

## 表題 紀伊半島南部 ALS 多発地域における生活・食習慣の変化に関する検討

報告者氏名：○きひら紀平 ためこ為子<sup>1</sup>、おかもと岡本和士<sup>2</sup>、よしだ吉田宗平<sup>1</sup>、えがみ江上いすず<sup>3</sup>、いわい岩井恵子<sup>4</sup>、わださちこ和田幸子<sup>4</sup>、  
こくぼ小久保康昌<sup>5</sup>、くずはらしげき葛原茂樹<sup>5,6</sup>

所属：1:関西医療大学保健医療学部、2:愛知県立大学看護学部、3:名古屋文理大学健康生活学部 4: 関西医療大学保健看護学部、5: 三重大学大学院医学系研究科神経病態内科学、6: 鈴鹿医療科学大学保健衛生学部

**目的**：紀伊半島南部地域の ALS 発症頻度の低下に関する要因を究明するため、1960 年代と現在を比較し当地域の生活・食習慣の変化を明らかにする。**方法**：紀伊半島南部地区、対照地区住民に、食品摂取頻度、仕事、身体疲労、飲み水などに関して 1960 年代と現在の変化を尋ねる自記式アンケートを実施した。**結果**：当地域では近年、食パン、乳製品、野菜サラダの摂取頻度の増加など食習慣の欧米化、食品調達の広域化、農・漁業就労の頻度減少による力仕事の著減、町水道の利用増加で飲用水の水質の均一化が認められた。**考察**：これらにより、抗酸化物質等の摂取増加、激しい身体負荷の軽減がもたらされ、ALS の危険因子とされる酸化ストレスや外傷を軽減する要因として作用した可能性が考えられた。

### A.研究目的

紀伊半島南部では 1950-1960 年代に ALS の多発が認められたが、最近では、発症率の低下や発症年齢の高齢化など疫学的変化が認められている。これらの変化に環境・生活習慣など外的要因の関与が推察されるが、その具体的な内容は必ずしも明らかではない。当地域の ALS 減少に関連する外的要因を究明することは、ALS の発症要因の解明や発症予防を検討する上で重要と考えられる。本研究では紀伊半島南部多発地において ALS 発症頻度の低下と関連して 1960 年代と現在とで生活・食習慣にどのような変化が認められたかを明らかにする。

### B.研究方法

紀伊半島南部の大島地区住民と穂原地区住民、及び対照地区住民(紀伊半島北部山間部など)を対象とし、生活・食習慣の変化に関する自記式アンケートを実施した。食品摂取頻度、嗜好、仕事の内容、身体疲労、飲み水等に関する 63 項目の質問について、若い頃 (20-30 歳代、1960 年代を想定)と現在との違いを、「よく食べた」(毎日~隔日程度)、「減多に食べなかった」(週に 1 回以下)、或いは、「多かった」、

「あまり多くなかった」の 2 項選択で回答を求めた。大島地区では本アンケートを住民健診時 (平成 24 年 7 月 28-29 日)、穂原地区では穂原講演会(同年 11 月 25 日)、対照地区は地区集会時 (同年 10 月 22 日) に実施した。

これらのアンケート調査結果と、住民健診での検査結果を比較し、生活習慣が健康に及ぼす影響につき検討した。住民健診では、身体測定、認知症の検査として HDS-R, MMSE, FAB, においの検査 (カード型嗅覚同定検査)、血清元素測定、DNA の酸化ストレスの指標とされる尿中 8-OHDG 測定を実施した。

倫理面への配慮について、生体試料採取や臨床・個人情報収集に際して倫理的側面に充分配慮し、文書を用いた説明と本人の自由意志による同意を得てから実施した。本研究は関西医療大学倫理審査委員会で承認を得た (10-03)。

### C.研究結果

本研究への参加者は大島地区 71 名 (男性 15 名、女性 56 名、平均年齢 76.2±8.2 歳)、穂原地区 16 名、対照地区 10 名でアンケートの回収率は 100%であった。

1. 食品摂取頻度で、1960年代に「よく食べた」が現在では摂取頻度が減少した食品として、ごはん(1960年代 88.7%から現在 59.2%に、以下同様)、漬物(85%から 65%)、味噌汁(82%から 41%)、海藻(76%から 62%)が認められた。一方、1960年代に比し現在摂取頻度が増加した食品として、食パン(40.8%から 76.1%)、野菜サラダ(48%から 69%)、卵料理(45%から 65%)、乳製品(19%から 44%)が認められた。一方、魚介類・干物や煮野菜の摂取頻度は、1960年代も現在もともに「よく食べる」が80%以上であり、肉料理も摂取頻度は多くないが1960年代も現在も同様に25-30%であり、年代による変化はなかった。副食の欧米化を検討するため、乳製品(牛乳、チーズ、ヨーグルト)、卵料理、野菜サラダの3品のうち、全く摂らない、1品、2品、3品摂取する者の頻度を1960年代と現在(2010年代)で比較した。1960年代にこれら欧米化食品を全く摂らなかった者が33.8%から4.2%に著減し、逆に3品摂る者が21.1%から42.3%へと2倍に増加した(図1)。副食に欧米化食品を多くとる住民では主食に「食パン」を摂る者が有意に多かった( $p<0.05$ )。

