

若年発症・軽症例)も高齢化が進んでおり、これらの  
予防・対策が重要である。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

#### I. 文献

- 1) 藤井直樹ほか：九州地区におけるスモン患者の現状調査（平成 23 年度），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 23 年度総括・分担研究報告書，p. 53-55, 2012.
- 2) Kanehisa H, et al: A cross-sectional study of the size and strength of the lower leg muscle during growth. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 72: 150-156, 1995.
- 3) 清原裕ほか：久山町研究—認知症．*日老医学会誌* 45: 163-165, 2008.

## Clioquinol による細胞傷害の検討 (3)

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)

### A. 研究目的

Clioquinol は銅/亜鉛選択的キレート作用を持ち、これによるアルツハイマー病の治療が試みられている。また、Clioquinol の細胞傷害作用は抗腫瘍薬として期待されているが、報告者により細胞傷害濃度の差が大きい。今回はこの細胞傷害増強効果について低密度の培養細胞を行い検討した。また、Clioquinol の製品の差を検討した。

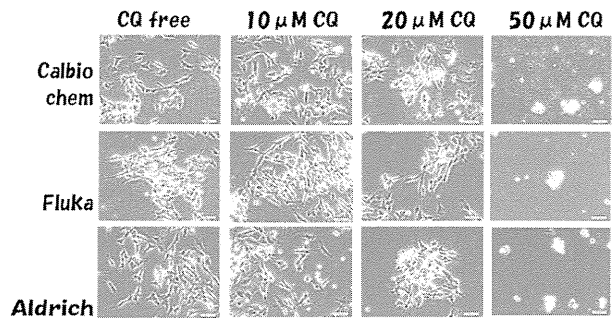


図1 Clioquinol の製品差の検討

### B. 研究方法

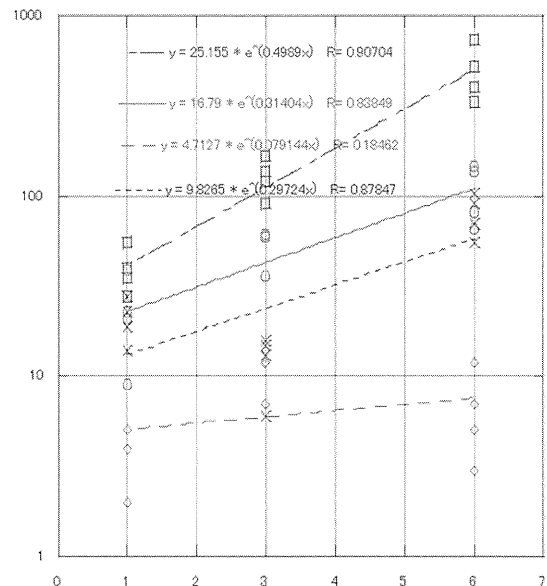
Neuro2a、SHSY-5Y、PC12、Cos7 細胞を  $0.1-1.6 \times 10^2/\text{mm}^2$  に培養し、Clioquinol を 5, 15, 30  $\mu\text{M}$  で添加し、1-10 日間観察した。Clioquinol は、Calbiochem (#233165, 96.6% pure (HPLC), made in Japan)、Sigma-Aldrich-Fluka (#33931, 98.9% pure (HPLC), product of Germany)、Sigma-Aldrich (24880, >95% pure, product of France) を入手し比較検討した。

### C. 研究結果

Clioquinol は Calbiochem、Sigma-Aldrich -Fluka、Sigma-Aldrich の 3 製品ではほぼ同等の細胞傷害濃度を示した (図 1)。

低密度培養では増殖曲線をはじめに検討した。SHSY-5Y の一部では Cyto16 による核染色を行い細胞数をカウントした。増殖速度は片対数グラフでの指数関数での回帰直線から求めた。細胞密度により増殖速度に差異を示し、条件によっては増殖を示さなかった (図 2)。PC12 細胞では密度差は顕著ではなかったが、増殖を停止することもあった。

SHSY-5Y 細胞は低密度培養では Clioquinol を加えなくても自発的な細胞傷害を示した。継続して培養を続けると 10 日の間に、15  $\mu\text{M}$  Clioquinol で中等度、



SHSY-5Y GF 20%FCS 12wells plastic bottom	Start (0.556mm <sup>2</sup> )	Proliferation (days)	R	Doubling time
1	25.155	$e^{(0.4989x)}$	0.90704	1.40 days
1/5	9.8265	$e^{(0.29724x)}$	0.87847	2.33 days

SHSY-5Y Dish 20%FCS 12wells plastic bottom	Start	Proliferation	R	Doubling time
1	16.79	$e^{(0.31404x)}$	0.83849	2.20 days
1/5	4.7127	$e^{(0.079144x)}$	0.18462	failed

図2 低密度培養での細胞増殖の解析 (SHSY-5Y 細胞)

30  $\mu$ M で高度の有意な細胞傷害を示した (図 3)。

PC12 細胞では 10 日間の観察で 5  $\mu$ M、15  $\mu$ M の Clioquinol 濃度では全く影響を示さず semiconfluent ととなった。30  $\mu$ M では細胞培養開始 24 時間後に Clioquinol を加えたときに強い細胞傷害を示したが、48 時間以後では限定的な傷害にとどまった。

低密度培養での細胞傷害は増殖の速い Neuro2a、Cos7 細胞では同様で、15  $\mu$ M では細胞傷害を示さず、30  $\mu$ M で明らかであった。confluent になってから Clioquinol を加えたのでは細胞傷害は生じなかった。

#### D. 考察

Clioquinol は高純度に精製が困難で数%程度の不純物を含む。今回検討できた 3 試薬はほぼ同等の細胞傷害濃度を示した。SMON 発症時の Clioquinol 製品との比較検討が待たれる。

#### E. 結論

Clioquinol の培養細胞に対する傷害効果は、Neuro 2a、PC12、Cos7 細胞では 15  $\mu$ M 程度まででは生じないことが再度確認された。SHSY-5Y 細胞は自発的細胞傷害を示し、長期の培養で 15  $\mu$ M 程度の Clioquinol で有意な細胞傷害を示すことが明らかになった。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

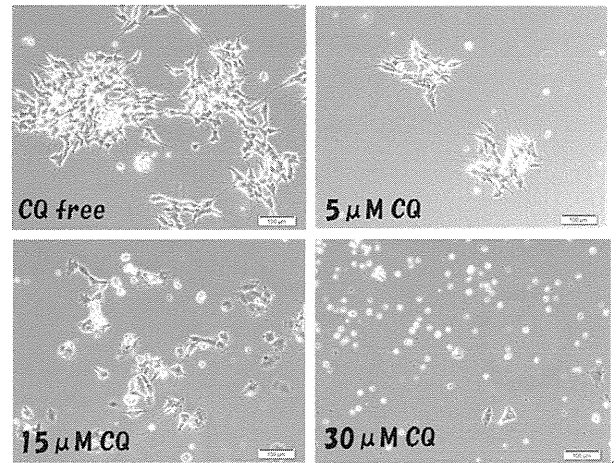


図 3 SHSY-5Y 細胞低密度培養での Clioquinol 細胞毒性の検討 (10 日後)

