

井効果があったためであろう。しかし近年、スモン患者の高齢化に連れてBI点数が低下してきたため、主観的QOLにADL能力が関与する要素が大きくなってきたと考えられる。

今回の、対象者を全国に拡大した平成22年度の調査からは、SDLの合計点はBIと有意な相関を認め、主観的QOLの維持にADL能力は重要である。また、年齢とBIの結果からは加齢とともにADLが低下する傾向があった。しかし、SDLは年齢による違いは少なく相関も乏しく、加齢によりQOLは低下するとは考えにくい。これは、年齢とSDLに相関はないとした過去の九州の患者を対象とした調査と一致する結果であった⁸⁾。スモン患者のQOL維持には年齢によらず、それぞれの障害特性を反映するADLへの介入、特に今回相関が強かった「身の回りの動作」「移動歩行」「家庭内の仕事」へのリハビリテーション的介入が必要である。さらに、満足度を高めるには今回BIと関連のなかった「家族との良好な関係」への介入として、ヘルパー導入やショートステイの活用のような介護福祉サービスの導入や、住環境整備により介護量を減らす工夫が必要であろう。

E. 結論

スモン患者の全国調査により、SDLとBIは有意な相関を認めた。主観的QOLの維持には、年齢によらず基本的ADL向上のためのリハビリテーションの介入はもちろんのこと、家族負担を軽減するような介護福祉サービスの導入や住環境整備が必要であろう。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I. 文献

- 1) Tanaka S, Ogata H, Hachisuka K: Community rehabilitation system: Studies on physical training for disabled in Kitakyusyu. J UOEH 12: 369-372, 1990.
- 2) 蜂須賀研二ほか：日常生活満足度評価表の検討。厚生省特定疾患スモン調査研究班平成9年度研究報告書 134-137, 1998.
- 3) Hachisuka K, Tsutsui Y, Kobayashi M, Iwata N:

Factor structure of satisfaction in daily life of elderly residents in Kitakyushu. J UOEH 21: 179-189, 1999.

- 4) Tsutsui Y, Hachisuka K, Matsuda S: Items regarded as important for satisfaction in daily life by elderly residents in Kitakyushu. J UOEH 23: 245-354, 2001.
- 5) 蜂須賀研二ほか：福岡県に在住するスモン患者の障害特性：日常生活満足度とSF-36。厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）スモンに関する調査研究班，平成18年度総括・分担研究報告書 133-136, 2007.
- 6) Takahashi M, Saeki S, Hachisuka K: Characteristics of disabilities in patients with subacute myeloptico-neuropathy living at home: Satisfaction in daily life and short form-36. DisabilRehabil 31: 1902-1906, 2009.
- 7) 高橋真紀ほか：スモン患者のQOLに関与する要因の検討。厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）スモンに関する調査研究班，平成20年度総括・分担研究報告書 131-133, 2009.
- 8) 蜂須賀研二ほか：スモン患者の日常生活満足度全国調査。厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）スモンに関する調査研究班，平成22年度総括・分担研究報告書，2011.
- 9) 蜂須賀研二ほか：スモン患者の日常生活満足度の推移。厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）スモンに関する調査研究班，平成15年度総括・分担研究報告書 143-146, 2004.
- 10) 高橋真紀ほか：スモン患者の日常生活満足度とSF-8。厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）スモンに関する調査研究班，平成19年度総括・分担研究報告書 98-100, 2008.

Clioquinol の神経細胞に対する影響－4

武藤多津郎（藤田保健衛生大学脳神経内科学）
朝倉 邦彦（藤田保健衛生大学脳神経内科学）
植田 晃広（藤田保健衛生大学脳神経内科学）
木澤真努香（藤田保健衛生大学脳神経内科学）
島 さゆり（藤田保健衛生大学脳神経内科学）
河村 直樹（藤田保健衛生大学脳神経内科学）
宮下 忠行（藤田保健衛生大学脳神経内科学）
伊藤 信二（藤田保健衛生大学脳神経内科学）
福田 有（日本臓器株）

研究要旨

平成 20 年度から 22 年度までの 3 年間で、clioquinol の分子レベルでの神経障害の機序を明らかにする目的で、培養神経系細胞を用いてその細胞に発現する神経成長因子（NGF）高親和性受容体 Trk を介したシグナル伝達について検討した。その結果、clioquinol の濃度依存的に Trk の自己リン酸化の抑制が認められ、その神経毒性は、NGF のシグナル伝達系を抑制することにより発現している可能性が示唆された。さらに clioquinol による神経細胞死はアポトーシスによって起こることが示され、その神経毒性は生理的濃度の亜鉛により増強されることが示された。また、SMON 後遺症症状である異常知覚に対して臨床で用いられているノイロトロピンに着目し、clioquinol の神経毒性に対するノイロトロピンの神経保護作用の有無について培養神経細胞 SH-SY5Y を用いて検討した結果、ノイロトロピンを加えることにより有意な細胞死の抑制が認められた。この細胞死抑制効果は、real time PCR による解析結果から、BDNF の発現を増加することによるものである可能性が示唆された。

本年度は、培養神経細胞を用いて clioquinol の神経毒性に関与する重要な因子を同定する目的で、リン酸化反応に着目して clioquinol 投与によりリン酸化が変化する分子の同定を試みた。その結果、clioquinol によりチロシンリン酸化、セリン・スレオニンリン酸化が変化する分子が複数認められ、ノイロトロピン投与によりその変化が減少することが明らかとなった。

A. 研究目的

clioquinol（キノホルム）の明確な神経障害機序については現在も明らかとなっていない。これまで我々は、NGF のみを発現する培養神経系細胞を用いて clioquinol の神経毒性は、NGF による NGF 受容体（Trk）のチロシン自己リン酸化反応を抑制する事により発現している可能性を明らかにしてきた（*Brain*

Res. 2009)¹⁾。さらにその細胞死はアポトーシスの誘導によって起こることが示され、低濃度の亜鉛によって強く増強されることが示された。また、SMON 後遺症症状に対して現在用いられているノイロトロピン^{2,3,4)}は clioquinol による神経細胞死を抑制する効果があることが示唆され、その機序の一つとして、神経栄養因子の一つである BDNF の発現増加によるもの

である可能性を real time PCR を用いて示した。

今年度は clioquinol の神経細胞に及ぼす影響を、培養神経細胞を用いて clioquinol 投与によるチロシンリン酸化／セリン・スレオニンリン酸化反応の変化により検討した。

B. 研究方法

PC12 細胞に NGF 高親和性受容体 Trk を高発現させた神経細胞株 PCT と神経芽細胞株 SH-SY5Y に、clioquinol (1 μ M) を加えて培養した。PCT 細胞は NGF 存在下では、細胞分裂を停止して神経突起を出して分化することが分かっており、分化した神経細胞への影響を調べる目的で、NGF 存在下で 24 時間培養した細胞も使用した。これらの細胞に、clioquinol (1 μ M) を加えて培養し、培養後 0 分、5 分、10 分、30 分、60 分、180 分に培養細胞より細胞内全蛋白を回収した。また、clioquinol (1 μ M) とノイロトロピン (0.5 ノイロトロピン単位 (NU)/ml) を加えて培養し、同様に培養後 0 分、5 分、10 分、30 分、60 分、180 分に培養細胞より細胞内全蛋白を回収し、抗チロシンリン酸化抗体、抗セリン・スレオニンリン酸化抗体を用いてウエスタンブロットを行い、これらの蛋白のリン酸化状態を経時的に観察した

C. 研究結果

PCT 細胞に clioquinol を 1 μ M の濃度で培養すると、clioquinol 投与後経時的にチロシンリン酸化が減少する分子が分子量 25~60kDa の範囲で 2~3 個認められた。これらの分子は、ノイロトロピン 0.5U/ml の投与によりチロシンリン酸化の減少が認められなくなった。一方セリン・スレオニンリン酸化に関しては、clioquinol 投与でそのリン酸化が変化する分子は存在せず、ノイロトロピン投与後も変化はなかった。PCT 細胞に NGF を 24 時間加えて分化させた細胞でも、約 40kDa の分子のチロシンリン酸化が clioquinol 投与により減少し、ノイロトロピンの共存下では、これら蛋白リン酸化反応の抑制は消失した。セリン・スレオニンリン酸化に関しては、clioquinol 投与でそのリン酸化が変化する分子は存在せず、ノイロトロピン投与後も変化はなかった。