現在「食パンをよく食べる」と回答した住民では、血清無機リンが高く( $p<0.05$ )、収縮期血圧が低値( $p<0.05$ )を示したが、骨密度は低値( $p<0.05$ )であった。現在「野菜サラダをよく食べる」と回答した住民では、体重、身長、握力が高値(各々 $p<0.05$ )で、さらにカード型嗅覚同定検査、MMSE、およびFABで高得点(各々 $p<0.05$ )を示した(図2)。一方、現在「干物をよく食べる」と回答した住民では、血清無機リン、血清Mgが低く(各々 $p<0.05$ )、血清Feと尿中8-OHDGが高値(各々 $p<0.05$ )であった(図3)。

このような食生活の欧米化傾向は、穂原地域住民でも認められ、欧米化食品3品を摂取する者の割合は、14.3%から60%へと増加した。対照地区住民でも同様に22.2%から50%へと増加した。

食品の入手方法は、スーパーマーケット利用が約30%増加した(図4)。

2. 仕事の内容の頻度は、力仕事(1960年代56.3%、現在9.9%)や漁業(1960年代32.2%、現在7%)、林業、水田は激減したが、畑仕事は(1960年代50.7%、現在39.4%)緩やかな減少であった(図5)。1960年代に「漁業や力仕事をよくした」と回答した住民

では、骨密度若年比と血清Fe値が高値(各々 $p<0.05$ )を示したが、血清アルブミン値は低値( $p<0.05$ )を示し、尿中8-OHDG値が高値を示す傾向がみられた( $P=0.197$ )。

3. 飲用水として井戸水利用は、1960年代43.7%、現在1.4%と著しく減少したのに対し、水道水利用は、1960年代32.4%、現在87.3%と著明に増加した(図4)。大島地区では水源の変更で串本地区同様の水質となった。

#### D. 考察

当地域では、1960年代に比較して近年は、摂取食品として食パンを主食とする頻度が増加し、さらに副食として乳製品や卵料理、野菜サラダの摂取頻度が増加するなど食生活の欧米化が認められた。これらにより、蛋白、脂質、ミネラル、抗酸化物質(レチノールやトコフェロール類)、ビタミン類の摂取量の増加が推察され、住民の身長・体重の維持や認知機能検査での高得点に寄与した可能性が推察された<sup>1</sup>。さらに食品調達にスーパーマーケット利用が進み、他地域からの食品の購入が進んでいることが確認された。また、労働内容では畑仕事は継続しているが、漁業などの力仕事の頻度が減少していることが確認された。食生活の欧米化や激しい身体負荷の軽減がALSの危険因子とされる酸化的ストレスや外傷の頻度を軽減する要因として作用した可能性が考えられた<sup>2</sup>。

一方、飲用水は、従来多発地とされた地域の河を水源とした水道水が広く利用されていることが確認された。食生活や身体負荷の軽減は対照地域でも同様に認められたが、河川や飲用水は当該地域に特異的であり、Caなど必須元素の極めて低い水質であった。河川や飲用水のCa低値による影響が、住民の食生活の欧米化や食品調達の広域化で改善されている可能性が考えられた。

#### E. 結論

本研究では、1960年代に比較して現在、紀伊半島南部地域において食生活の欧米化、食品調達の広域化、重労働など身体負荷の軽減など食・生活習慣に著明な変化があることが確認された。これらがALSの危険因子とされる酸化的ストレスや外傷を軽減する要因として作用した可能性が考えられるが、その機序について今後さらに検討が必要である。

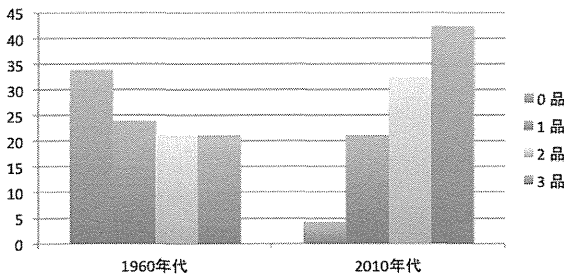


図1. 欧米化食品を「よく食べた」と回答した住民の割合. 欧米化食品として, 乳製品, 卵料理, 野菜サラダとした. 副食に欧米化食品を多く摂る住民では主食に「食パン」を摂るものが有意に多かった ( $p < 0.01$ ).

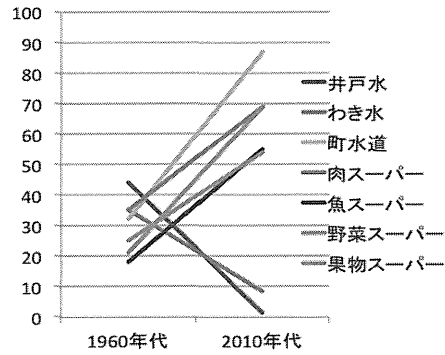


図4. 生活習慣の変化

「よく利用した」「滅多に利用しなかった」の2項選択で回答を求めた. 井戸水とわき水の利用は減少し, 各種食品購入のスーパー利用が増加した.