# キノホルムによる DNA 二本鎖切断と ATM/p53 シグナリングの活性化

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、癌抑制性転写因子 p53 の標的遺伝子である p21<sup>Cip1</sup> や GADD45 $\alpha$  (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。キノホルム存在下で培養した細胞とコントロールの細胞から 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。

SH-SY5Y 細胞および IMR-32 細胞において、キノホルムは p53 の 15 番目のセリン残基のリン酸化と、p53 の安定化を引き起こした。このリン酸化は ataxia-telangiectasia mutated kinase (ATM) の阻害剤 KU-55933 によって抑制された。キノホルムは ATM のリン酸化を引き起こした。ATM を活性化する DNA 二本鎖切断への影響を解析したところ、キノホルムは DNA 二本鎖切断の指標であるヒストン H2AX のリン酸化を引き起こした。

キノホルムの細胞毒性には、DNA 二本鎖の切断による ATM の活性化と、それに伴う癌抑制性転写因子 p53 の活性化が関与することが明らかとなった。

## A. 研究目的

我が国で亜急性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 B<sub>12</sub> 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。

キノホルムの細胞毒性については、酸化ストレス<sup>(1)</sup>、20S プロテアソームの阻害<sup>(2)</sup>、cytoplasmic clearance of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) の発現誘導<sup>(3)</sup>を介するといった報告がなされている。一方近年海外において、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<sup>(4)</sup>。アルツハイマー病の発症に関わるとされるアミロイド $\beta$  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 $\beta$  蛋白を可溶化することが示されている<sup>(5)</sup>。

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<sup>(6)</sup>、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<sup>(7)</sup>、キノホルムが神経毒性を示すか神

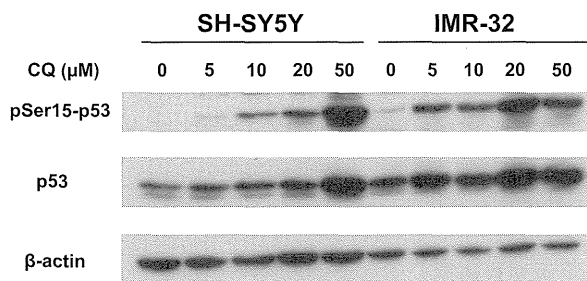


図1 キノホルムによるp53のSer15のリン酸化

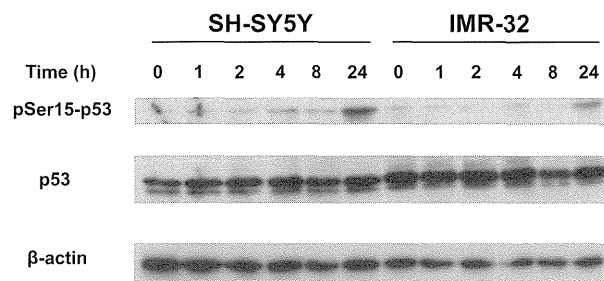


図2 キノホルムによるp53のSer15のリン酸化

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チップを用いて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、キノホルムにより癌抑制性転写因子 p53 の標的遺伝子である p21<sup>Cip1</sup> や GADD45 $\alpha$  (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。

## 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。

### 【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  $\beta$ -glycerophosphate、1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 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。p53 の検出では、リン酸化

p53 を検出した後 strip と reprobe を繰り返し、total p53、 $\beta$ -actin の順に検出を行った。ATM (ataxia-telangiectasia mutated kinase) の検出では、リン酸化 ATM を検出した後 strip と reprobe を行い、total ATM の検出を行った。ヒストン H2AX の検出では、リン酸化 H2AX ( $\gamma$  H2AX) を検出した後 strip と reprobe を行い、total H2AX の検出を行った。

## C. 研究結果

### 【キノホルムによる p53 の活性化】

p21<sup>Cip1</sup> と GADD45 $\alpha$  は癌抑制性転写因子 p53 の標的遺伝子産物であり、キノホルム処理によりそれらの mRNA 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) のリン酸化の検出を試みた。まずキノホルム24時間刺激によるSer15のリン酸化の濃度依存性を検討した。SH-SY5Y 細胞では10 $\mu$ M以上で、IMR-32 細胞では5 $\mu$ M以上でリン酸化 p53 が検出された (図1)。次に細胞増殖の抑制が認められる濃度 (SH-SY5Y 細胞では20 $\mu$ M、IMR-32 細胞では10 $\mu$ M) で経時変化を調べたところ、どちらの細胞においても24時間の刺激によってリン酸化 p53 が検出された (図2)。

### 【ATM 阻害剤による p53 の活性化の抑制】

p53 の Ser15 のリン酸化に関与するキナーゼを同定するため、各種キナーゼ阻害剤の効果を検討した。各種キナーゼ阻害剤の存在下、SH-SY5Y 細胞では20 $\mu$ M、IMR-32 細胞では10 $\mu$ Mのキノホルムで24時間刺激したところ、ATM 阻害剤の KU-55933 はキノホルムによる p53 の Ser15 のリン酸化を抑制したが、

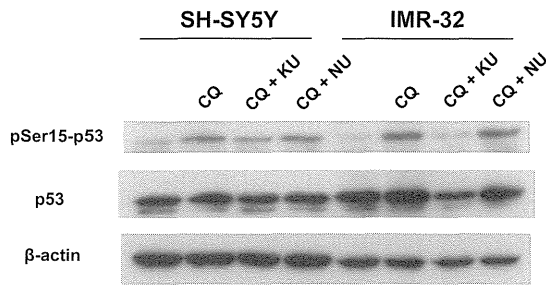


図3 ATM阻害剤によるp53のSer15のリン酸化の抑制

DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) 阻害剤の NU7026 には抑制効果は認められなかった (図3)。また p38 MAP kinase や extracellular signal-regulated protein kinase の阻害剤も抑制効果を示さなかった。以上のことから、p53 の Ser15 のリン酸化には ATM が関与するものと考えられた。

#### 【キノホルムによる ATM の活性化】

キノホルムによる ATM の活性化を、ATM の 1981 番目のセリン残基 (Ser1981) のリン酸化を指標に解析した。どちらの細胞においても 24 時間の刺激によって有意な ATM のリン酸化が検出された (図4)。

#### 【キノホルムによるヒストン H2AX のリン酸化】

ATM は DNA 二本鎖切断によって活性化されることが知られている。そこでキノホルムによる DNA 二本鎖切断を、ヒストン H2AX のリン酸化を指標に解析した。SH-SY5Y 細胞においてキノホルムは刺激 4 時間で顕著なヒストン H2AX のリン酸化を引き起こした。IMR-32 細胞では程度は低いものの、刺激 2 時間でヒストン H2AX のリン酸化を引き起こした (図5)。以上のことから、キノホルムによる DNA 二本鎖切断が ATM の活性化を引き起こすことが示唆された。