一方、SH-SY5Y では clioquinol 投与後に、100kDa 程度の分子でセリン・スレオニンリン酸化が変化するものが認められ、ノイロトロピン投与によりその変化が減少した。

D. 考察

これまで clioquinol は PCT 細胞で Trk 自己リン酸化を抑制することを報告したが、Trk 以外の蛋白にもそのリン酸化が抑制されるものが存在し、このリン酸化抑制を介して clioquinol が神経細胞へ影響を及ぼしている可能性が示唆された。

E. 結論

培養神経細胞株 PCT および SH-SY5Y に clioquinol を加えた際の、リン酸化反応変化を調べた結果、複数の分子のチロシンリン酸化やセリン・スレオニンリン酸化が変化した。この変化はノイロトロピン投与により減少した。これらの分子を今後同定することにより、clioquinol の神経毒性に関与する重要な分子が特定できる可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Kizawa-Ueda M, Ueda A, Kawamura N, Ishikawa T, Mutoh E, Fukuda Y, Shiroki R, Hoshinaga K, Ito S, Asakura K, Mutoh T: Neurotrophin levels in cerebrospinal fluid of adult patients with meningitis and encephalitis. *Eur. Neurol.* **65**: 138-143, 2011.
- Ito S, Shima S, Ueda A, Kawamura N, Asakura K, Mutoh T. Transient splenial lesion of the corpus callosum in H1N1 influenza virus-associated encephalitis/encephalopathy. *Intern. Med.* **50**: 915-918, 2011.
- 肥厚性硬膜炎の臨床像とステロイド治療法に関する 1 考察：自験 3 症例と文献例 66 例からの検討
植田晃広，上田真努香，三原貴照，伊藤信二，朝倉邦彦，武藤多津郎 *臨床神経* **51**: 243-247, 2011

2. 学会発表

- ・朝倉邦彦, 植田晃広, 木澤真努香, 河村直樹, 島さゆり, 三原貴照, 伊藤信二, 武藤多津郎 アクアポリン4の細胞内局在解析 第52回日本神経学会総会 名古屋, 2011年5月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I. 文献

- 1) Asakura K, Ueda A, Kawamura N, Ueda M, Mihara T, Mutoh T: Clioquinol inhibits NGF-induced Trk autophosphorylation and neurite outgrowth in PC12 cells. *Brain Res.* **1301**: 110-115, 2009.
- 2) 祖父江逸郎, 花籠良一, 松本昭久, 高橋昭, 村上信之, 西谷裕 他: SMON (subacute myelo-optic-neuropathy) 後遺症症状に対するノイロトロピンの臨床評価 多施設二重盲検交差比較試験 医学のあゆみ **143**: 233-252, 1987.
- 3) 祖父江逸郎, 田代邦雄, 花籠良一, 安藤一也, 山田孝子, 飯田光男 他: SMON (Subacute Myelo-optic-neuropathy) 後遺症状の「冷感」および「しびれ感」を中心とする異常知覚に対するノイロトロピン®注射剤の臨床的有用性の検討 ー多施設二重盲検比較試験ー 臨床医薬 **8**: 833-851, 1992.
- 4) Fukuda Y, Berry TL, Nelson M, Hunter CL, Fukuhara K, Imai H et al: Stimulated neuronal expression of brain-derived neurotrophic factor by Neurotrophin. *Mol. Cell. Neurosci.* **45**: 226-233, 2010.

徳島県におけるスモン検診ならびに培養細胞を用いた キノホルムの神経細胞機序の検討

三ツ井貴夫（国立病院機構徳島病院神経内科）
乾 俊夫（国立病院機構徳島病院神経内科）
松家 豊（国立病院機構徳島病院整形外科）
泰地 治男（国立病院機構徳島病院理学療法部）
斎藤 泰憲（東部保健福祉局徳島保健所）
盛 由香（東部保健福祉局徳島保健所）
徳永あいこ（東部保健福祉局徳島保健所）
佐藤 裕美（東部保健福祉局徳島保健所）

研究要旨

徳島県におけるスモン検診の結果を報告するとともに、キノホルムの培養神経細胞に対する細胞毒性機序を検討した。例年通り集団検診、訪問検診そして外来での検診を行った。検診者数は38人、男性11人、女性27人（平均年齢はそれぞれ75歳、79歳）であった。集団検診（27人）、在宅訪問検診（9人）そして徳島病院外来（2人）であった。培養神経細胞株SH-SY5Yにclioquinolを添加し、16時間後にcell viabilityおよび活性酸素種を蛍光プレートリーダーで測定した。clioquinolを添加後、cell viabilityは非添加コントロールに対し 68.3 ± 1.7 (mean \pm SE) %と有意な減少を示した ($p < 0.01$)。また、活性酸素種は非添加コントロールに対し 112.8 ± 3.1 (mean \pm SE) %と有意な増加を示した ($p < 0.01$)。一方、cell viabilityはSOD1 (100-600 U/L)を同時に添加した場合には非添加に比べ、有意に増加した ($p < 0.01$)。本年度の検診を受けられた方は、ほぼ昨年度と同等のADLであり、ADLの悪化は見られなかったことが確認できた。Clioquinolは培養神経細胞SH-SY5Yに対し、急性の細胞毒性を発揮し、これは活性酸素種の過剰再生を介していることが示唆された。

A. 研究目的

徳島県下に在住のスモン患者について身体的、社会的な状況について、平成23年度の検診の結果を調査する。また、キノホルムの培養神経細胞に対する細胞毒性機序を、酸化ストレスの関与の観点から検討した。本研究では細胞中のヒドロキシル、ペルオキシルなどの酸素種活性を細胞レベルで測定する細胞浸透性蛍光プローブ $2'$, 7-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA)を使用し、蛍光プレートリーダーで活性酸素種の定量を行った。

B. 研究方法

検診：スモン現状調査個人票に従って徳島県下に在住のスモン症例について検診調査を行った。検診方法は、集団検診、在宅訪問検診、徳島病院外来での検診、そして入院患者の検診であった。集団検診は例年徳島市内の徳島保健所で行った。会議室に診察机、診察ベッドを3組用意した。身体計測用に電子身長・体重計、血圧計を用意した。検診従事者は医師、保健師、看護師、理学療法士ならびに保健師が参加し、調査個人票に従いスモン症例の身体所見、ADLおよび介護に関する現状調査、福祉相談、介護保険相談および理学療

検診受診者(合計)

	人数	年齢	平均	発症年齢	平均	罹病期間	平均
男	11	67-87	75	24-45	32	41-46	43
女	27	62-100	81	18-58	38	40-47	42
計	38	62-100	79	18-58	36	41-46	43

検診内訳

	男	女	計	平均年齢
集団検診	9	18	27	78
訪問検診	2	7	9	86
病院外来	0	2	2	62
入院	0	0	0	—

図1 平成23年度の検診受診者の内訳

法指導などを行った。

培養細胞を用いた研究：培養神経細胞株 SH-SY5Y に clioquinol (10-100 μ M) を添加し、16 時間後に cell viability、それぞれ CellQuanti-Blue Cell Viability Assay Kit (BioAssay Systems, CA, USA) を用いて、蛍光プレートリーダーで測定した。本研究では細胞中のヒドロキシル、ペルオキシシルなどの活性酸素種 (ROS) を細胞レベルで測定するために、細胞浸透性蛍光プローブ 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) (Invitrogen, CA, USA) を利用した OxiSelect™ Intracellular ROS Assay Kit (Cell Biolabs, Inc., CA, USA) を用いた。DCFH-DA は細胞内に散在され、細胞内エステラーゼにより脱アセチル化し非蛍光型 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein (DCFH) になる。更に ROS により速やかに酸化され、強く蛍光する 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein (DCF) が産生され、その蛍光強度を測定することで、細胞質ゾルの ROS レベルを定量する。また、培養液に SOD1 (100-600 U/L) を同時に添加した場合に、cell viability が変化するかどうかを検討した。