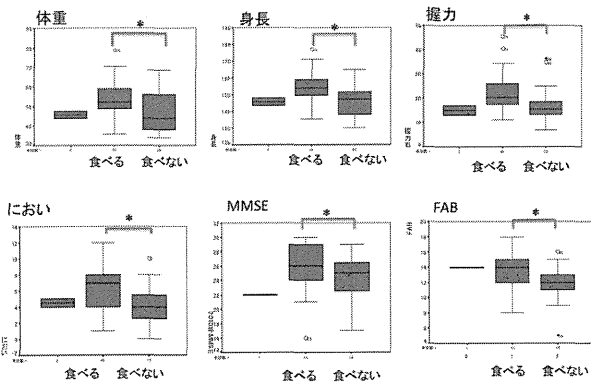


図2. 「現在野菜サラダをよく食べる」と回答した住民の特徴. 野菜サラダをよく食べる者では, 身体計測, 認知症検査で高得点を示した.

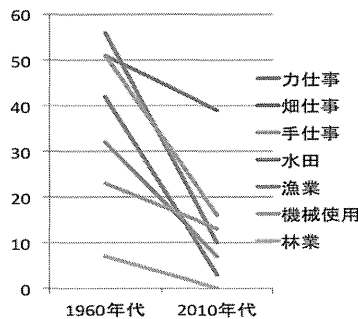


図5. 仕事の変化. 「よくした」「滅多にしなかった」の2項選択で回答を求めた. 力仕事や漁業の頻度は著減した.

文献

- Halliwel B. Am J Clin Nutr 2000; 72: 1082-7.
- Schmidt S. et al., J Neurol Sci. 2010; 291: 22-29.

F.健康危険情報 なし

G.研究発表

1. 論文発表

- T Kihira, S Yoshida, T Kondo, et al. An increase in ALS incidence on the Kii Peninsula, 1960-2009: A possible link to change in drinking water source. Amyotrophic Lateral Sclerosis, 2012; 13: 347-350

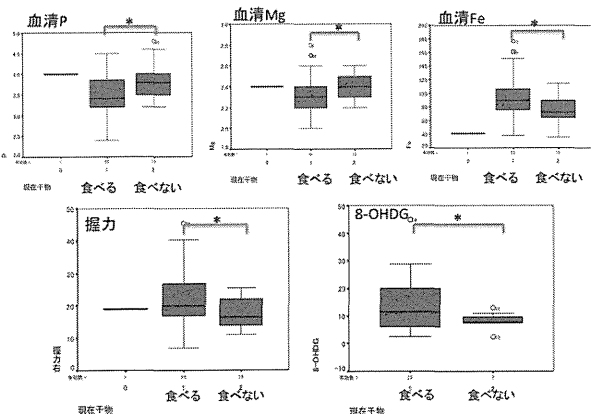


図3. 「現在干物をよく食べる」と回答した住民の特徴. 干物をよく食べると回答した者は, 尿中8-OHDG値が有意に高値を示した ( $p < 0.05$ ).

## 2.学会発表

1. T Kihira, I Sakurai, S Yoshida, et al. Neutron activation analysis for trace elements in scalp hair from ALS patients and residents of the Kii Peninsula, Japan. 23<sup>rd</sup> International symposium on ALS/MND, Chicago, USA, 5 December-7 December 2012.

2. 紀平為子、櫻井威織、吉田宗平、他. 多発地 ALS・PDCの環境要因の検討—放射化分析による毛髪中元素濃度定量—. 第53回神経学会総会、東京、2012年 5月