### D. 考察

本研究により、キノホルムによる p53 のリン酸化が ATM 阻害剤で抑制されること、またキノホルムが ATM およびヒストン H2AX のリン酸化を引き起こすことが明らかとなった。これらのことからキノホルムの細胞毒性は、DNA 二本鎖切断による ATM/p53 シグナリングの活性化を介するものと考えられた。

スモン患者では 1 日約 1.5 g のキノホルムが投与されていたと報告されている<sup>(8)</sup>。また 1.5 g の単回経口

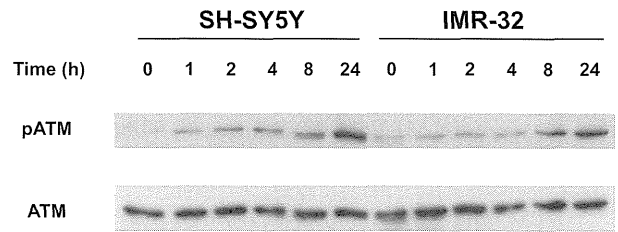


図4 キノホルムによる ATM のリン酸化

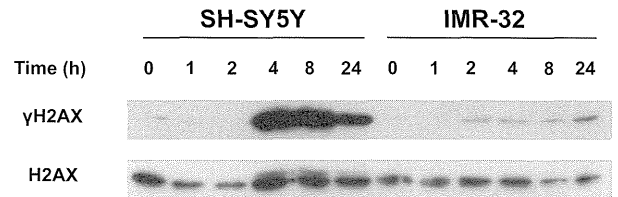


図5 キノホルムによるヒストン H2AX のリン酸化

投与で 4 時間後に約 20  $\mu\text{g/ml}$  (65  $\mu\text{M}$ ) の血中濃度に達すること、1 日 3 回・1 回 0.5 g・3 日間投与で 30  $\mu\text{g/ml}$  (98  $\mu\text{M}$ ) の血中濃度に達することが報告されており<sup>(9)</sup>、本研究で用いたキノホルムの濃度 (10  $\mu\text{M}$ ~20  $\mu\text{M}$ ) はスモン患者における血中濃度と乖離するものではない。

ATM は毛細血管拡張性運動失調症 (A-T) の原因遺伝子であり、A-T 患者では DNA 修復に異常が認められる。ATM は放射線照射に伴う DNA 二本鎖切断により活性化されることが知られている<sup>(10)</sup>。キノホルムがヒストン H2AX のリン酸化を引き起こしたことから、キノホルムによる ATM の活性化は DNA 二本鎖切断を介することが示唆された。実際キノホルムは銅イオンの存在下で DNA と結合することが報告されており<sup>(11)</sup>、キノホルムとの相互作用による DNA の高次構造変化が DNA 二本鎖切断につながる可能性が考えられる。

### E. 結論

キノホルムの細胞毒性には、DNA 二本鎖の切断による ATM の活性化と、それに伴う癌抑制性転写因子 p53 の活性化が関与することが明らかとなった。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- Katsuyama M, Iwata K, Ibi M, Matsuno K, Matsumoto M, Yabe-Nishimura C. Clioquinol induces DNA double-strand breaks, activation of ATM, and subsequent activation of p53 signaling. *Toxicology* 2012; 299: 55-59.

### 2. 学会発表

- 勝山真人, 矢部千尋. クリオキノールの神経毒性: DNA二本鎖切断とATM/p53シグナリングの活性化. 第86回日本薬理学会年会. 平成25年3月23日. 福岡.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## I. 文献

- 1) Benvenisti-Zarom L, Chen J, Regan RF. The oxidative neurotoxicity of clioquinol. *Neuropharmacology* 2005; 49: 687-694.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) Ding WQ, Liu B, Vaught JL, Yamauchi H, Lind SE. Anticancer activity of the antibiotic clioquinol. *Cancer Res* 2005; 65: 3389-3395.
- 8) Egashira Y, Matsuyama H. Subacute myelo-optico-neuropathy (SMON) in Japan. With special reference to the autopsy cases. *Acta Pathol Jpn* 1982;32 Suppl 1: 101-116.
- 9) Jack DB, Riess W. Pharmacokinetics of iodochlorhydroxyquin in man. *J Pharm Sci* 1973; 62: 1929-1932.
- 10) Bakkenist CJ, Kastan MB. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 2003; 421: 499-506.
- 11) Rohde W, Mikelens P, Jackson J, Blackman J, Whitcher J, Levinson W. Hydroxyquinolines inhibit ribonucleic acid-dependent deoxyribonucleic acid polymerase and inactivate Rous sarcoma virus and herpes simplex virus. *Antimicrob Agents Chemother* 1976; 10: 234-240.

## 徳島県におけるスモン検診ならびに キノホルムの培養神経細胞に対する毒性機序の検討

三ツ井貴夫（国立病院機構徳島病院神経内科）  
川村 和之（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）  
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37人、男性11人、女性26人（平均年齢はそれぞれ78歳、83歳）であった。集団検診（27人）、在宅訪問検診（7人）そして徳島病院外来（3人）であった。培養神経細胞株SH-SY5Yにclioquinolを添加し、16あるいは24時間後にcell viability、細胞質SOD活性および細胞質内活性酸素種を測定した。clioquinolを添加後、cell viabilityは非添加コントロールに対し $46.7 \pm 0.9$ （mean $\pm$ SE）%と有意な減少を示した（ $p < 0.05$ ）。また、非添加コントロールに対し、細胞質SOD活性は有意に減少し、細胞質内活性酸素種は有意に増加した（それぞれ $p < 0.05$ ）。一方、cell viabilityは精製SOD1（100-600 U/L）を同時に添加した場合、非添加に比べて有意に増加した（ $p < 0.05$ ）。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SOD1活性の阻害によってもたらされた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24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。

### 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（1-50  $\mu$ M）を添加し、16あるいは24時間



後の cell viability、細胞質 SOD 活性、細胞質内活性酸素種を CellQuanti-Blue Cell Viability Assay Kit (BioAssay Systems, CA, USA), cytochrome C 法、Cell Meter<sup>®</sup> Fluorimetric Intracellular Total ROS Activity Assay Kit (AAT Bioquest, CA, USA) を用いて測定した。また、培養液に clioquinol と精製 SOD1 (100-600 U/L) を同時に添加した場合に、cell viability が変化するか否かを検討した。

### C. 研究結果

平成 24 年度の検診者数は 37 人、男性 11 人、女性 26 人（平均年齢はそれぞれ 78 歳、83 歳）であった。集団検診（27 人）、在宅訪問検診（7 人）そして徳島病院外来（3 人）であった（図 1）。90 歳超の高齢者は 6 人で、最高齢者の 101 歳女性は在宅療養中で Barthel index はゼロであった（図 2）。最若年は 66 歳女性で、若年発症（14 歳）で、Barthel index は 85 点であった。平成 23 年、24 年度と 2 年続けて検診を受けた 30 名の検診者では、Barthel index は 14 名で不変、7 名で増加、9 名で低下していた。低下を示した 9 名のうち 8 名は 5 点の低下で、残りの 1 名が 20 点の低下であった。Barthel index の低下には特別な原因は認めなかった。