C. 研究結果

平成23年度は検診者数は38人、男性11人、女性27人（平均年齢はそれぞれ75歳、79歳）であった。集団検診（27人）、在宅訪問検診（9人）そして徳島病院外来（2人）であった（図1）。90歳超の高齢者は7人で、最高齢者は100歳女性で在宅療養中で Barthel index はゼロであった（図2）。最若年は62歳女性が2人で若年発症（18歳と19歳）であった。

症例	性	年齢(歳)	初発年齢(歳)	家族構成	歩行	視力
A	女	90	46	3人	不能	ほぼ正常
B	女	92	51	独居	一本杖	手動弁
C	女	100	58	4人	不能	軽度低下
D	女	93	46	独居	独歩	軽度低下
E	女	93	53	2人	独歩	ほぼ正常
F	女	96	52	入所中	一本杖	軽度低下
G	女	91	46	3人	不能	明暗のみ

図2 90歳以上の高齢検診者

Barthel index は100点と95点でADLは自立していた。ほとんどすべての在宅療養症例はかかりつけ医を持っていた。頻度の高い合併症は、白内障、高血圧、四肢関節の疾患であった。明らかに認知症を合併する症例は4人であったが、物忘れは多くの症例で自覚されていた。

2. clioquinol を添加16時間後、cell viability は clioquinol 25-100 μ M の濃度において70%以下に減少が見られた。cell viability の低下が最も少ない clioquinol 25 μ M では、非添加コントロールに対し 68.3 ± 1.7 (mean \pm SE) % と有意な減少を示した（図3）（ $p < 0.01$ ）。また、このとき活性酸素種は非添加コントロールに対し 112.8 ± 3.1 (mean \pm SE) % と有意な増加を示した（図4）（ $p < 0.01$ ）。一方、cell viability は SOD1 (100-600 U/mL) を同時に添加した場合には非添加に比べ、有意に増加した（図5）（ $p < 0.001$ ）。

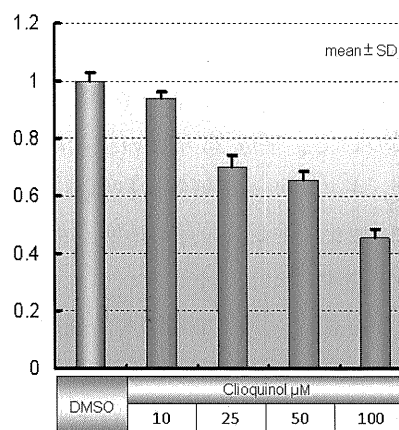


図3 Clioquinol 25-100 μ M を添加16時間後の SH-SY5Y 細胞の cell viability

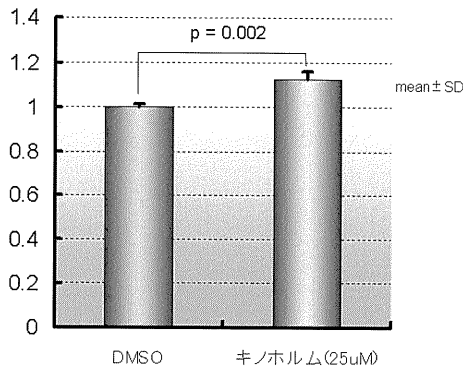


図4 clioquinol 25 μM を添加 16 時間後の SH-SY5Y 細胞の活性酸素種

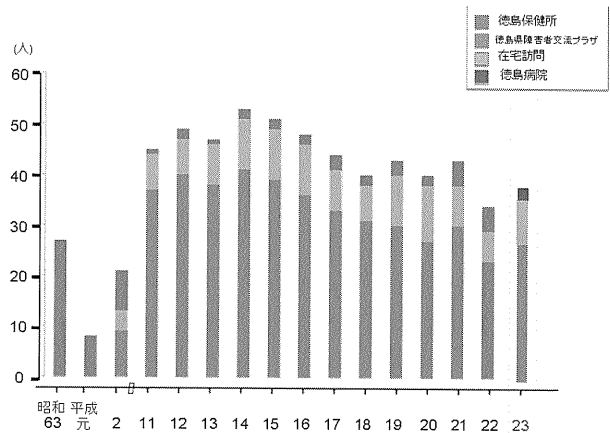


図6 徳島県におけるスモン検診数の年次推移

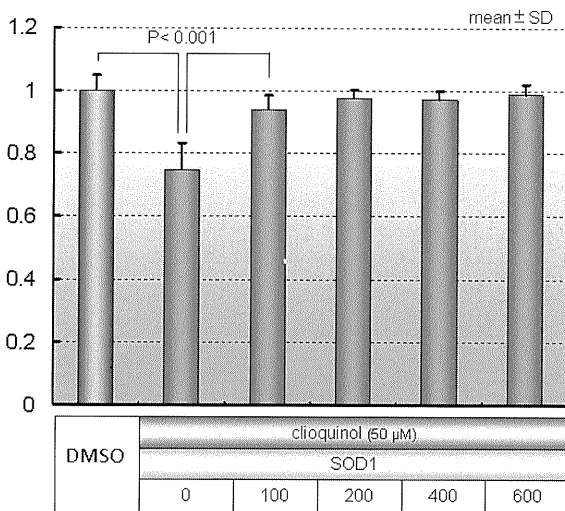


図5 clioquinol 25 μM と SOD1 (100-600 U/mL) を同時に添加し 16 時間後の SH-SY5Y 細胞の cell viability

D. 考察

昭和 45 年 (1970 年) にキノホルム剤の販売が中止されてから 41 年が経過する¹⁾。徳島県下におけるスモン症例の罹病期間は平均 43 年、受診者の平均年齢は 79 歳である。ほとんどの症例はかかりつけ医があり、一人暮らしであっても緊急ベルで近医に連絡がとれるようになっていた。90 歳を超える高齢者は 7 名が今年度は検診を受けた。大部分の方は明らかな認知機能障害はなく、介護保険は利用するものの、お世話をされる親近者が存在していた。図 6 には経年の検診受診者数を示した。平成 2 年から徳島保健所における集団検診が始まった。平成 14 年からは緩徐にはあるが徐々に受信者が減少している。これには、加齢・高齢化の影響が考えられた。

Clioquinol は SMON の原因物質であり、脊髄、末梢神経、および視神経に亜急性障害を起こすことが知られているが、神経細胞障害の分子機序はなお明らかではない。一方、Clioquinol は Cu, Zn および Fe など 2 価の金属イオンのキレート作用を持つ^{2,3)}ことから、膜透過型亜鉛キレート試薬として使用されている。また、脳に β アミロイド蛋白 ($A\beta$) が沈着するアルツハイマー病では、Clioquinol の Cu/Zn キレート作用により $A\beta$ の沈着を抑制し、不溶化した $A\beta$ が可溶化されることから、その治療薬としても注目されている^{4,5)}。

我々は、本研究において Clioquinol の神経細胞障害機序を活性酸素種の観点から解析した。まず培養神経細胞株 SH-SY5Y に clioquinol (10-100 μM) を添加し、16 時間後に cell viability を測定したところ、濃度依存的に細胞数の減少がみられ、急性の神経細胞毒としての作用が確認できた。この成績はスモンに関する調査研究班でこれまでに報告された結果と同様のものであった。Clioquinol 25 μM を添加 16 時間後の活性酸素種は 112.8 ± 3.1 (mean ± SE) % と有意な増加を示した。Clioquinol 25 μM と SOD1 (100-600 U/mL) を同時に添加した場合には cell viability の低下は抑制されたことから、Clioquinol の神経細胞障害は活性酸素種の過剰産生を介している可能性が推定された。ただし、本研究では活性酸素種の増加が比較的軽度であったことから、因果関係に関しては更なる検討が必要と思われた。

E. 結論

1. 平成 23 年度の検診者数は合計 38 人で、平成 22 年度に比べ 4 名増加していた。本年度の検診を受けられた方は、ほぼ昨年度と同等の ADL であり、平成 22 年度に検診を受けられなかった方も ADL の悪化は見られなかったことが確認できた。
2. Clioquinol は培養神経細胞 SH-SY5Y に対し、急性の細胞毒性を発揮し、これは活性酸素種の過剰再生を介していることが示唆された。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I. 文献