### H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

- 1.特許取得 なし
- 2.実用新案登録 なし
- 3.その他 なし

## 紀伊半島南部 ALS 多発地域における栄養摂取量の経時的変化に関する検討

岡本 和士<sup>1)</sup>

紀平 為子<sup>2)</sup>、江上いすず<sup>3)</sup>、小久保 康昌<sup>4)</sup>、葛原茂樹<sup>5)</sup>

<sup>1)</sup>愛知県立大学看護学部・疫学

<sup>2)</sup>関西医療大学、<sup>3)</sup>名古屋文理大学、<sup>4)</sup>三重大学医学部・神経内科

<sup>5)</sup>鈴鹿医療科学大学

### 研究要旨

〔目的〕紀伊半島南部ではかつて ALS の多発が認められていたが、近年では発症率の低下が認められてきた。これまで、この変化に影響を与えた要因、特に環境及び生活関連要因の解明に関する検討は私の知る限り皆無である。かつて発表者は ALS の発症に栄養要因が関連することを報告した。そこで、本研究では 2003 年と 2011 年に多発地の住民を対象に行った栄養調査結果を比較し、栄養摂取状況の変化と ALS 発症頻度の低下との関連を明らかにすることにある。〔方法〕2003 年と 2010 年に紀伊半島南部の古座川町(多発地)と花園地区(対象地区)に 20 歳以上の居住者を対象に、生活状況調査と自記式(一部聞き取り)による食品摂取頻度調査を行った。〔結果〕1. 栄養摂取量に関して兩年のエネルギー摂取量に有意差は認められなかった。栄養摂取割合に関しては、糖質摂取割合は有意でないが低下傾向を示し、脂質摂取割合は有意な増加を、飽和及び不飽和脂肪酸は有意でないが増加傾向を認めた。2. ビタミン・ミネラル摂取に関して、鉄、ビタミンD、βカロテンは有意な増加を、亜鉛、カルシウム、マグネシウム、ビタミンCおよびビタミンDは有意でないが増加傾向を認めた。食事中的コレステロールは有意に増加していた。3. 食品頻度摂取に関して、2010 年では総食品摂取量は有意差はないが減少していたが、穀類の摂取頻度は有意な低下を認め、野菜類、肉類、卵類および大豆製品の摂取頻度は有意な増加を認め、牛乳を含む乳製品は有意でないが増加傾向を認めた。同様な検討を、対照地区にて行った結果、糖質摂取割合と脂質摂取割合は増加傾向を認めた。一方、鉄、亜鉛は減少し、肉類および卵類の摂取割合には有意差が認められず、牛乳を含む乳製品の摂取割合は有意でないが減少傾向を認めた。本検討で、多発地では 2003 年と 2010 年で総エネルギー摂取量に差がないにもかかわらず、栄養摂取状況に差が認められたこと、さらに一部の栄養素及び食品にて対照地区と異なる変化を認めたことは栄養摂取状況の変化が ALS 発症頻度の低下に寄与した可能性を示唆する知見と考えられた

### A.研究目的

紀伊半島南部は、神経難病である筋萎縮性側索硬化症と認知症を伴うパーキンソン症候群の多発地帯であることが、以前から知られている。さらに、本地域にはパーキンソン病に似た運動障害と認知症を特徴とするパーキンソン認知症複合と呼ばれる疾患も多く見られる。これまでこれまでに飲み水や食べ物などの環境要因に関する調査研究は行われてきたが、未だその原因は不明である。さらに、近年

は発症率の低下が報告されてきた。この変化には主に生活関連要因の影響が大きいと推測されるも、この解明に関する検討は、私の知る限り皆無である。そこで、本研究では 2003 年と 2011 年に多発地の住民を対象に行った栄養調査結果を比較し、栄養摂取状況の変化と ALS 発症頻度の低下との関連を明らかにすることにある。

## B. 研究方法

### 1. 調査対象および調査方法

本研究は2003年と2010年に紀伊半島南部の古座川町(多発地)と花園地区(対象地区)に20歳以上の居住者を対象に、生活状況調査と自記式(一部聞き取り)による食品摂取頻度調査を行った。

対象者のうち、アンケートに回答した2003年144名(平均年齢62.5±13.3歳)と2010年477名(平均年齢67.4±14.8歳)であった。多発地および対照地区とも2010年の回答者は2003年に比べ有意に高齢であったため、そこで、本検討の解析対象者として両地区とも30-59歳(2003年51名、2010年120名)を用いた。

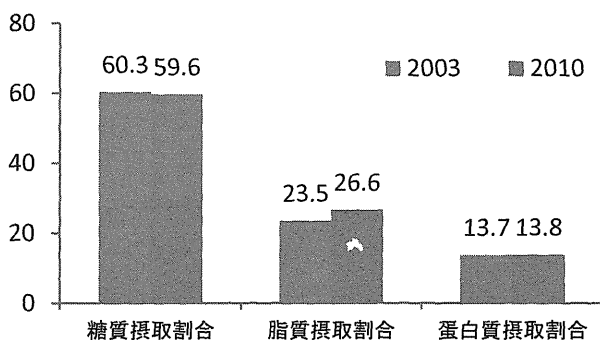
統計学的有意差の検定には、平均値の差の検定にはt-検定を、割合の差の検定には $\chi^2$ 検定を行った。

## C. 研究結果

### 1. 三大栄養素の摂取量及び摂取割合の比較

栄養摂取量に関して両年のエネルギー摂取量に有意差(2003: 1942Kcal; 2010: 1996kcal)は認められなかった。栄養摂取割合に関しては、糖質摂取割合は有意でないが低下傾向を示し、脂質摂取割合は有意な増加を認めた(図1)。

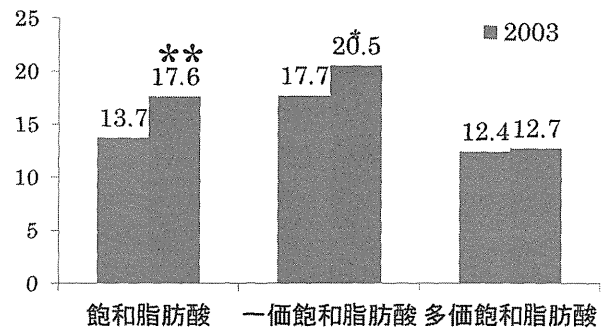
図1 年度別三大栄養摂取割合の比較



### 2. 年度別脂肪酸摂取量の比較

脂肪摂取のうち、2003年に比べて2010年に飽和及び一価不飽和脂肪酸は有意な増加を認めた。一方、2010年における多価不飽和脂肪酸は有意でないが、2003年に比べ増加傾向を示した(図2)。