2. clioquinol を添加 24 時間後、cell viability は clioquinol 10-50  $\mu$ M の濃度において濃度依存性に低下した。非添加コントロールと比較して、cell viability は clioquinol 25  $\mu$ M では  $58.0 \pm 2.8$  (mean  $\pm$  SE) %、clioquinol 50  $\mu$ M では  $46.7 \pm 0.9\%$  と有意な減少を示した（図 4）（ $p < 0.05$ ）。また、clioquinol 50  $\mu$ M を添加した場合、非添加コントロールと比較して、細胞質 SOD 活性は有意に低下し（図 5）（ $p < 0.05$ ）、細胞質内活性酸素種は有意に増加した（図 6）（ $p < 0.05$ ）。一方、clioquinol と精製 SOD1 を同時に添加した場合、cell viability は非添加に比べて有意に増加し（図 7）（ $p < 0.05$ ）、細胞質内活性酸素種は有意に低下した（図 5）（ $p < 0.05$ ）。

### 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 42 年が経過する<sup>1)</sup>。徳島県下におけるスモ

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	73-87	78	24-41	29	47-55	50
女	26	66-101	83	14-54	35	46-52	49
計	37	66-101	81	14-54	33	41-46	49

検診内訳

	男	女	計	平均年齢
集団検診	9	18	27	80
訪問検診	1	6	7	87
病院外来	1	2	3	79
入院	0	0	0	—

図 1 平成 24 年度の検診受診者の内訳

症例	性	年齢(歳)	初発年齢(歳)	家族構成	歩行	視力	平成23年 Barthel 指数	平成24年 Barthel 指数
A	女	94	42	独居	独歩	軽度	85	80
B	女	93	47	独居	一本杖	軽度低下	60	70
C	女	94	49	2人	介助歩行	軽度低下	100	80
D	女	91	49	3人	不能	軽度低下	15	10
E	女	101	54	4人	不能	軽度低下	0	0
F	女	92	42	3人	不能	手動弁	0	0

図 2 90 歳以上の高齢検診者

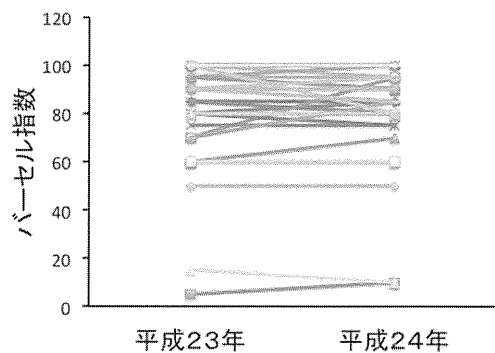


図 3 日常生活動作における障害度の変化

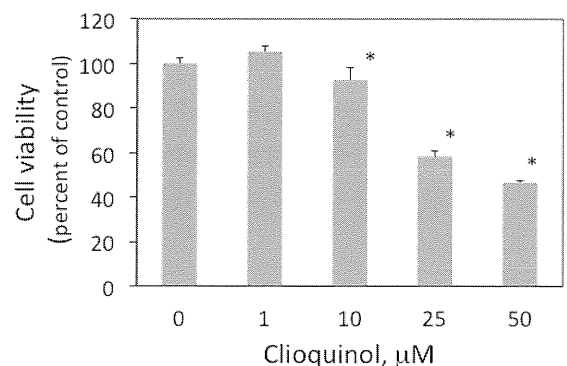


図 4 Clioquinol を添加 24 時間後の SH-SY5Y 細胞の cell viability ( $p < 0.05$ )

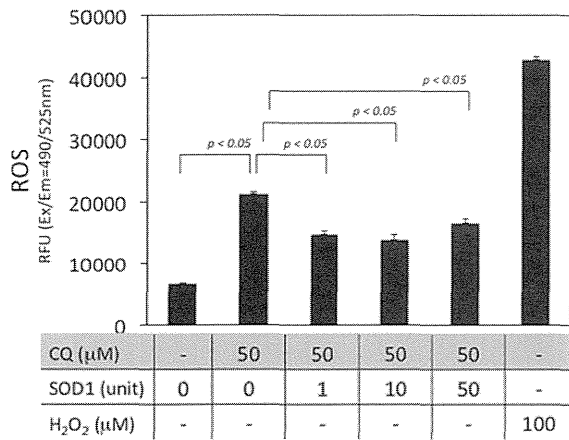


図5 clioquinol 50 μM を添加 24 時間後の SH-SY5Y 細胞の活性酸素種産生

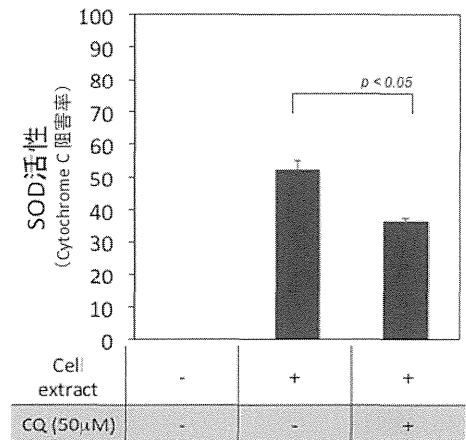


図6 clioquinol 50 μM を添加 24 時間後の SH-SY5Y 細胞の細胞質 SOD 活性

ン症例の罹病期間は平均 49 年、受診者の平均年齢は 81 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。平成 23 年と平成 24 年度の比較では、多くの方で Barthel index に大きな変化を認めなかった。日常生活の障害度が悪化し、歩行や入浴に介助を必要とするようになった方では、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<sup>2),3)</sup>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 (Aβ) 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 Aβ の沈着を抑制し、不溶化した Aβ 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<sup>4),5)</sup>。

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 (1-50 μM) を添加し、24 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 50 μM を添加し 24 時間培養した

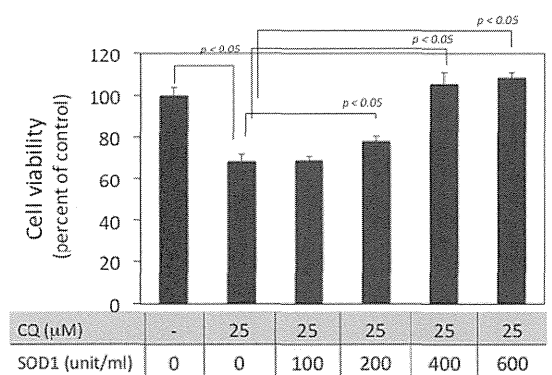


図7 Clioquinol 25 μM と精製 SOD1 (100-600 U/mL) を同時に添加した 16 時間後の SH-SY5Y 細胞の cell viability