- 1) 小長谷正明：スモン—薬害の原点—。医療 63 (4), 227-234, 2009.
- 2) Arbiser JL, Kraeft SK, van Leeuwen R, Hurwitz SJ, Selig M, Dickersin GR, Flint A, Byers HR, Chen LB. Clioquinol-zinc chelate: a candidate causative agent of subacute myelo-optic neuropathy. *Mol Med.* 1998; 4: 665-670.
- 3) Doraiswamy PM, Finefrock AE. Metals in our minds: therapeutic implications for neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol.* 2004; 3: 431-434.
- 4) Cherny RA, Atwood CS, Xilinas ME, Gray DN, Jones WD, McLean CA, Barnham KJ, Volitakis I, Fraser FW, Kim Y, Huang X, Goldstein LE, Moir RD, Lim JT, Beyreuther K, Zheng H, Tanzi RE, Masters CL, Bush AI. Treatment with a copper-zinc chelator markedly and rapidly inhibits beta-amyloid accumulation in Alzheimer's disease transgenic mice. *Neuron.* 2001; 30: 665-676.
- 5) Hegde ML, Bharathi P, Suram A, Venugopal C, Jagannathan R, Poddar P, Srinivas P, Sambamurti K, Rao KJ, Scancar J, Messori L, Zecca L, Zatta P. Challenges associated with metal chelation therapy in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2009; 17: 457-468.

Clioquinol による細胞傷害の検討 (2)

豊島 至 (国立病院機構あきた病院神経内科)

和田 千鶴 (国立病院機構あきた病院神経内科)

研究要旨

Clioquinol は Cu/Zn 選択的キレート作用を持ち、この作用を利用して近年さまざまな治療に用いられようとしており、Zn の作用増強効果が報告されている。今回はこの Zn による細胞傷害増強効果について培養細胞を利用して検討した。Cos7、PC12、SHSY5Y、Neuro2a 細胞を培養して Clioquinol を添加し、亜鉛をを加え観察した。亜鉛は、塩化亜鉛、臭化亜鉛、硫酸亜鉛の 3 つを用いた。その結果、Clioquinol の培養細胞に対する傷害効果は、 $20 \mu\text{M}$ 程度以上で生じることが再度確認された。しかしながら、これまで報告されている亜鉛イオン添加による著明な細胞傷害増強効果は観察されなかった。

A. 研究目的

Clioquinol は 2 員環で Cl と I の 2 個のハロゲンを持つ化合物で、銅と亜鉛に対して選択的キレート作用を持つ。この作用を利用して近年さまざまな治療に用いられようとしている。アルツハイマー病、ハンチントン病、パーキンソン病に対して神経変性過程の改善が期待されている^{1,2,3)}。また一方、細胞傷害作用を利用して抗腫瘍薬として開発がすすめられ、イオノフォアとしての作用にも注目されている^{4,5)}。Clioquinol のキレート作用に対しては亜鉛の添加は作用を阻害することが期待されるが、むしろ増強することが報告された。Clioquinol の中毒量の決定にかかわることから、培養細胞を用いて細胞傷害作用について形態的に検討した。

B. 研究方法

Cos7、PC12、SHSY5Y、Neuro2a 細胞を semiconfluent に培養して Clioquinol (Calbiochem、純度 96.6%) を 5、10、15、 $20 \mu\text{M}$ で添加し、これに亜鉛を 3、10、30、 $100 \mu\text{M}$ を加え、1-4 日観察した。亜鉛は、塩化亜鉛、臭化亜鉛、硫酸亜鉛の 3 つを用いた。細胞培養は今回はプラスチックプレートとした。細胞傷害程度は位相差顕微鏡下で半定量判定を行った。

C. 研究結果

Cos7 細胞は Clioquinol が $20 \mu\text{M}$ で細胞傷害が生じ、これに対する塩化亜鉛、硫酸亜鉛、臭化亜鉛の添加の影響は明らかでなかった。Clioquinol が $15 \mu\text{M}$ では細胞傷害が軽度に生じたが、これに対する亜鉛イオンの添加の影響は明らかでなかった。Clioquinol が $5 \mu\text{M}$ と $10 \mu\text{M}$ では細胞傷害はみられなかったが、これに亜鉛を $100 \mu\text{M}$ まで添加しても新たに細胞障害が生じることはなかった。(図 1、表 1)

PC12、SHSY5Y、Neuro2a 細胞では Clioquinol を 5、 $10 \mu\text{M}$ 、亜鉛を $30 \mu\text{M}$ と $100 \mu\text{M}$ としたが、細胞傷害は明らかではなかった。Clioquinol を $20 \mu\text{M}$ とすると、PC12 で軽度、SHSY5Y、Neuro2a で高度の細胞傷害を生じたが、亜鉛の添加は影響を与えなかった。(図 2、表 1)

D. 考察

昨年、Clioquinol による細胞傷害を検討し、細胞数が対照の半数となる Clioquinol 濃度は、PC12、SHSY5Y、Neuro2a でそれぞれ、12、17、 $30 \mu\text{M}$ であると報告した。今回はこれがほぼ $20 \mu\text{M}$ 程度であることが再度確認された。前回はポリリジンコートガラス底であったが、今回はプラスチックであるのでいくぶ

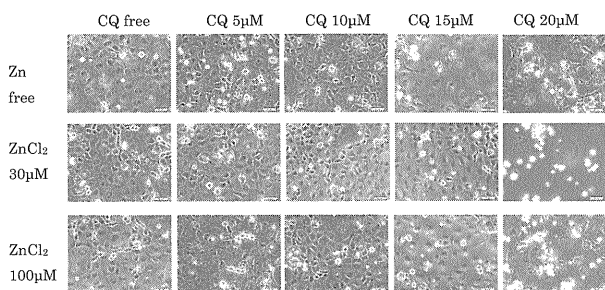


図1 Cos7細胞のClioquinolによる細胞傷害と亜鉛添加効果(位相差顕微鏡像)

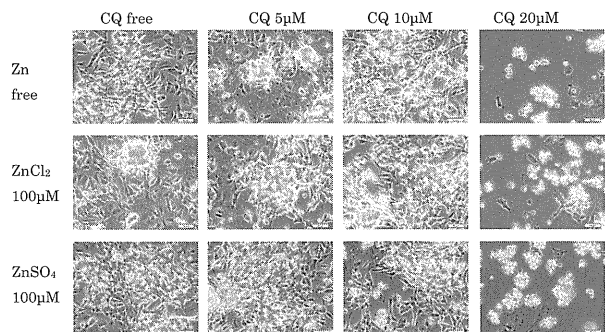


図2 ClioquinolによるSHSY5Y細胞傷害(位相差顕微鏡像)

の差異もあるように思われ、前回と同様の検討も今後必要である。また、この値は、これまでの10 µMから40 µMという結果にも相当している⁴⁾。

亜鉛はヒト血液中に相当程度存在し、正常値は65~110 µg/dl (=10~20 µM)とされる。既報では50 µM程度^{6,7)}あるいは5~20 µM⁸⁾で増強効果があったとされた。Clioquinolの細胞傷害が抗腫瘍薬として注目され、Znイオン添加による著明な増強効果も示されているが、今回は観察できなかった。この差異が生じた理由については、今後、再検討を要する。

E. 結論

Clioquinolの培養細胞に対する傷害効果は、20 µM程度以上で生じることが再度確認された。しかしながら、これまで報告されている亜鉛イオン添加による著明な細胞傷害増強効果は観察されなかった。これは、Clioquinolの培養細胞に対する傷害効果が亜鉛のキレート作用、イオノフォア効果に依存しないことを示唆している。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 培養細胞に対する亜鉛イオンとClioquinolの細胞傷害作用