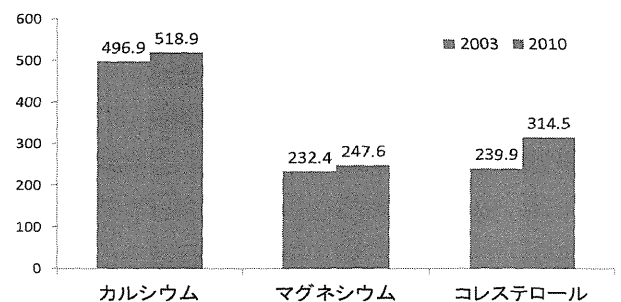
図2 脂肪酸摂取量の年度別比較



### 3. ミネラル及びコレステロール摂取量の比較

カルシウム、マグネシウムおよびコレステロールの摂取量は、いずれも2003年に比べ2010年では有意ではないが増加傾向を認めた。一方、対照地区では、多発地と同様コレステロール摂取量は増加していたが、カルシウム及びマグネシウム摂取量は有意ではないが減少していた(図3)。

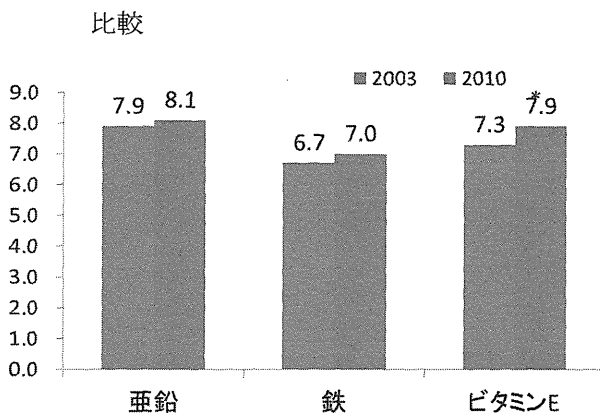
図3 カルシウム、マグネシウム及びコレステロール摂取量の年度別比較



### 4. ミネラルおよびビタミン摂取量の比較

$\beta$ -カロテン摂取量は、2003年(1684 $\mu$ g)に比べて2010年では3130 $\mu$ gと有意な増加を認めた。カルシウム、マグネシウムおよびコレステロール摂取量は有意でないが、2003年に比べ増加傾向を示した。一方対照地区では、 $\beta$ -カロテン摂取量は多発地同様増加を認めたが、カルシウム、マグネシウムおよびコレステロール摂取量はいずれも減少していた(図4)。

図4 ミネラルおよびビタミン摂取量の年度別比較

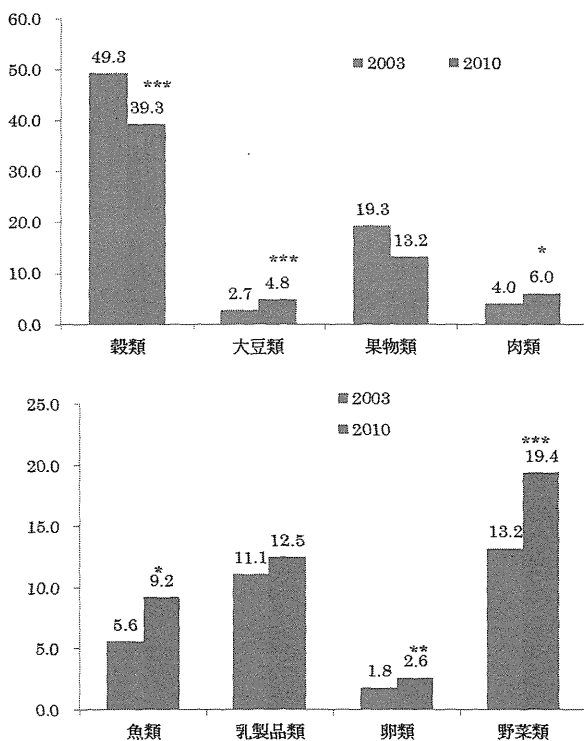


### 5. 食品摂取頻度別比較

2003年に比べ、2010年では穀類と果物類の摂取割合は有意な減少を、肉類、魚類、卵類および野菜類の摂取割合は有意な増加を認めた。

対照地区でも、多発地と同様に穀類摂取割合は有意な減少、肉類、魚類、野菜類の摂取割合は有意な減少を認めた。しかし、乳製品類および卵類の摂取割合は、多発地と異なり有意な減少を認めなかった(図5)。

図5 食品摂取頻度割合の年度別比較



### D. 考察

本研究にて、多発地では2003年と2010年で総エネルギー摂取量に差がないにもかかわらず、栄養摂取状況に差が認められたこと、特に糖質摂取割合および穀類摂取割合の有意な減少、一方脂肪摂取割合、肉類、卵類、乳製品それぞれの摂取割合が有意に増加していた。さらに、β-カロテンは有意な、ビタミンEは有意ではないが増加傾向を認めた。