SH-SY5Y 細胞では、細胞質 SOD 活性が有意に低下し、かつ細胞質内活性酸素種が有意に増加していた。また、clioquinol と精製 SOD1 を同時に添加した場合には細胞質内活性酸素種は低下し、cell viability の低下も抑制された。これらの結果から、clioquinol の神経細胞障害は、SOD1 活性の阻害によってもたらされた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。

## E. 結論

- 平成 24 年度の検診者数は合計 37 人で、平成 23 年度に比べ 1 名減少していた。本年度の検診を受けた検診者の Barthel index は昨年度とほぼ同等であり、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

性の細胞毒性を發揮し、これは SOD1 活性の阻害によってもたらされる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 subacutemyelo-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 の神経細胞に対する影響—5

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）

河村 直樹（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）

石川 等真（藤田保健衛生大学脳神経内科学）

新美 芳樹（藤田保健衛生大学脳神経内科学）

### 研究要旨

これまで我々は 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 の濃度依存的な Trk のチロシン自己リン酸化反応の抑制が認められ、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。

本年度は培養神経細胞を用いて、clioquinol によるアポトーシスの機序を明らかにする目的で、ミトコンドリア障害の有無、caspase 3 や caspase 9 の活性化の有無を検討した。その結果、我々が用いた神経成長因子（NGF）受容体（Trk）を高発現する培養神経系細胞では、clioquinol によるミトコンドリアの障害は認められず、caspase 9 の活性化も認められなかった。一方、clioquinol 添加により caspase 3 の活性化断片が認められた。とくに NGF を加えて分化させた細胞では、caspase 3 の活性化はより顕著であった。また、別の培養神経細胞を用いて clioquinol による細胞死を検討したところ、clioquinol に対する感受性は低く、生体内神経細胞でもその種類により clioquinol に対する感受性が異なる可能性が示唆された。

### 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、神経成長因子（NGF）受容体（Trk）を高発現する培養神経系細胞を用いて clioquinol の神経毒性の少なくとも一部は、NGF による 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）<sup>1)</sup>。さらにその細胞死はアポトーシスの誘導によって起こり、低濃度の亜鉛によって強く増強されることを明らかにしてきた。

今年度は、このアポトーシスがどのような経路で引き起こされているかを検討した。

### B. 研究方法

ラット褐色細胞腫より樹立された 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 に、clioquinol（1  $\mu$ 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。

神経細胞株 PCT (Trk 高発現細胞) に、NGF を加えていない細胞と、NGF を加えて 24 時間培養して突起伸展し分化した細胞に clioquinol 1  $\mu$ M または clioquinol 1  $\mu$ M と 5  $\mu$ M の亜鉛を加えてを加えて培養し、0~6 時間後まで継時的にそれぞれ蛋白を抽出し、ウエスタンブローディングを抗 caspase 3 抗体、抗 caspase 9 抗体を用いて行った。また、ミトコンドリアの障害の有無を MTT assay を用いて検討した。

さらに、ヒト神経芽細胞腫由来の細胞株 SH-SY5Y を用いて clioquinol の濃度を変えて培養し、24 時間後の細胞死を PCT 細胞と比較検討した。

### C. 研究結果

PCT 細胞は、clioquinol を加えることにより、caspase 3 の断片化 (caspase 3 の活性化) が軽度であるが認められ、clioquinol と亜鉛を加えた細胞では caspase 3 の断片化がより顕著であった。NGF 添加により分化した PCT 細胞は、clioquinol による caspase 3 の断片化が NGF を加えない場合に比べて明瞭で、clioquinol と亜鉛を加えた細胞ではより顕著であった。一方 caspase 9 の断片化は、NGF の有無にかかわらず clioquinol 単独または clioquinol+亜鉛のいずれのグループにおいても認められなかった。MTT assay では clioquinol または clioquinol+亜鉛添加によるミトコンドリア障害を示唆する所見は認められなかった。

また、SH-SY5Y 細胞に clioquinol を添加し、細胞毒性を検討したところ、培養 24 時間では、10  $\mu$ M の clioquinol を加えても細胞死は数%に認められるのみで、PCT 細胞に比べて死細胞数が少なかった。

### D. 考察

これまでの報告では、clioquinol はメラノーマ細胞に細胞死をきたし、その際にはミトコンドリアが障害されることが報告されているが<sup>2)</sup>、今回の検討で PCT 細胞ではミトコンドリア障害によるアポトーシス誘導の可能性は低いと考えられた。clioquinol は PCT 細胞にアポトーシスを引き起こすことを報告してきたが、caspase 3 が活性化 (断片化) されていることから、小胞体ストレスか caspase 8 の活性化を介した経路に

より引き起こされている可能性が示唆された。また、NGF で刺激した培養神経細胞 (より高分化な細胞) は、caspase 3 の活性化がより顕著に認められ、分化段階による感受性の違いが示唆された。さらに、clioquinol は SH-SY5Y 細胞では PCT 細胞ほどの細胞死を引き起こさないことから、細胞の種類によってもその感受性が著しく異なる可能性が示唆された。

### E. 結論

clioquinol による PCT 細胞死は、ミトコンドリアから cytochrome c を放出し、caspase 9 を活性化する経路ではなく、caspase 3 が活性化 (断片化) されていることから、小胞体ストレスか caspase 8 を介した経路により引き起こされている可能性が示唆された。また、神経系細胞でも、その種類により clioquinol 感受性に著しい差があることが示された。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- Mutoh T, Kawamura N, Hirabayashi Y, Shima S, Miyashita T, Ito S, Asakura K, Araki W, Cazzaniga E, Muto E, Masserini M: Abnormal cross-talk between mutant presenilin 1 (I143T, G384A) and glycosphingolipid biosynthesis. *FASEB J.* 26: 3065-3074, 2012.
- Hamano T, Mutoh T, Hirayama M, Uematsu H, Higuchi I, Koga H, Umehara F, Komai K, Kuriyama M: Winged scapula in patients with myotonic dystrophy type 1 *Neuromuscul Disord.* 22: 755-8, 2012.
- Kawamura N, Kizawa M, Ueda A, Niimi Y, Mutoh T: An update on diagnostic imaging studies of viral encephalitis. *Future Virol.* 7: 901-909, 2012
- Kato M, Kawaguchi K, Nakai S, Murakami K, Hori H, Ohashi A, Hiki Y, Ito S, Shimano Y, Suzuki N, Sugiyama S, Ogawa H, Kusimoto H, Mutoh T, Yuzawa Y, Kitaguchi N: Potential therapeutic system for Alzheimer's disease: removal of blood A $\beta$ s by hemodialyzers and its

effect on the cognitive functions of renal-failure patients *J Neural Transm.* 119: 1533-44, 2012.

