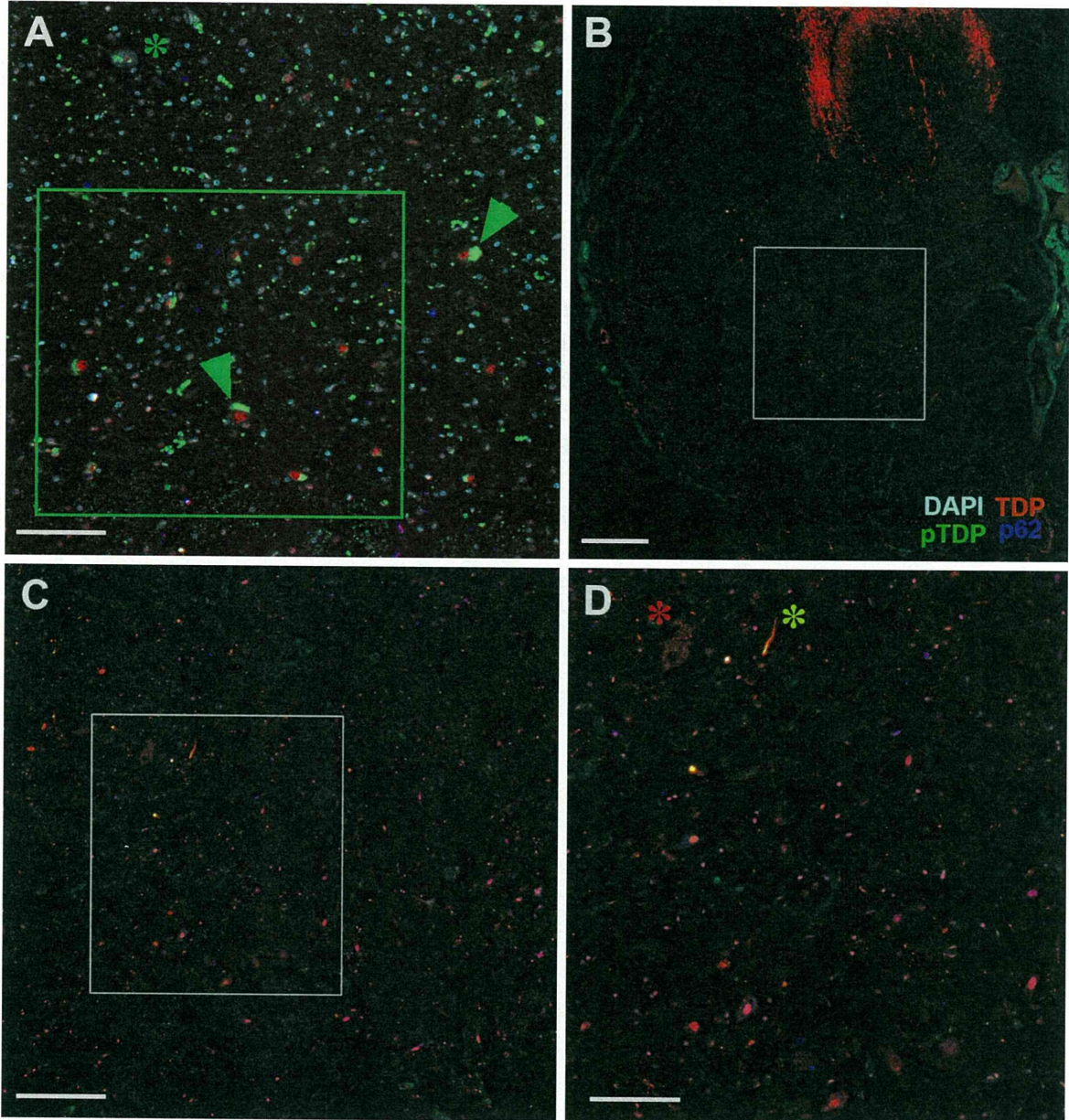


この分担研究はヒト剖検脳を用いており、研究者が所属する施設の運営委員会の承認のもとに計画され、遂行されている。

①TDP 陽性病変の蛍光四重染色法の確立：四重染色の各チャンネルのシグナルは良好に分離されていた。(図)TDP43 は正常細胞の核



ALS仙髄前角の蛍光四重染色(シアン:DAPI; 緑:リン酸化TDP; 赤:TDP; 青:p62). A:リポフスチンの自家蛍光が強く、細胞質のシグナルがリポフスチン(矢頭)か封入体(asterisk)かの区別は困難。前角外側部の小神経細胞の集団(緑枠)はOnufrowicz核の可能性はあるが、解剖学的な同定は蛍光像のみでは困難。B-D:Sudan Black B処理によりリポフスチンの自家蛍光を減弱させた。Bに示す四角をCに拡大、Cに示す四角をDへ拡大。Aに比してリポフスチンの自家蛍光が乏しく、細胞病理はより明瞭である。前角細胞のうち核のTDPが細胞質へ移行したもの(red asterisk), TDP/リン酸化TDP両者陽性の突起(green asterisk)がみられる。リポフスチンの自家蛍光を減弱させてもOnufrowicz核の同定はなお困難である。Bars A, C: 200 μ m; B: 500 μ m; D:100 μ m)

C. 研究結果

内に存在するが、ALS 腰髄前角細胞の一部では核内の TDP が消失するとともに、細胞質内

封入体へリン酸化して集積し、異常蛋白の代謝に関連する p62 もこの封入体に共局在することを多重染色で示した(図 D、asterisks)。

②自家蛍光の減弱法: 脊髄前角細胞の多量のリポフスチンの自家蛍光(図 A、矢頭)は SBB 処理で大幅に軽減した(図 B-D)。抗体がラベルするシグナルも一部減弱したが、全体に細胞病変をより明瞭にとらえることが可能になった(図 D、asterisks)。

③Onufrowicz 核の神経細胞病変: 仙髄前角の一部にこれらの細胞変化に乏しい小型の細胞群があり、Onufrowicz 核に相当する可能性がある。しかし、蛍光標本のみで Onufrowicz 核の正確な解剖学的同定は困難であった(図)。

D. 考察