糖質摂取割合・穀類摂取頻度の減少は高糖質摂取によるフリーラジカルの生成や superoxide や nitric oxide (NO-) の過剰産生の抑制につながる。脂質摂取割合・卵や乳製品摂取頻度の増加は神経髄鞘の保護作用の増強および神経成長因子の効果を高め、神経障害の修復と再生の促進につながる。さらに、亜鉛摂取量や野菜類摂取量の増加は酸化ストレスに対する防御機能の向上と関連するとの報告もある。これらの報告から栄養状態の改善が神経障害の促進を抑制する可能性が推測される。本研究にて、およそ7年ではあるも栄養状況が改善した事実を鑑みると、栄養摂取状況の変化がALS発症頻度の低下に寄与した可能性が示唆されえた。

### E. 結論

本検討で、多発地では2003年と2010年で総エネルギー摂取量に差がないにもかかわらず、栄養摂取状況に差が認められたこと、さらに一部の栄養素及び食品にて対照地区と異なる変化を認めたことは栄養摂取状況の変化がALS発症頻度の低下に寄与した可能性が示唆された。今後、この寄与の蓋然性を検討するためには発症年齢および出生年別の検討を行うことが必要である。

### F. 健康危険情報

特になし

## G.研究発表

### 1. 論文発表

1. Okamoto K, Kihira T, Kondo T, Kobashi G, Washio M, Sasaki S, Yokoyama T, Miyake Y, Sakamoto N, Inaba Y, Nagai M, Nutritional status and risk of amyotrophic lateral sclerosis in Japan, *Amyotroph Lateral Scler.*2007; 8 : 300-304.
2. Kihira T Kanno S, Miwa H, Okamoto K, Kondo T, The role of exogenous risk factors in amyotrophic lateral sclerosis in Wakayama, Japan, *Amyotroph Lateral Scler.* 2007; 8 : 150-156.
3. Okamoto K, Kihira T, Kondo T, Kobashi G, v Washio M, Sasaki S, Yokoyama T, Miyake Y, Sakamoto N, Inaba Y, Nagai M, Fruit and Vegetable Intake and Risk of Amyotrophic Lateral Sclerosis in Japan, *Neuroepi.* 2009; 32 : 251-256.
4. Okamoto K, Kihira T, Kondo T, Kobashi G, Washio M, Sasaki S, Yokoyama T, Miyake Y, Sakamoto N, Inaba Y, Nagai M, Lifestyle Factors and Risk of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Case-Control Study in Japan, *Ann Epidemiol.*2009; 19 : 359-364.

### 2.学会発表

1. 石井英子、藤原奈佳子、岡本和士: ALS 機能評価スケールと骨量計を用いた在宅療養 ALS 患者評価. 日本公衆衛生学会.2012. 山口
2. 石井英子、藤原奈佳子、岡本和士. 在宅療養におけるALS患者の嚥下状況とALS機能評価スケールとの関連、日本疫学会. 2013、大阪.
2. 岡本 和士、紀平為子、小久保康昌、阪本尚正、小橋 元、鷺尾 昌一、三宅 吉博、横山 徹爾、佐々木 敏、稲葉 裕、永井正規. 筋萎縮性側索硬化症発症関連要因解明に関する疫学的研究. 日本疫学会. 2013、大阪.

2. Okamoto K , Kihira T, Was dried fish a trigger of high-incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Kii peninsula, Japan?. 第23回ALS/MND国際シンポジウム. 2013. Chicago.

## H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

### 1.特許取得

なし

### 2.実用新案登録

なし



## 紀伊半島の家族性認知症-パーキンソン症候群における

### 脳内 BMAA の解析

主任研究者 小久保康昌<sup>1)</sup>

研究協力者 Sandra Banack<sup>2)</sup>、森本 悟<sup>3)</sup>、村山繁雄<sup>3)</sup>、富樫辰也<sup>4)</sup>、Walter G. Bradley<sup>5)</sup> Paul Alan Cox<sup>2)</sup>、葛原茂樹<sup>6)</sup>

<sup>1)</sup>三重大学神経内科、<sup>2)</sup> The Institute for Ethnomedicine、<sup>3)</sup> 健康長寿医療センター、<sup>4)</sup> 千葉大学海洋バイオシステム研究センター、<sup>5)</sup>University of Miami School of Medicine  
<sup>6)</sup> 鈴鹿医療科学大学

#### 研究要旨

〔目的〕 グアム島の筋萎縮性側索硬化症/パーキンソン認知症複合 (Guam ALS/PDC) で病因との関連が示唆されている神経毒 BMAA ( $\beta$ -methylamino-L-alanine) について、牟婁病 (Kii ALS/PDC) 脳における存在の有無を検討する。