## 2. 学会発表

- 朝倉邦彦, 植田晃広, 木澤真努香, 河村直樹, 鳥さゆり, 新美芳樹, 伊藤信二, 武藤多津郎 生理的アクアポリン4発現系の作製 第53回日本神経学会総会 東京 2012年5月.
- 朝倉邦彦, 武藤多津郎 キノホルムの神経毒性 スモンワークショップ 名古屋, 2012年7月.
- 朝倉邦彦, 植田晃広, 河村直樹, 新美芳樹, 伊藤信二, 武藤多津郎 生理的アクアポリン4発現系におけるその細胞内局在解析 神経免疫学会 軽井沢 2012年9月.
- 朝倉邦彦, 木澤真努香, 植田晃広, 河村直樹, 石川等真, 武藤多津郎 早期診断・治療により完治した急性頸椎炎症性疾患の2例 神経治療学会総会 北九州 2012年11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) 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.* 4: 665-670, 1998.

## スモン患者の咳嗽力に関する検討

里宇 明元（慶應義塾大学医学部リハビリテーション医学教室）

川上 途行（慶應義塾大学医学部リハビリテーション医学教室）

堀江 温子（慶應義塾大学医学部リハビリテーション医学教室）

辻川 将弘（慶應義塾大学医学部 リハビリテーション医学教室）

### 研究要旨

当科通院中のスモン患者7名（男性2名・女性5名、平均年齢81.6±7.2歳）を対象に咳嗽力の評価として、Peak cough flow（以下、PCF）を測定し、年齢、性別をマッチした対照群と比較した。歩行機能、ADL（Barthel Index）、握力、発声持続時間も合わせて測定し、PCFとの関連をスピアマンの順位相関係数およびピアソンの相関係数を用いて検討した。スモン患者群のPCFの平均値は218.6 ±66.2 L/min（110～300）、対照群は267.1±76.3 L/min（170～360）であり、両群で統計学的な有意差は認めなかった。PCF低値の症例は、スモン患者7例中5例（71%）であった。110 L/minの症例は陳旧性肺結核の既往例であった。最長発声持続時間とPCFは強い相関を認めた。【結論】スモン患者の咳嗽力はやや低い傾向を認め、定期的な呼吸機能、咳嗽力の評価、および呼吸器合併症のリスクの軽減のために、呼吸リハビリテーションの必要性が示唆された。

### A. 研究目的

以前より咳反射の低下が肺炎の危険因子であると報告されていた<sup>1)</sup>が、近年、咳の力=咳嗽力の低下も肺炎の危険因子として注目されている<sup>2),3)</sup>。しかし、スモン患者の咳嗽力の報告は見当たらないため、スモン患者の咳嗽力を調査した。また、咳嗽力と筋力や声帯機能との関係を調べるために、握力や最長発声持続時間と咳嗽力の関係を検討した。

### B. 対象と方法

対象は当院にてスモン検診を受診したスモン患者7名（男性2名・女性5名、平均年齢81.6±7.2歳）である。5名は当院外来を受診し、2名は往診にて評価を行った。

咳嗽力の評価として、Peak cough flow（以下、PCF）を測定し、年齢、性別をマッチした対照群（整形外科術前に当科受診した群、男性2名・女性5名、平均年齢80.2±5.7歳）と比較した。PCFは3回測定

を行い、最大の値を採用した。一般的なPCF低値とされる270 L/min未満をPCF低値例とし<sup>4)</sup>、その割合を調べた。

スモン患者では、歩行機能（スモン現状調査個人票による9段階評価、1.不能、2.車椅子（自分で操作）、3.要介助、4.つかまり歩行（歩行器など）、5.松葉杖、6.一本杖、7.独歩（かなり不安定）、8.独歩（やや不安定）、9.ふつう、の9段階）、ADL（Barthel Index）、握力、最長発声持続時間も合わせて測定し、PCFとの関連をスピアマンの順位相関係数およびピアソンの相関係数を用いて検討した。また、既往歴（特に呼吸器に関するもの）の情報を聴取した。

（倫理面への配慮）

データは、スモン検診受診時の診察および「スモン現状調査個人票」から得ており、「データ解析・発表に同意した」患者データのみを使用した。

表1 PCFと歩行機能、ADL、握力、発声持続時間との相関

	相関係数	p 値
歩行機能	-0.07	p=0.86
ADL	-0.21	p=0.64
握力	0.09	p=0.84
発声持続時間	0.91	p<0.01

PCFと歩行機能、ADLの相関はスピアマンの順位相関係数を用いて、PCFと握力、発声持続時間との相関はピアソンの相関係数を用いて検討。

### C. 研究結果

7例のうち1例で陳旧性肺結核の既往を認めた。スモン患者群のPCFの平均値は218.6±66.2 L/min (110~300)、対照群は267.1±76.3 L/min (170~360)であり、両群で統計学的な有意差は認めなかった。PCF低値の症例は、スモン患者7例中5例(71%)であった。110 L/minの症例は陳旧性肺結核の既往例であった。歩行機能やADL、握力とPCFの相関を認めなかったが、発声持続時間とPCFは強い相関を認めた(表1)(図1)。

### D. 考察

肺炎、特に誤嚥性肺炎の危険因子として、嚥下反射の低下、咳反射の低下が知られているが、近年、咳嗽力の低下が肺炎の危険因子として注目されている。Bianchiらは、慢性期脳卒中患者を中心に行った調査で、PCFの低値が肺炎の発症に関連したと報告しており<sup>2)</sup>、前島らも多くの疾患を含む嚥下障害患者を対象に同様の結果を報告している<sup>3)</sup>。

咳嗽力の評価として、PCFは神経筋疾患を中心に広く用いられている手法である<sup>5)</sup>。ピークフローメータを用いて、咳嗽の流速を測るものであり、喉頭を閉めて胸腔内圧を高める分ピークフローより高い流速が得られる。

PCFの基準値については、明確なものはまだないが、神経筋疾患患者を中心とした報告で、有効な咳となるためには160 L/minが、喀痰の排出には270 L/minが必要になるとされている<sup>4),6)</sup>。今回のスモン患者の結果ではPCF低下例を多く含んでいることが確認され、スモン患者に嚥下障害が増加している傾向があるという過去の報告<sup>7),8)</sup>と合わせて考えると、スモン

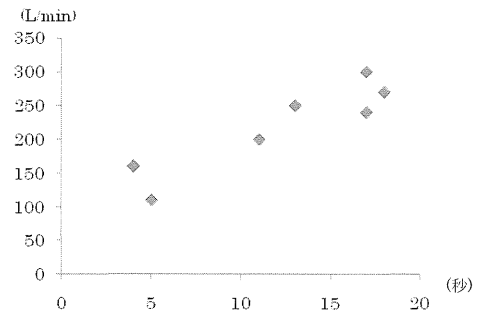


図1 PCFと最長発声持続時間の関係

ン患者は肺炎のリスク群であると推測される。また、スモン患者の死因として肺炎による死亡割合が高いという報告<sup>9),10)</sup>にも矛盾しない結果であった。