蛍光四重染色法を確立し、正常で核に局在する TDP43 が ALS 前角細胞の一部ではリン酸化されて細胞質に移行し、p62 陽性の細胞質封入体を形成することを示したが、Onufrowicz 核の変化をより詳細に観察する為には以下の2つの問題が明らかとなった。

1. 蛍光標本上での Onufrowicz 核の同定

ALS で残存する Onufrowicz 核ではこれらの変化が乏しいことが示唆されるが、蛍光標本上のみでの Onufrowicz 核の同定はこれまでのところ困難である。ALS 前角について Onufrowicz 核での細胞変化が他の前角細胞と異なるかどうかを定量的に検討するためには、同核の同定が必須で、蛍光撮像した同一標本を Onufrowicz 核の同定がより容易な Kluver-Barrera 法等で再染色して同定した Onufrowicz 核の染色プロフィールをデジタル画像上で確認することを今後予定している。現在のデジタル画像は 0.2micron /pixel と理論的光学解像度に一応達しているが、このデジタル画像上で病変を同定した上で、同一部位を再度共焦点顕微鏡で観察すればより高解像度かつ必要に応じ三次元画像の取得も可能である。ALS 病変の頻度は標本全体でも数個に留まる程低いのが普通で、少数の特異的病変をとらえることで病態と確定診断が可能となる。我々が用いた fluorescent scanning microscopy は病変が少なくても、切片全体に涉って蛍光像を

繰り返し観察でき、少数の病変の染色プロフィールと頻度の両方を定量的に観察する上で強力なツールとなる。

2. リポフスチンの非特異的蛍光シグナル

脊髄前角は神経系のなかでも特にリポフスチン顆粒の豊富な部位で染色による蛍光シグナルとは異なる自家蛍光が当初の観察の障害となった。リポフスチンの自家蛍光を減弱させる SSB 処理により、病変の蛍光シグナルをリポフスチンと明瞭に区別することに成功したが、病変の蛍光シグナルも僅かに減弱しており、染色-撮像条件の改善の余地がある。

今後上記の問題点を技術的に解決して、正確な Onufrowicz 核を同定し、リポフスチンとは異なる特異的蛍光シグナルを際立たせ、今後定量的な解析へすすむ予定である。随意筋支配の下位運動ニューロンの内、ALS で比較的保たれる眼球運動核についても同様の検討をすすめ、部位による変性過程のコントラストを明らかにしたい。ALS の眼球運動核は通常保たれるが、白質等の障害でも眼球運動障害がおこることを本年度報告した(発表論文 3)。