〔対象と方法〕 対象は、5 例の牟婁病患者凍結脳。(ALS 2 例、PDC 3 例。男性 1 名、女性 4 名。死亡時年齢 60 歳から 77 歳、平均 69.8 歳。罹病期間 3 年から 13 年、平均 7.4 年)、age-matched の非神経疾患 3 例、Common ALS 2 例。方法は、患者脳由来蛋白質の加水分解産物を用いて高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、質量分析計 (LC/MS/MS)、アミノ酸分析器 (AAA) によって BMAA の有無について解析した。なお、本研究は、三重大学医学部倫理委員会で承認を得ている。

〔結果および考察〕 3 種類の解析結果からは、牟婁病 5 例の BMAA について一貫した検出結果は得られなかった。

〔結論〕 グアム島の ALS/PDC では、シアノバクテリアが産生する神経毒である BMAA の持続摂取が発症に関与するという仮説があり、脳内に BMAA の蓄積が報告されている。今回、5 例の牟婁病 (Kii ALS/PDC) 患者脳内で BMAA が検出されなかったことから、少なくとも牟婁病では BMAA が発症に関与は否定的である。

#### A.研究目的

グアム島の筋萎縮性側索硬化症/パーキンソン認知症複合 (Guam ALS/PDC) では、ソテツの根茎に寄生するシアノバクテリアが産生する神経毒である BMAA ( $\beta$ -methylamino-L-alanine) を発症要因とする仮説がある。BMAA は、AMPA/kainite レセプターを介して運動ニューロンに興奮性毒

性を及ぼすとされ、長期に亘る BMAA の摂取が ALS/PDC 発症を引き起こすと想定されている。牟婁病 (Kii ALS/PDC) 脳における BMAA の存在の有無を明らかにすることで、BMAA が紀伊 ALS/PDC の病態に及ぼす影響について検討する。

## B.研究方法

対象は、紀伊 ALS/PDC 5 例（男性 1 名、女性 4 名、平均年齢 69.0 歳、ALS 2 例 PDC3 例、平均罹病期間 7.4 年）と age-matched の非神経疾患 3 例、common ALS 2 例。方法は、患者脳由来蛋白質の加水分解産物を用いて高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、質量分析計（LC/MS/MS）、アミノ酸分析器（AAA）によって BMAA の有無について解析した。

（倫理面への配慮）本研究は、三重大学医学部倫理委員会の承認を得ている。

表 1 対象患者

	Phenotype	Age	Sex	Duration of illness (years)
1 (MH)	ALS	66	F	3
2 (TK)	ALS	70	F	13
3 (NO)	ALS with dementia	77	M	8
4 (MH)	PDC with ALS	60	F	7
5 (IW)	PDC with ALS	72	F	6

## C.研究結果

5 例について、2 回ずつ解析を行った。

表 2 BMAA 結果

BMAA	結果			
	1回目		2回目	
	LC/MS/MS	HPLC	LC/MS/MS	HPLC
1 (MH)	+	+	ND	+
2 (TK)	+	+	ND	+
3 (NO)	+	+	ND	ND
4 (MH)	+	ND	ND	ND
5 (IW)	ND	ND	ND	ND

ND: not detected.

3 種類の検索方法で一定の検出結果を示した症例はなかった。

## D.考察

Spencer らはグアム島住民が蘇鉄の実を持続的に摂取することで、含有される神経毒が ALS/PDC の発症を引き起こすという仮説を報告した。

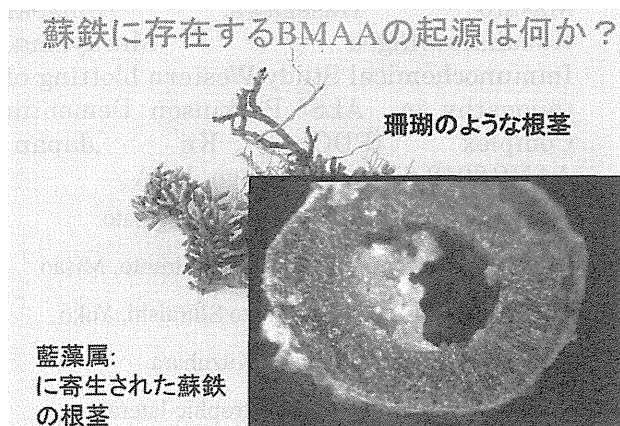
表 3 グアム島の蘇鉄と実の調理法



彼らは、紀伊半島においても奄美大島からもたらされた蘇鉄を食することが、ALS/PDC の原因であると報告しているが、実際には、蘇鉄を食用として用いることはない。また、グアム島での蘇鉄の実の摂取量は、神経毒として想定された摂取量より大幅に少なかったことから、この仮説は一旦下火となった。

Cox らは、蘇鉄の根茎に含まれるシアノバクテリアが産生する神経毒 BMAA が蘇鉄の実、さらには実を食するオオコウモリの体内に蓄積し、オオコウモリを食べるグアム島チャモロ人に ALS/PDC が発症するという、BMAA の bio-magnification 説を提唱した。