Cos7細胞	CQ free	CQ 5µM	CQ 10µM	CQ 15µM	CQ 20µM
Zn free	-	-	-	±	++
ZnCl ₂ 30µM	-	-	-	±	+++
ZnCl ₂ 100µM	-	-	-	±	++
Cos7細胞	CQ free	CQ 5µM	CQ 10µM	CQ 20µM	
Zn free	-	-	-	++	
ZnSO ₄ 30µM	-	-	-	++	
ZnSO ₄ 100µM	-	-	-	++	
Cos7細胞	CQ free	CQ 5µM	CQ 10µM	CQ 20µM	
Zn free	-	-	-	++	
ZnBr ₂ 30µM	-	-	-	++	
ZnBr ₂ 100µM	-	-	-	++	
PC12細胞	CQ free	CQ 5µM	CQ 10µM	CQ 20µM	
Zn free	-	-	-	+	
ZnCl ₂ 100µM	-	-	-	+	
ZnSO ₄ 100µM	-	-	-	+	
SHSY5Y細胞	CQ free	CQ 5µM	CQ 10µM	CQ 20µM	
ZnCl ₂ free	-	-	-	+++	
ZnCl ₂ 30µM	-	-	-	+++	
ZnCl ₂ 100µM	-	-	-	+++	
Neuro2a細胞	CQ free	CQ 5µM	CQ 10µM	CQ 20µM	
ZnCl ₂ free	-	-	-	+++	
ZnCl ₂ 30µM	-	-	-	+++	
ZnCl ₂ 100µM	-	-	-	+++	

I. 文献

- 1) Mancino AM, Hindo SS, Kochi A, Lim MH. Effects of clioquinol on metal-triggered amyloid-beta aggregation revisited. *Inorg Chem.* 2009; 48: 9596-8.
- 2) Nguyen T, Hamby A, Massa SM. Clioquinol down-regulates mutant huntingtin expression in vitro and mitigates pathology in a Huntington's disease mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102: 11840-5.
- 3) Kaur D, Yantiri F, Rajagopalan S, Kumar J, Mo JQ, Boonplueang R, Viswanath V, Jacobs R, Yang L, Beal MF, DiMonte D, Volitaskis I, Ellerby L, Cherny RA, Bush AI, Andersen JK. Genetic or pharmacological iron chelation prevents MPTP-induced neurotoxicity in vivo: a novel therapy for Parkinson's disease. *Neuron.* 2003; 37: 899-909.
- 4) Ding WQ, Liu B, Vaught JL, Yamauchi H, Lind SE. Anticancer activity of the antibiotic clioquinol. *Cancer Res.* 2005; 65: 3389-95.
- 5) Chen HL, Chang CY, Lee HT, Lin HH, Lu PJ, Yang CN, Shiau CW, Shaw AY. Synthesis and pharmacological exploitation of clioquinol-derived copper-binding apoptosis inducers triggering reactive oxygen species generation and MAPK pathway activation. *Bioorg Med Chem.* 2009; 17: 7239-47.
- 6) Arbiser JL, Kraeft SK, van Leeuwen R, Hurwitz SJ, Selig M, Dickersin GR, Flint A, Byers HR, Chen

LB. Clioquinol-zinc chelate: a candidate causative agent of subacute myelo-optic neuropathy. *Mol Med.* 1998; 4: 665-70.

7) Yu H, Zhou Y, Lind SE, Ding WQ. Clioquinol targets zinc to lysosomes in human cancer cells. *Biochem J.* 2009; 417: 133-9.

8) 武藤多津郎他. Clioquinol の神経細胞に対する影響-2. 厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服事業) 平成 21 年度総括・分担研究報告書. 2011; 96-8.

キノホルムによる癌抑制遺伝子 p53 の活性化

勝山 真人 (京都府立医科大学大学院医学研究科中央研究室 RI センター)

矢部 千尋 (京都府立医科大学大学院医学研究科病態分子薬理学)

研究要旨

キノホルムによるスモン発症のメカニズムは未だ不明である。我々は DNA チップを用い、培養神経系細胞株においてキノホルムにより発現が変動する遺伝子を網羅的に解析したところ、癌増殖遺伝子 p53 の標的遺伝子である p21^{Cip1} や GADD45 α (growth arrest and DNA damage-inducible protein) の発現が上昇することを見出した。そこでキノホルムによる p53 の活性化が細胞毒性に寄与するものと考え、その活性化機構を解析した。

ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞と IMR-32 細胞を定法により培養した。キノホルム (50 μ M) 存在下で 24 時間培養した細胞とコントロールの細胞から total RNA を抽出して cDNA を合成し、定量 PCR を行うことにより RNA 量の変化を解析した。また培養した細胞から whole cell lysate を調製し、定法によりウエスタンブロットを行い、蛋白量の変化を解析した。

定量 PCR を行ったところ、キノホルム処理により p21^{Cip1} の発現量は、SH-SY5Y 細胞では約 23 倍に、IMR-32 細胞では約 13 倍に増加していた。また GADD45 α の発現量は、SH-SY5Y 細胞では約 8 倍に、IMR-32 細胞では約 4 倍に増加していた。ウエスタンブロットの結果、両細胞において、キノホルム処理により p53 の 15 番目のセリン残基のリン酸化と、それに伴う p53 の安定化が起こることがわかった。

キノホルムの細胞毒性には、癌抑制遺伝子 p53 の活性化とその下流遺伝子の転写促進が関与することが推察された。

A. 研究目的

我が国で亜急性脊髄視神経ニューロパチー (スモン) という重篤な薬害をもたらしたキノホルム (一般名: クリオキノール) は、主に銅と亜鉛に高い親和性を示す金属キレート剤であり、その腸内殺菌作用は菌体内の金属酵素の金属をキレートすることにより発揮されると考えられていた。一方キノホルムによるスモン発症の原因についてはビタミン B₁₂ の低下によるとする説があるものの、確固たる証拠が得られないまま今日に至っている。

近年海外において、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン舞踏病といった神経変性疾患に対

する改善効果や制がん作用が注目され、キノホルム類縁化合物の医薬品としての価値が見直されている。特にアルツハイマー病に関してはオーストラリアで第 2 相試験が行われ、キノホルムおよびその類縁化合物 (PBT2) によるアルツハイマー病のキレート療法は有望であるとの報告がなされている¹⁾。アルツハイマー病の発症に関わるとされるアミロイド β 蛋白の沈着には銅・亜鉛イオンが関与しており、キノホルムはそのキレート効果によってアミロイド β 蛋白を可溶化することが示されている²⁾。

一方キノホルムの細胞毒性については、酸化ストレス³⁾、20S プロテアソームの阻害⁴⁾、cytoplasmic

clearance of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) の発現誘導⁵⁾を紹介するといった報告がなされており、このような作用は制がん作用にもつながると推定されている⁶⁾。

銅・亜鉛キレート剤とされるキノホルムであるが、鉄イオンをキレートする作用⁷⁾、また銅・亜鉛・鉄イオンを細胞内に導入するイオノフォアとしての作用も報告されており⁸⁾、キノホルムが神経毒性を示すか神経保護作用を示すかについても依然として相反する議論がなされている。キノホルムの医薬品としての価値が見直されている今日、その神経毒性の分子基盤の解明は、臨床への再応用に警鐘を鳴らし、新たな薬害を阻止するためにも必須である。我々は DNA チップを用い、培養神経系細胞株においてキノホルムにより発現が変動する遺伝子を網羅的に解析した。キノホルムにより細胞周期の停止に関与する p21^{Cip1} の発現が上昇したことから、その上流に位置する癌抑制遺伝子 p53 のシグナリングが活性化するものと考え、その解析を行った。

B. 研究方法

【細胞培養】

ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞はハム F12:EMEM (アール塩含有) (1:1) (1%非必須アミノ酸と 15%ウシ胎仔血清を添加) で培養した。ヒト神経芽細胞腫 IMR-32 細胞は、EMEM (アール塩含有) (1%非必須アミノ酸と 10%ウシ胎仔血清を添加) で培養した。キノホルムはジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、培地中に 1000 倍希釈して添加した。対照のサンプルには DMSO を添加した。

【定量 PCR】

キノホルム (50 μ M) 存在下で 24 時間培養した細胞とコントロールの細胞から、QIAGEN 社の RNeasy Plus Mini Kit を用いて total RNA を抽出した。TOYOBO 社の THUNDERBIRD SYBR qPCR/RT Set を用いて逆転写と PCR 反応を行った。反応と解析はライフテクノロジーズ社の StepOnePlus を用いて行った。段階希釈したプラスミドを対照に絶対定量を行い、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HPRT) の発現量を指標に補正を行った。