3. 更なる新技術の応用

本年度開発した 3D-oriented immunoelectron microscopy(発表論文5)は電子密度の高い蛍光 nanocrystal Qdot でラベルした病変を三次元再構成した後、同一部位を電子顕微鏡で観察するという新たな技法で、病変の光学顕微鏡像と電子顕微鏡像を同一部位で比較できる。ALS 病変は数が少なく、その光学像と電顕像を直接比較することは困難であったが、今回我々が開発した方法を用いれば変性の程度の軽い部位に存在する少数の病変の形態学的詳細を電子顕微鏡レベルまで追究できる。さらに光学顕微鏡の解像度を上昇させるシステムも最近出現しており、既に核内小器官を観察するために用いて発表した(発表論文2)。これらを組み合わせて ALS のより詳細な細胞病変をとらえていく。

3. 早期病変の同定をめざして

本年度報告した認知症を伴う ALS の早期例(発表論文1)や、東京医科歯科大学との共同

で本年度確立したサル ALS モデル(発表論文 4)をさらに解析し、ALS の Onufrowicz 核やその他の前角細胞の変化と比較する。変性の時期や程度でどのように異なるかを明らかにしたい。

E. 結論

蛍光四重染色した脊髄全体をデジタル画像化し、正常では核にある TDP が、一部の細胞では細胞質に移行し、リン酸化 TDP となって p62 と共局在することを本年度明らかにした。この変化が変性の程度が軽い Onufrowicz 核で他の前角細胞と異なるかどうかを定量的に検討するために蛍光標本での Onufrowicz 核の正確な同定と、蛍光シグナルとリポフスチン自家蛍光の区別をすすめていく。

F. 健康危険情報

該当情報なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamanami-Irioka A, **Uchihara T**, Endo T, Irioka T, Watanabe M, Kitagawa M, Mizusawa H (2011) Amnesia in frontotemporal dementia with amyotrophic lateral sclerosis, manquarading Alzheimer's disease. Case Reports in Neurology 3:242-247.
2. Shishido-Hara Y, Ichinose S, **Uchihara T** (2012) JC virus intranuclear inclusions associated with PML-NBs: analysis by electron microscopy and structured illumination microscopy. Am J Pathol 180:1095-1106.
3. Takeda T, **Uchihara T**, Mochizuki Y, Ishihara A, Nakamura A, Sasaki S, Uchiyama S, Iwata M, Mizutani T (2012) Supranuclear ophthalmoparesis and vacuolar degeneration of the cerebral white matter in amyotrophic lateral sclerosis: A clinicopathological study. Amyotroph Lateral Scler 13:74-83.
4. Uchida A, Sasaguri H, Kimura N, Tajiri M, Ohkubo T, Ono F, Sakaue F, Kanai K, Hirai T, Sano T, Shibuya K, Kobayashi M, Yamamoto M, Yokota S, Kubodera T, Tomori M, Sakaki K, Enomoto M, Hirai Y, Kumagai J, Yasutomi Y, Mochizuki H, Kuwabara S, **Uchihara T**, Mizusawa H, Yokota T (2012) Non-human primate model of amyotrophic lateral sclerosis with cytoplasmic mislocalization of TDP-43. Brain 135:833-846.
5. Uematsu M, Adachi E, Nakamura A, Tsuchiya K,

Uchihara T (2012) Atomic Identification of Fluorescent Q-Dots on Tau-Positive Fibrils in 3D-Reconstructed Pick Bodies. Am J Pathol 180:1394-1397.

2. 学会発表

武田貴裕、内原俊記、望月葉子、佐々木彰一、内山真一郎、岩田誠、水谷俊雄。大脳白質に海綿状態を有する筋萎縮性側索硬化症 第 52 回日本神経病理学会総会学術研究会 June 2-4, 2012 京都テルサ

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

1. 特許取得

国内特許出願「筋肉運動センサ、意思伝達装置、意思伝達方法」H22.9.14 [出願番号]2010-205888

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

1. 書籍

なし

2. 雑誌

なし

3. その他

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	ページ	発表年月
中山優季, 寛慎治, 内原俊記	筋萎縮性側索硬化症(ALS) 超進行期に対する意思伝達装置(スイッチ)開発	バイオマーカー・イノベーション技術研究組合, 第一回研究フォーラム, 展示発表		2012/3