咳嗽力を規定する因子に関してはまだ報告が少ない。咳嗽とは、気道内の異物を咳受容体が感知し、求心性神経(舌咽神経、上咽頭神経)を介し、延髄咳中枢に伝えられ、遠心性神経(迷走神経、下咽頭神経、横隔膜神経)を介して、横隔膜や胸郭の筋肉に伝えられ、声門の閉鎖を伴う急激な胸腔内圧の上昇とその急激な解放によって生じる強力な呼吸であるが、呼吸機能、筋力、声帯機能などが咳嗽力を規定していると予測される。呼吸機能は咳嗽力に関連するという報告<sup>11),12)</sup>はいくつかあり、肺活量やピークフローなどが咳嗽力を規定する一つの大きな因子であると考えられている。

最長発声持続時間は、耳鼻咽喉科領域で一般的に用いられる評価法であり<sup>13)</sup>、日常生活に必要な発声能力の測定の一つである。呼気量とその呼気が喉頭調節によりどの程度効率よく声の音源に変換されるかを示している。すなわち呼吸機能と喉頭、声帯の動きの評価である。スモン患者では最大発声持続時間とPCFが高い相関を認めていた。

最大発声持続時間の測定には、特別な器具を必要とせず簡便であるため、一般診療の評価として施行しやすく、今後さらに症例を増やし、カットオフ値を検討する必要がある。

肺炎のリスクが高いと判断された症例では、呼吸リハビリテーションの導入にてそのリスクを軽減させることが期待できる。排痰訓練、呼吸筋訓練、全身調整訓練などを用いた包括的な呼吸リハビリテーションは、咳嗽力の低下している患者群の肺炎リスク軽減に有用と考えられ、今後、スモン患者において、肺炎の発生



率を減少させることができるか、検討する必要がある。

## E. 結論

スモン患者の咳嗽力は対照群よりやや低い傾向を認め、排痰が困難となる可能性があると考えられる。270 L/min 未満の症例が 70% を占めていた。定期的な呼吸機能、咳嗽力の評価、および呼吸器合併症のリスクの軽減のための呼吸リハビリテーションの必要性が示唆された。

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## I. 文献

- 1) Nakazawa H, Sekizawa K, Ujiie Y, Sasaki H, Takishima T. Risk of aspiration pneumonia in the elderly. *Chest* 1993; 103 (5): 1636-7.
- 2) Bianchi C, Baiardi P, Khirani S, Cantarella G. Cough peak flow as a predictor of pulmonary morbidity in patients with dysphagia. *Am J Phys Med Rehabil* 2012; 91 (9): 783-8.
- 3) 前島早代, 川上途行, 小原朋子, 他: 誤嚥性肺炎の発生率と咳嗽力との関係 Peak cough flow と嚥下機能評価. *The Japanese Journal of Rehabi Med* 2012; 49 Sup: S410.
- 4) 花山耕三. Paralytic condition における呼吸リハビリテーション. *The Japanese Journal of Rehabi Med* 2011; 48 (8): 566-574.
- 5) Bianchi C, Baiardi P: Coughpeakflows: standard values for children and adolescents. *Am J Phys Med Rehabil* 2008; 87: 461-467.
- 6) 日本呼吸器学会 NPPV ガイドライン作成委員会: 日本呼吸器学会 Noninvasive Positive Pressure Ventilation (NPPV) ガイドライン. *日本呼吸器学会雑誌* 2006; 44: 479-484.
- 7) 久留聡, 佐藤伸, 白石弘樹, 小長谷正明; スモン患者の嚥下障害. 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 23 年度報告書. pp 195-197. 2012.
- 8) 椿原彰夫, 吉原大貴, 目谷浩通, 東野孝治; スモン患者における嚥下機能評価. 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 23 年度報告書. pp 198-200. 2012.
- 9) 黒田研二, 多田羅浩三, Lee Bokseek, 他. スモン患者の生命予後に影響する患者特性に関する研究. *日本公衆衛生雑誌* 1996; 43 (3): 231-237.
- 10) 永井正規, 藤田委由, 原徳寿, 他. スモン患者の死因特性. *日本公衆衛生雑誌* 1989; 36 (3): 180-185.
- 11) Mustafa Netal. Coughaugmentationinamyotrophiclateralsclerosis. *Neurology* 2003; 61: 1285-1287.
- 12) 前島早代, 川上途行, 他. 咳嗽力を規定する因子に関する検討. *日本リハビリテーション医学会関東地方会* 2012.
- 13) 日本音声言語医学会(編): 声の検査法. 医歯薬出版, 1982, pp 211-252.

## スモン検診からみた患者の嚥下機能

久留 聡（国立病院機構鈴鹿病院神経内科）

佐藤 伸（国立病院機構鈴鹿病院リハビリテーション科）

近藤 修（国立病院機構鈴鹿病院リハビリテーション科）

小長谷正明（国立病院機構鈴鹿病院神経内科）

### 研究要旨

平成 22～24 年の 3 年にわたり、愛知県スモン検診において嚥下機能検査を 46 名（男 10 名、女 36 名、平均年齢 75.8 歳）に対して実施した。客観的には、嚥下機能に異常を認めないにもかかわらず、嚥下困難感を訴える場合があり、その原因の一つに呼吸機能の低下が関係しているのではないかと考え、平成 23 年度検診より呼吸機能検査をあわせて実施した。結果、嚥下困難感を訴える患者の呼吸機能は嚥下困難感を感じない患者と比べて低い傾向にあった。主観的な嚥下困難感と、客観的な嚥下機能検査の結果が解離していることに対し、今後さらなる研究の必要がある。

### A. 研究目的

平成 22 年度より 3 年にわたり愛知県スモン検診で嚥下機能検査を実施したので報告する。主観的な嚥下困難感と、客観的な嚥下機能検査を実施したがその結果が必ずしも一致しなかった。この解離に呼吸機能が関与しているか否か検討した。

### B. 対象と方法

平成 22 年度一宮地区検診（一宮・春日井・江南・津島・瀬戸・小牧）12 名、平成 23 年度三河地区（豊橋市・豊川市・新城市・蒲郡市）18 名、平成 24 年度名古屋地区（名古屋・半田・美浜・知多）16 名に対し実施した。

平成 22 年度検診では問診、反復唾液テスト、20ml 水飲みテストの嚥下機能検査を行った。平成 23、24 年度は呼吸機能検査も加えて行った。

#### 1. 問診

毎年、本人、家族や付添い人に対して咀嚼嚥下に対して感じている事、咽せの有無と頻度、食事形態、食事にかかる時間、摂取量などを確認した。

#### 2. 嚥下機能検査

#### ① 水飲みテスト（20ml）

常温の水 20ml をコップに注いで座位状態にある患者に渡し、「この水をいつものように飲んでください」と言って、水を飲み終わるまでを観察し、判定した。（表 1）

#### ② 反復唾液テスト

30 秒間で嚥下運動を反復させ、指腹で喉頭挙上を確認し、その回数を計測した。30 秒間で 3 回以上を正常とした。空嚥下は、口腔内に唾液しかない状態からの随意的な運動によるもので、口腔内の環境により結果が左右されやすい<sup>1),2)</sup>。口渴状態で実