【ウエスタンブロット】

細胞を 1% Triton、0.5% デオキシコール酸ナトリウム、10 mM TrisHCl (pH 6.8)、150 mM NaCl、1 mM EDTA、protease inhibitor cocktails (ナカライテスク社)、1 mM NaF、20 mM β -glycerophosphate、1 mM Na₃VO₄ を含有する溶解液で溶解し、whole cell lysate を調製した。定法により SDS-PAGE とウエスタンブロットを行った。リン酸化 p53 を検出した後、strip と reprobe を繰り返し、total p53、 β -actin の順に検出を行った。

C. 研究結果

【キノホルムによる p21^{Cip1} と GADD45 α の発現上昇】

DNA チップを用いた SH-SY5Y 細胞における網羅的発現解析の結果、キノホルム処理により p21^{Cip1} の発現量は約 21 倍に、また GADD45 α の発現量は約 24 倍に増加していた。そこでこの発現変化を定量 PCR により確認したところ、キノホルム処理により p21^{Cip1} mRNA の発現量は、SH-SY5Y 細胞では約 23 倍に、IMR-32 細胞では約 13 倍に増加していた。また GADD45 α mRNA の発現量は、SH-SY5Y 細胞では約 8 倍に、IMR-32 細胞では約 4 倍に増加していた (図 1)。

【キノホルムによる p53 の活性化】

p21^{Cip1} と GADD45 α は癌抑制遺伝子 p53 の標的遺伝子であり、キノホルム処理によりその発現量が増加していたことから、キノホルムにより p53 が活性化されることが推定された。そこでウエスタンブロット法により、p53 活性化の指標である 15 番目のセリン残基 (Ser15) のリン酸化とそれに伴う p53 の安定化の検出を試みた。SH-SY5Y 細胞、IMR-32 細胞のどちらにおいても、Ser15 がリン酸化された p53 量がキノホルム処理により増加した。またキノホルム処理により total p53 量も増加し、p53 が安定化されることがわかった (図 2)。

D. 考察

DNA チップを用いた SH-SY5Y 細胞における網羅的発現解析において、細胞毒性に関与することが予想される分子に着目してデータを解析したところ、細胞

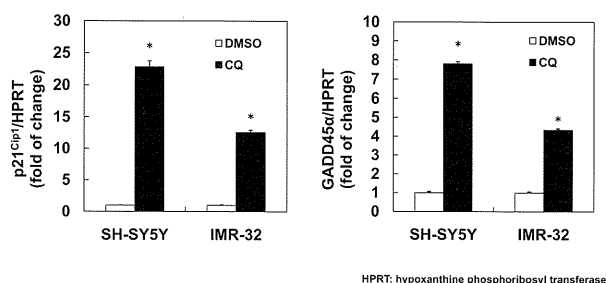


図1 キノホルムによるp21^{Cip1} mRNA および GADD45α mRNA の発現誘導

周期の停止に関与する p21^{Cip1} の発現量がキノホルム処理によって約 21 倍に増加することが判明した。p21^{Cip1} は癌抑制遺伝子 p53 の代表的な標的遺伝子であることから、もうひとつの代表的標的遺伝子 GADD45α についても着目したところ、キノホルム処理により約 24 倍に増加していた。この発現上昇を定量 PCR により確認したところ、SH-SY5Y 細胞、IMR-32 細胞のどちらにおいても、p21^{Cip1}、GADD45α とともにキノホルム処理により有意に発現が上昇していた。このことから、キノホルムにより p53 が活性化されることが推定された。

ウエスタンブロット法により、SH-SY5Y 細胞、IMR-32 細胞のどちらにおいても、Ser15 がリン酸化された p53 タンパク量、および total p53 タンパク量がキノホルム処理により増加した。このことから、キノホルム処理によって p53 の活性化と安定化が引き起こされることがわかった。

本研究は培養細胞のレベルではあるが、キノホルムが細胞死の誘導に関わる p53 を活性化することを示したものである。p53 の Ser15 のリン酸化には、ataxia telangiectasia mutated kinase (ATM)、ATM-Rad3-related kinase (ATR)、DNA-dependent protein kinase (DNA-PK)、p38 MAP kinase、extracellular signal-regulated protein kinase (ERK)、AMP kinase といったキナーゼが関与することが知られている^{8,9)}。今後はこれらのキナーゼのうちのどれがキノホルムによって活性化されるのか、またどのようなメカニズムでキノホルムがそのキナーゼを活性化するのかについて、詳細に検討していく予定である。

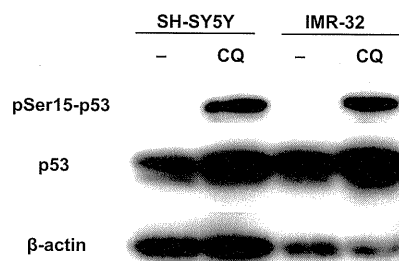


図2 キノホルムによるp53のSer15のリン酸化

E. 結論

キノホルムの細胞毒性には、癌抑制遺伝子 p53 の活性化とその下流遺伝子の転写促進が関与することが推察された。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I. 文献

- 1) Ritchie CW, Bush AI, Mackinnon A, Macfarlane S, Mastwyk M, MacGregor L, et al. Metal-protein attenuation with iodochlorhydroxyquin (clioquinol) targeting Abeta amyloid deposition and toxicity in Alzheimer disease: a pilot phase 2 clinical trial. *Arch Neurol* 2003; 60: 1685-1691.
- 2) Cherny RA, Atwood CS, Xilinas ME, Gray DN, Jones WD, McLean CA, et al. Treatment with a copper-zinc chelator markedly and rapidly inhibits beta-amyloid accumulation in Alzheimer's disease transgenic mice. *Neuron* 2001; 30: 665-676.
- 3) Benvenisti-Zarom L, Chen J, Regan RF. The oxidative neurotoxicity of clioquinol. *Neuropharmacology* 2005; 49: 687-694.
- 4) Mao X, Li X, Sprangers R, Wang X, Venugopal A, Wood T, et al. Clioquinol inhibits the proteasome and displays preclinical activity in leukemia and myeloma. *Leukemia* 2009; 23: 585-590.
- 5) Cater MA, Haupt Y. Clioquinol induces cytoplasmic clearance of the X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP): therapeutic indication for prostate cancer. *Biochem J* 2011; 436: 481-491.

- 6) Ding WQ, Liu B, Vaught JL, Yamauchi H, Lind SE. Anticancer activity of the antibiotic clioquinol. *Cancer Res* 2005; 65: 3389-3395.
- 7) Kaur D, Yantiri F, Rajagopalan S, Kumar J, Mo JQ, Boonplueang R, et al. Genetic or pharmacological iron chelation prevents MPTP-induced neurotoxicity in vivo: a novel therapy for Parkinson's disease. *Neuron* 2003; 37: 899-909.
- 8) She QB, Chen N, Dong Z. ERKs and p38 kinase phosphorylate p53 protein at serine 15 in response to UV radiation. *J Biol Chem* 2000; 275: 20444-20449.
- 9) Kruse JP, Gu W. Modes of p53 regulation. *Cell* 2009; 137: 609-622.