ALS等の運動ニューロン障害と意思伝達手段

筋萎縮性側索硬化症 (ALS)

病気について



ルー・ゲーリック

脳から脊髓まで信号を伝える上運動ニューロンと、それを受けて脊髓から信号を発し筋肉を収縮させる下運動ニューロンが選択的にかつ進行性に変性し消失していく原因不明の病気です。

主な症状

筋萎縮と筋力低下が特徴的な病気で、初期には手足がやせたり力が入らなくなります。筋萎縮は徐々に全身に広がり、歩行困難になるほか、言語障害、嚥下障害、呼吸障害に及びます。

原因

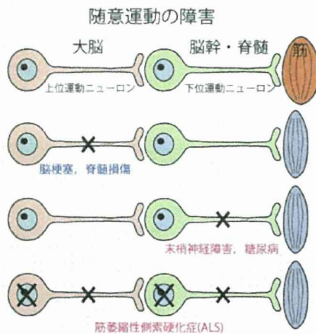
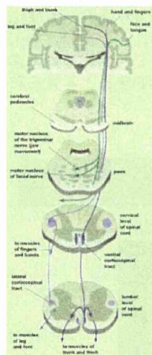
原因はまだ不明で、発病危険因子も有意に相関するものは見だされていません。90~95%は孤発性ですが、5~10%で遺伝性があります。

治療法

根本的な治療法はまだありません。進行を遅らせる薬剤としてリルゾールが認可され使用されています。症状の進行は比較的急速であり、個々の症状に応じて日常生活を援助支持する各種の器具や補助員を用います。筋力低下を少しでも遅らせるためのリハビリテーションが有効です。

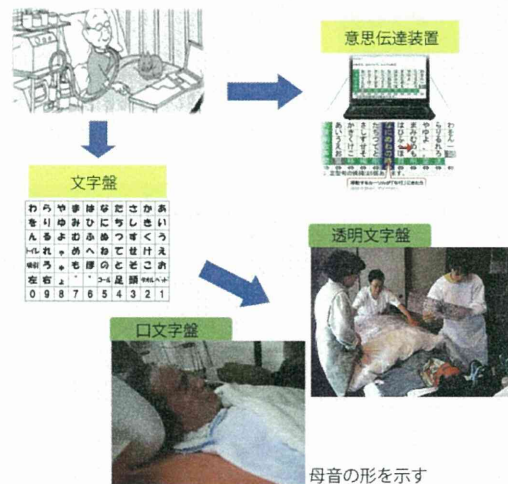
『難病対策ガイドブック』より

運動ニューロンの障害



ALS等の方の意思伝達手段

運動の障害によって、伝えることが難しくなる



医学研ALSプロジェクト

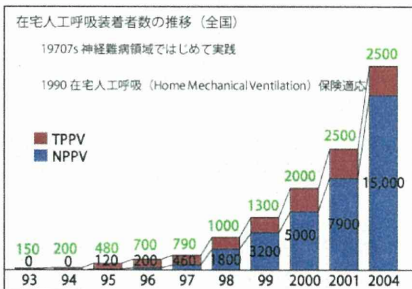
ALS等運動・感覚システム障害の病態解明と看護ケア



ホーキング博士

飛行機で海外へ

小学生に向けて講演



意思伝達支援

さまざまな手段



適合による活用

入力スイッチ



より微細な力で、入力可能

装置の固定 (設置) も重要な支援

残存随意筋の存在が前提

数mmの設置技術が必要

AAC(拡大・代替コミュニケーション)
Augmentation and Alternative Communication

疾患の進行により手段が途絶える可能性がある

全随意筋麻痺 (TLS)

(ALS人工呼吸器装着者 (約1500名) の10~20%)

新たな手段の開発 — 肛門括約筋の利用 —

平成23年度厚生労働科学研究費補助金(障害者対策総合研究事業(身体・知的障害分野))
重度障害者のQOL向上と自立支援に向けた意思伝達装置の開発と臨床評価に関する研究
医学研 中山優季・寛慎治・内原俊記