表 1 水飲みテスト判定

判定
1. 1 回でむせることなく飲むことができる。
2. 2 回以上に分けるが、むせることなく飲むことができる。
3. 1 回で飲むことができるが、むせることがある。
4. 2 回以上に分けて飲むにもかかわらず、むせることがある。
5. むせることがしばしばで、全量飲むことが困難である。
時間
判定 1 で 5 秒以内：正常
判定 1 で 5 秒以上、判定 2：疑い
判定 3、4、5：異常

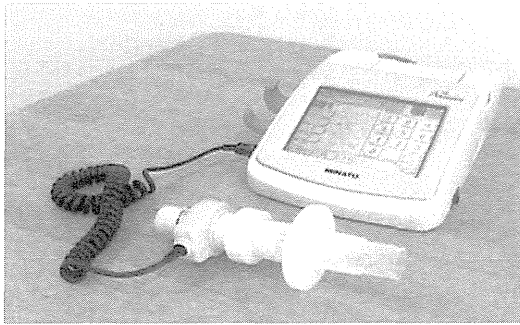


図1 ミナト医科学社製 オートスパイロ AS407

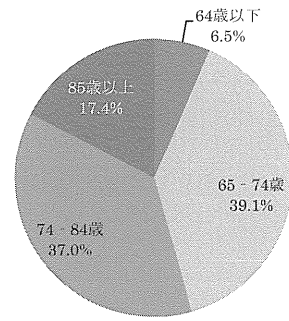


表2 検診受診患者の年齢構成

施することを避けて、水飲みテスト後に実施した。

### 3. 呼吸機能検査

努力性肺活量、1秒量、1秒率はミナト医科学社製 オートスパイロ AS407 (図1) を使用し、測定した。

### C. 研究結果

3年間で嚥下機能検査を受診した患者は46名(男:女=10:36)であった。平均年齢は75.8歳であり、年齢構成は64歳以下6.5%、65-74歳39.1%、75-84歳37.0%、85歳以上17.4%であった(表2)。問診で嚥下困難感を訴えた患者は14名(30.4%)、口腔内乾燥を訴えた患者は16名(34.8%)、時々咽せを訴えた患者は6名(13.0%)、特に異常を感じない患者は19名(41.3%)であった(表3)。嚥下機能検査では、異常を認めた患者はいなかった。

呼吸機能検査は検査者の指示が理解可能で、指示に従える患者を対象として、30名が実施した。年度別では平成23年度は14名、平成24年度は16名であった。

呼吸機能検査の結果、嚥下困難感を感じる患者と感

■22年度 ■23年度 ■24年度

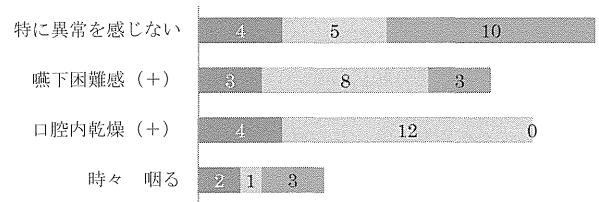


表3

じない患者の呼吸機能に有意差はみられなかった。しかし、呼吸機能の数値は低値であった(表4、表5、表6)。

### D. 考察

スモン患者の嚥下機能は、まだ十分に研究がされていない。われわれは、問診により患者自身による主観的評価と水飲みテスト、反復唾液テストによる客観的な評価の両者を行った。

平成22年度は主観的な嚥下困難感が3名、口腔内乾燥が4名、時折の咽せが2名であった。しかし、客観的な評価に明らかな異常を認めなかった。この解離

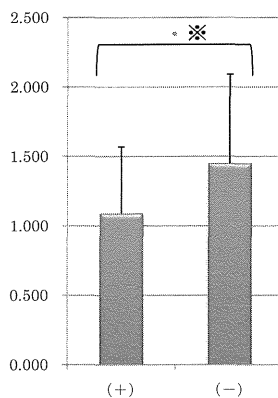


表4 1秒量の結果

※NS 嚥下困難感(+) $n=10$ (-) $n=20$

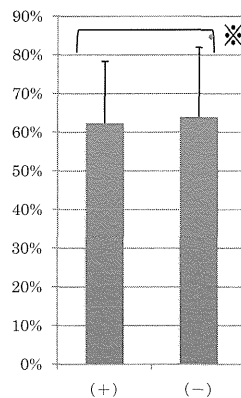


表5 1秒率の結果

※NS 嚥下困難感(+) $n=10$ (-) $n=20$

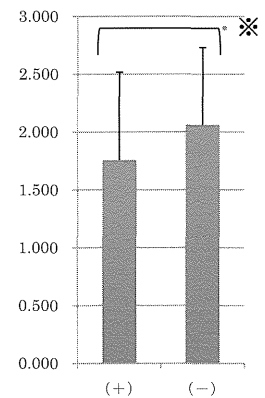


表6 努力性肺活量の結果

※NS 嚥下困難感(+) $n=10$ (-) $n=20$

の結果に呼吸機能が関与する可能性を考慮し昨年、発表をおこなった<sup>3)</sup>。

平成 23 年度検診は、嚥下困難感を感じる患者は 8 名 (44.4%) であった。呼吸機能検査を実施したところ、嚥下困難感を感じる患者の 1 秒量と努力性肺活量が有意に低値であった。平成 24 年度検診を含めた 34 名では、嚥下困難感を訴える患者は 11 名 (32.4%) であった。呼吸機能検査の結果、有意差はなかったが、嚥下困難感を訴える群は異常を感じない群に比して、呼吸機能 (1 秒量、1 秒率) が低い傾向が見られた。スモン患者は年々高齢化しており、活動性の低下による体幹筋群の筋力低下に伴う体幹の変形、スモンの特徴である下肢機能の低下による姿勢不良が胸郭の動きに制限を与えることにより呼吸機能は低下すると考える。呼吸機能の低下により摂食嚥下機能が低下し、それにより栄養状態も悪化し、体力の低下につながる。体力が低下すれば呼吸機能の低下につながる負の連鎖となる可能性が示唆される。呼吸機能の低下が、嚥下に必要な無呼吸を困難とさせることが要因の一つに考えられる。

今後の問題点として、呼吸機能検査の検査項目の再検討の必要性が考えられる。また、愛知県スモン検診は 3 年かけて愛知県を 1 周する為、次回検診時に同様の嚥下困難感の経年変化を確認してゆくことも重要であると考えられる。今後、さらに研究を継続し嚥下機能の主観的評価結果と客観的評価結果の解離について検討してゆきたい。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

#### I. 文献

- 1) 西尾正輝：摂食・嚥下障害の評価と治療，理学療法科学 16 (1)：5-16, 2001.
- 2) 小口和代，才藤栄一，水野雅康，馬場尊，奥井美枝，鈴木美保：機能的嚥下スクリーニングテスト「反復唾液テスト」(the Repetitive Saliva Swallowing Test：RSST) の検討 (1) 正常値の検討，リハビリテーション医学 2000; 37; 375-382.
- 3) 久留聡，佐藤伸，白石弘樹，小長谷正明：スモン

患者の嚥下障害．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 23 年度研究報告書 p195-197.