全国スモン患者におけるパーキンソン病発症頻度の前向き研究について

——和歌山県における自験例の意義と全国集計の状況——

吉田 宗平（関西医療大学神経病研究センター）
紀平 為子（関西医療大学神経病研究センター）
森岡 聖次（国立南和歌山医療センター内科）
小西 哲郎（国立病院機構宇多野病院）
小長谷正明（国立病院機構鈴鹿病院）
橋本修二（藤田保健衛生大学医学部衛生学講座）

A. 研究目的

キノホルムの神経毒性の発現機序は未だ明らかではないが、老年期に至った和歌山県 SMON 患者には Parkinson 病（以下 PD）が高率発病していること、また、全国 SMON 患者においても女性優位に高頻度発症を示す地区があることを前回報告¹⁾した。今回は、PD 合併の自験例を踏まえ、前向き研究の提案後の経過報告とその継続の意義について述べる。

B. 研究方法

I. PD 自験例の臨床報告

これまで、1989-2008 年の 20 年間に亘って現状調査により追跡された和歌山県スモン患者の中で、2 例のパーキンソン病（definite PD cases）を経験したので、その臨床的特徴と経過につき報告する。

II. 前向き研究に関する経過報告と意義

前回、1992-2007 年の 15 年間に亘る全国スモン患者におけるパーキンソン病の発症頻度調査（第二報）¹⁾として、人年法によって女性スモン患者に PD 発病頻度が高いこと、また、地域別では和歌山県で指摘されたように、北海道地区および近畿地区でも PD の発病が一般人口よりも高いことが確認された。しかし、これは、SMON の現状調査によるデータベースを利用した後ろ向き研究（retrospective study）で、検診体制等による case assessment の地域格差が大きく、問題が残った。その為、2008 年以降の現状調査の中で前向き研究（prospective study）として、今後スモン

患者の中での新たな PD 発症者の登録を各地区リーダーに依頼し、一定の報告を得たので、その途中経過を報告する。

C. 研究結果

I. PD 自験例の臨床報告

自験例①：84 歳、女性（身長 149cm、体重 35Kg）

SMON 歴は、昭和 42 年 9 月（40 歳）発症、視力眼前手動弁、歩行不能。観察期間は昭和 63 年～平成 23 年まで。最終診時、SMON 障害度は中等度（SMON + 加齢）、常に不眠、心気的で、抑うつ傾向。近年著明に記憶力も低下。時に眼痛（ドライアイ）を訴え、眼瞼痙攣を伴う。表在感覚は、乳以下に触覚、痛覚の中等度の低下あり、両下肢末梢優位を示す。振動覚は高度に低下し、Romberg 徴候陽性。足底部に付着感、冷えが著明であるが、発症当初に比べてはかなり改善。四肢腱反射はほぼ正常範囲で、Babinski 徴候陰性。Clonus など下肢の痙性は認めず。下肢の皮膚温低下、尿便失禁を伴う。両下肢は、軽度のび慢性筋萎縮と筋力低下を示す。

パーキンソン症候については、平成 5 年（66 歳）頃より抑うつ症状が強く、平成 11 年向精神薬投与により口部・手指振戦、無動、筋固縮が出現し、薬剤性パーキンソニスムの疑いにて投薬中止。しかし、平成 18 年（79 歳）に至っても口部と右上肢振戦、筋固縮、無動など P 症状が消失せず、徐々に進行。L-DOPA 剤にはよく反応し、最終的に平成 20 年（81 歳）P 病

(HY-Ⅲ) と診断。平成 22 (83 歳) 年までは、つかまり歩き、介助により外出可能。平成 23 年 (84 歳) には、車いすを使用となり、強い抑うつと記憶力低下が進行した。平成 21 年 1 月頭部 MRI にて、前頭・側頭葉大脳皮質のび慢性脳萎縮と軽度の脳室拡大、平成 23 年 9 月 MIBG 心筋シンチグラフィにて、H/M ratio は 15 分後 1.66、2 時間後 1.27 と取り込み低下を認めた。

自験例②：82 歳、女性 (最終診時)。観察期間は、昭和 63 年 10 月～平成 8 年 11 月までの 9 年間。SMON 発症は昭和 45 年 (56 歳)、視力ほとんど正常、歩行は一本杖、当初 1 か月入院。最終診時、るい瘦 (身長 150cm、体重 40Kg)、食思不振、常に不眠。白内障、高血圧症を合併。SMON 障害度は中等度 (SMON+合併症、加齢)。歩行不能で、下肢筋力低下中等度、鼠蹊部以下に末梢優位の軽度の知覚低下、振動覚障害中等度を認める。四肢腱反射は全体に低下、病的反射陰性。

パーキンソン症候については、平成 1 年 (54 歳) K 大学神経内科で、P 病と診断を受けており、無動、四肢の筋固縮と振戦 (HY-Ⅲb)。不安・焦燥、心気的で、抑うつ傾向あり、記憶力も低下。次第に、認知症が進行し、最終診時には家庭内でのケアが困難となり入所中であった。

II. 前向き研究に関する経過報告とその意義

平成 20 年度 (2008 年) の前向き研究 (prospective study) の提案以降、平成 23 年 (2011 年) までの 4 年間で、8 件の報告を受けた。その内、新たな definite PD2 例 (北海道 1 例、中国・四国 1 例) が確認された。

Definite PD2 例の SMON 発症は、それぞれ 35、33 歳で、PD 推定発病年齢は、81 と 75 歳とともに高齢女性であった。1 例に抑うつ症状があったが、認知症の合併は 2 症例共になかった。また、いずれの症例も MIBG 心筋シンチグラフィは未施行であった。

ちなみに、全国 50 歳以上の SMON 患者の P 病発病頻度を概算してみると、これまで比較の基準としてきた和歌山県 base-population study²⁾ の粗発病率 41.5 人/10 万人に対して、粗発病率 59.9 人/10 万人で risk ratio は 1.44、女性のみでみると 44.2 人/10 万人に対して 80.8 人/10 万人で risk ratio は 1.89 とやや高い傾

向を認めた。今後更に、前向き調査を継続すると共に評価にあたっては平均年齢等を考慮した年齢調整必要と思われる。

D. 考察

まず、I. 2 自験例の臨床的特徴をまとめると、高齢女性で SMON 障害度は中等度 (スモン+加齢)、抑うつ傾向を伴い、パーキンソニズムを呈し、最終的には、加齢も加わり、認知障害の進行が見られた。パーキンソニズムについては、臨床的には通常の PD と異なる点はなく、発症年齢についても老年期変性疾患の好発時期に相当すると考えられた。

抑うつ傾向が 2 自験例ともにみられたが、長期経過観察できた自験例①は発症当初より強いうつ症状がみられ、一時精神科の受診歴があった。Konishi ら (2008)³⁾ により、SMON 患者におけるうつ症状が、一般健常者に比べ 7 倍近く多いことが報告され、その特異性が指摘されている。

キノホルムは、Fe, Cu, Zn など遷移金属に対して強いキレート作用を有し、長期に亘るキノホルムの生体への大量暴露は、金属代謝に大きな負荷を与える。ドーパミンやセロトニンの代謝系の第一律速段階におけるフェニルアラニン水酸化酵素 (phenylalanine hydroxylase; PAH)、チロシン水酸化酵素 (tyrosine hydroxylase; TH) やトリプトファン水酸化酵素 (tryptophan hydroxylase; TPH) など monooxygenases による酸素分子からの benzene ring への酸素原子添加反応には、補酵素としての tetrahydropterins と Fe (II) イオンが必須で、これらなしには進行しえない⁴⁾。それ故、SMON 患者におけるうつ症状やパーキンソニズムの発現には、キノホルムのキレート作用による Fe 代謝異常が、共通のメカニズムとして関与していた可能性も推定される。

なお、自験例の検討からは、PD (あるいは DLB) の確定診断には、MIBG 心筋シンチグラフィが他疾患の除外診断に有用と思われる、今後全国的に検討すべき課題と思われた。

次いで、II. 全国 SMON 患者における前向き研究では、平成 20 年 (2008 年) 以降 2 例の definite PD の報告があった。これを、全国 50 歳以上の SMON 患者で

みると、risk ratio は 1.44、女性のみでは 1.89 と一般人口（50 歳以上）におけるよりも多い傾向が伺われた。今後、更に前向き研究を延長して症例数を集積すると共に、発症頻度の評価に当たっては、平均年齢の高齢化（現在、76.7 歳）であること、女性優位（男性の 2.5 倍以上）であることを充分考慮して、検討する必要がある。

E. 結論

全国 SMON 患者における P 病発症頻度調査を、平成 20 年度以後も前向き研究として継続し、新たな definite PD 2 例が発見された。今後も継続した前向き調査が必要であり、その際、除外診断には MIBG 心筋シンチグラフィーが有用であると考えられた。

G. 研究発表

- ・吉田宗平，紀平為子，盛岡聖次：和歌山 SMON 患者におけるパーキンソン病の発症頻度調査，第 52 回日本神経学会学術大会，名古屋，2011 年 5 月。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I. 文献

- 1) 吉田宗平，紀平為子，小長谷正明，小西哲郎，橋本修二，盛岡聖次：全国スモン患者におけるパーキンソン病の発症頻度調査（第 2 報），厚生労働科学研究補助金（難治性疾患克服研究事業），平成 22 年度総括・分担研究報告書，p 124-128, 2011.
- 2) Morioka S, Yoshida S, et al.: Incidence of Parkinson disease in Wakayama, Japan. J Epidemiol 12: 403-407, 2002.
- 3) Konishi T, Hayashi K et al.: Depression in patients with subacute myelo-optico-neuropathy (SMON), Inter Med 47: 2127-2131, 2008.
- 4) Nishida Y: Oxidative stress and neurodegeneration, Medical Hypothesis Research 3: 227-245, 2004.