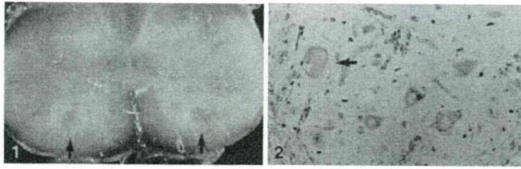


写真1. 第2仙髄横断像: 脊髄前角の腹側にみられる限局性の領域(矢印)が Onufrowicz 核にあたる。写真2. 同部位の運動神経細胞は肛門括約筋を支配するが、ALS では末期まで保たれる点他の運動神経細胞とは異なる (Okamoto et al. Acta Neuropathol 1991;81:610-614 より)。

肛門内の筋力を検出するプローブ開発

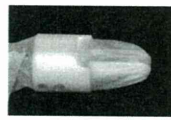
プローブ



断面図

収縮により開閉が変形

側面図



ゴムサックで保護し衛生的に反復使用

国内特許出願 2010-205888

肛門括約筋スイッチの特徴

	括約筋スイッチ	生体信号 (脳波・脳血流など)
コスト	安価	高価
原理	既存技術の利用/応用	複雑, 新規技術の開発
設置	容易	複雑
出力	安定	状況によって変動
情報量	多い (1bit/数秒)	少ない (1bit/数分)
思考中断	なし (考えながら、伝達が可能)	あり (伝達のため思考を中断する必要あり)

簡便・低コストで信頼性の高い手段の提供

市販の意思伝達装置を操作



意思伝達装置
(市販品)

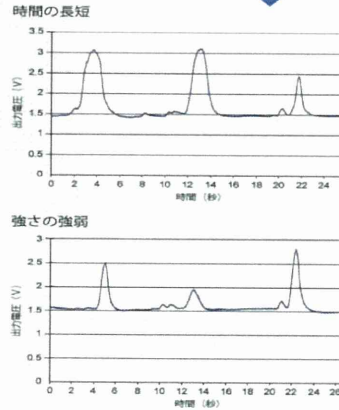
専用アンプ

スイッチ

ALS療養者に対する肛門収縮力の実測例



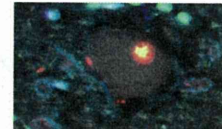
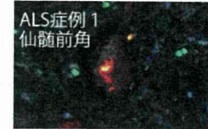
収縮力を電圧に変換して計測



縦軸は肛門括約筋の収縮力に比例したプローブの出力電圧。横軸は時間。力を入れないベースラインから力を入れるとはっきりとした大きな電圧が生じる。収縮時間の長短(上)や強弱(下)もはっきり判別できる。初めてプローブを使用した患者さんであることを考慮すれば、このパターンは訓練により遥かに多様にできることが期待され、より多くの情報を効率よく伝達できると考えられる。

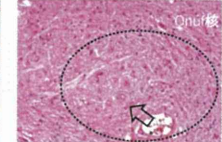
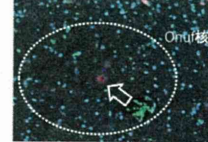
病理学的検討

リン酸化TDP陽性の封入体 (ALS 前角、蛍光四重染色)



DAPI: 核
P62: 病変
TDP-43
リン酸化TDP-43

外肛門括約筋を支配するOnuf核は残存し、病的封入体に乏しい



四重蛍光像を撮像した切片をHE染色しOnuf核を同定、同一細胞(矢印)を観察
改善すべき点 1. lipofuscinの自家蛍光(Sudan blackによる処理)
2. Onuf核の同定

ALS/正常対照における仙髄前角細胞数/Onuf核細胞数および封入体数の比較

	片側前角細胞数	前角運動神経細胞の萎縮の程度	前角封入体数	Onuf核細胞数	Onuf核神経細胞の萎縮の程度
コントロール1	56	N	N	9	N
コントロール2	85	N	N	10	N
軽度1	45	N~±	2	5	N
軽度2	35	N~+	2	4	N~±
重度1	30	N~++	1	7	N~±
重度2	32	N~++	1	5	N~±

平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金
障害者対策総合研究事業（身体・知的等障害分野）

重度進行性障害者の QOL 向上と自立支援に向けた
意思伝達装置の開発と臨床評価に関する研究

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中山 優季（財団法人東京都医学総合研究所）
研究分担者 笥 慎治・内原 俊記（財団法人東京都医学総合研究所）
川田 明広（東京都立神経病院）

平成 24 年 3 月