パーキンソニズムを合併した発症後経過 44 年の SMON の一部検例

上野 聡 (奈良県立医科大学神経内科)
杉江 和馬 (奈良県立医科大学神経内科)
澤 信宏 (奈良県立医科大学神経内科)
桐山 敬生 (奈良県立医科大学神経内科)
形岡 博史 (奈良県立医科大学神経内科)
島田 啓司 (奈良県立医科大学病理病態学)
藤井 智美 (奈良県立医科大学病理病態学)
小西 登 (奈良県立医科大学病理病態学)

研究要旨

1964年にスモン (subacute myelo-optico-neuropathy) の名称が提言され、当時は相次いで剖検報告されたが、近年は散見される程度である。今回、パーキンソニズムを合併しスモン発症後経過 44 年の患者を経験したので、病理学的に検討した。患者は男性で、35 歳時キノホルム服用後、両下肢～臍以下の感覚障害と視力障害を発症した。68 歳頃から小刻み歩行と前傾姿勢が出現。76 歳と 77 歳に脳梗塞とともに認知症を発症し、78 歳で心タンポナーデで死亡した。病理解剖の結果、大脳白質に梗塞巣が散在し、脳血管は動脈硬化性変化を認めた。線条体は一部神経線維が疎となりグリオーシスを認めた。扁桃体や海馬周辺は神経原線維変化を呈したが明らかな老人斑はみられなかった。中脳黒質はニューロメラニンを伴った錐体細胞の減少はなく保たれていた。脳幹、大脳皮質ともに明らかな Lewy 小体は認めなかった。視神経や外側膝状体での明らかな変性はなかった。脊髄後索では軸索変性と髄鞘脱落がみられた。側索では特記すべき所見はなかった。後根と腓腹神経で有髄神経線維の脱落と軽度の脱髄所見を得た。大動脈は胸部で解離を認め、心臓は血性心嚢水と凝血塊があり心タンポナーデを呈していた。今回の検討で、スモンに起因すると考えられる脊髄後索と末梢神経病変を見出したが、本例は長期経過例であり活動性のある変性所見はみられなかった。視神経や外側膝状体、脊髄側索で異常を呈さなかったことは修復機転が働いた可能性が示唆される。一方、本例のパーキンソニズムは、臨床経過と併せて血管障害性が原因と考えられた。

A. 研究目的

スモンは、1970年にキノホルムの製造・販売が停止されて以降、新たな患者の発生はないが、長年にわたり多くの患者が後遺症に悩まされている。1964年に病理所見に基づき、スモン (subacute myelo-optico-neuropathy: SMON) の名称が提言され、炎症性の組織像ではなく類系統的な変性疾患であることが指摘された¹⁾。当時は相次いで剖検所見の報告がされたが¹⁻³⁾、

近年は散見される程度である。

これまで、私たちは毎年奈良県内在住のスモン患者の現状を調査し実態把握を行ってきた⁴⁻⁸⁾が、この 20 年間では病理解剖にいたる症例はなかった。今回、パーキンソニズムを合併し、スモン発症後経過 44 年の患者を経験したので、長期生存例における病理学的所見について検討した。

B. 研究方法

1) 症例

患者は、死亡時 78 歳の男性。家系内に類症や血族婚なし。喫煙は 1 日 20 本 30 年、飲酒は 1 日ビール 1 本 50 年。1968 年 (35 歳時)、キノホルム服用後、両下肢末梢～臍以下の感覚障害と視力障害が出現しスモンを発症した。以後、症状は持続したが独歩は可能であった。68 歳頃からすり足、小刻み歩行、前傾前屈姿勢となり、パーキンソニズムを認めた。脳 MRI では、大脳深部白質の虚血性変化が高度であった。同年に、腹部大動脈解離のため人工血管置換術を施行。76 歳時に左手巧緻運動障害出現し、脳梗塞発症、認知症状も出現してきた。77 歳時に前立腺癌にて加療。その後、意識消失と左片麻痺が出現し、脳梗塞を再発した。78 歳で発熱と意識障害を来し入院。誤嚥性肺炎とともに胸部大動脈解離、心タンポナーデを認め、死亡した。

2) 方法

患者家族に説明の上、同意を得て中枢神経を含む全身の病理解剖を行った。中枢神経においては、通常の組織化学染色に加えて、1 次抗体として、抗 α -synuclein 抗体、抗 substance P 抗体、抗 GFAP 抗体、抗 SMI31 抗体を行った。末梢神経においては、2.5% グルタルアルデヒド固定検体からエポソ包埋薄切片、解きほぐし解析標本を作成した。

C. 研究結果

脳重 1318g。脳表面は軽度脳溝が拡大し、視床、基底核、線条体、内包前脚、扁桃体に微小軟化巣が散在していた。脳血管は動脈硬化性変化がみられ、視床、内包は陳旧性の出血性梗塞がみられた。線条体は一部

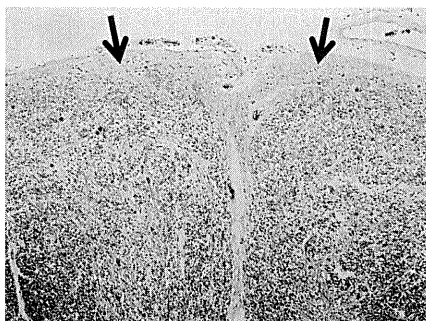


図1 頸髄後索 (KB 染色)

神経線維が疎となりグリオシスを認め、前頭葉の一部は比較的新鮮な出血性梗塞を認めた。扁桃体、橋、海馬周辺は神経原線維変化を呈したが明らかな老人斑はみられなかった。中脳黒質は肉眼的、組織的に神経メラニンを伴った錐体細胞の減少はなく保たれていた。脳幹、大脳皮質ともに明らかな Lewy 小体は認めなかった。免疫組織化学染色では α -synuclein の過剰発現はみられなかった。視神経や外側膝状体での明らかな変性はなかった。頸髄後索を中心に軸索の変性と髄鞘の脱落がみられ、spheroid が散見された (図 1)。頸髄～腰髄側索では特記すべき所見はなかった。腰髄後根と腓腹神経では、有髄神経線維の脱落と一部非薄化した線維を認め、ときほぐし解析では節性脱髄所見を得た (図 2)。後根神経節と前根では神経線維は保たれていた。免疫組織化学染色で、脊髄後角の substance P の発現は正常対照に比べやや染色性の低下を認めた。

大動脈は腎動脈直上から遠位は人工血管で、腹腔動脈直上から中枢側は解離が進み、冠動脈入口付近まで達していた (Stanford type A)。心臓は 150ml の血性心嚢水、198g の凝血塊があり、心タンポナーデを呈していた。心筋側壁、下壁、後壁には陳旧性梗塞巣を認めた。前立腺は小型の異型腺管が増殖しており腺癌を認めた。

D. 考察

今回の検討で、スモンに起因すると考えられる脊髄後索と末梢神経の病変を見出したが、本例は長期経過例であり活動性のある変性所見はみられなかった。末梢の感覚神経において有髄神経線維の脱落があったが、軽度ながら有髄神経の髄鞘の再生化が散見された。視神経や外側膝状体、脊髄側索で異常所見を呈さなかつ

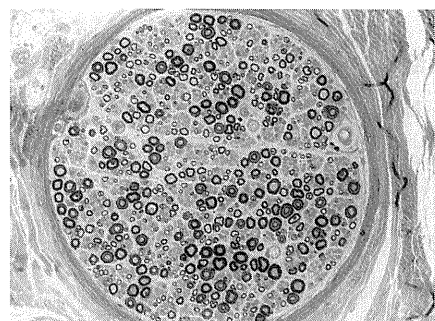


図2 腓腹神経 (トルイジンブルー染色)