表4 蘇鉄の根茎にあるシアノバクテリア



Cox らは、Guam ALS/PDC の凍結脳を用いた解析で protein-bound BMAA 濃度の高値を報告しており、食物連鎖の中で bio-magnification された cyanobacteria 由来の BMAA が神経細胞死を誘発しているとする説を提唱している。

表5 BMAA の bio-magnification



BMAA は、AMPA/kainite レセプターを介して運動ニューロンに興奮毒性を生ずることで神経細胞死を引き起こすという。

表6 Guam ALS/PDC 患者における BMAA 解析結果

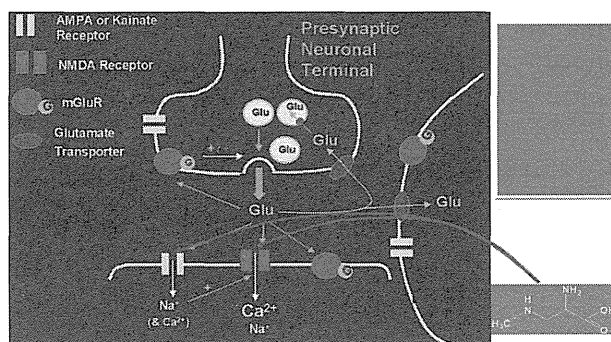
BMAA in Human Neuroproteins

Diagnosis	Protein BMAA	Diagnosis	Protein BMAA	Diagnosis	Protein BMAA
ALS/PDC	1190	Control	ND	AD	220
ALS/PDC	644	Control	ND	AD	264
ALS/PDC	610	Control	ND	AD	26
ALS/PDC	736	Control	ND	AD	38
ALS/PDC	149	Control	ND	AD	53
ALS/PDC	433	Control	ND	AD	ND
Asympt.	82	Control	ND	AD	128
Asympt.	ND	Control	ND	AD	34
		Control	ND	AD	38
		Control	ND		
		Control	ND		
		Control	ND		
		Control	ND		
		Control	ND		
		Control	ND		
		Control	ND		
		Control	ND		
		Control	ND		
		Control	ND		
		Control	ND		

mean = 439  $\mu\text{g/g}$  mean = 89  $\mu\text{g/g}$

Acta Neurologica 110: 267-269

表7 BMAA の神経細胞興奮作用



今回の紀伊 ALS/PDC における結果から、少なくとも BMAA が紀伊 ALS/PDC 脳内に蓄積しているという証拠はなく、BMAA が神経変性疾患の普遍的な原因であるとする説に反する。

### E.結論

紀伊 ALS/PDC (牟婁病) 脳における神経毒 BMAA の解析をおこなった。紀伊 ALS/PDC での BMAA の神経毒説は、否定的である。

### F.健康危険情報

なし。

## G.研究発表

### 1. 論文発表

1. Kokubo Y, Taniguchi A, Hasegawa M, Hayakawa Y, Morimoto S, Yoneda M, Hirokawa Y, Shiraishi T, Saito Y, Murayama S, Kuzuhara S.  $\alpha$ -Synuclein Pathology in Amyotrophic Lateral Sclerosis/Parkinsonism Dementia Complex in the Kii Peninsula, Japan. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2012;71:625-30.

2. Kokubo Y, Nomura Y, Morimoto S, Kuzuhara S. Cardiac (123)I-meta-iodobenzylguanidine scintigraphy in patients with amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia complex of the Kii peninsula, Japan. *Parkinsonism and Related Disorders* 18 (2012) 306–308

3. Naruse H, Takahashi Y, Kihira T, Yoshida S, Kokubo Y, Kuzuhara S, Ishiura H, Amagasa M, Murayama S, Tsuji S, Goto J. Mutational analysis of familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis with OPTN mutations in Japanese population. *Amyotroph Lateral Scler.* 13:562-566, 2012

4. Tameko Kihira, S Yoshida, T Kondo, K Iwai, S Wada, S Morinaga, Y Kazimoto, T Kondo, K Okamoto, Y Kokubo, S Kuzuhara. An increase in ALS incidence on the Kii Peninsula, 1960-2009: A possible link to change in drinking water source. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, 2012; 13: 347-350

5. Kuzuhara S, Kokubo Y. Amyotrophic Lateral Sclerosis/Parkinsonism Dementia Complex in the Kii Peninsula of Japan (Muro disease): a review w on recent research and new concept. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and the frontotemporal dementias.* Oxford University Press, Ed. By Michael J. Strong 2012, pp39-54.

### 2. 学会発表

1. Shigeki Kuzuhara、 Yasumasa Kokubo. Changing patterns of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and parkinsonism-dementia complex (PDC) of the Kii peninsula in Japan. 13th Asian Oceanian Congress of

Neurology.2012.6.4-8. Melbourne, Australia

2. Satoru Morimoto, Yasumasa Kokubo, Masato Hasegawa, Shigeki Kuzuhara, Shigeo Murayama. Immunochemical Study Western blotting of tauopathy in ALS/ Parkinson Dementia Complex (PDC), Kii, Japan. AANP.2012.6.21-24. Chicago, USA

3. Yasumasa Kokubo, Akira Taniguchi, Masato Hasegawa, Yuma Hayakawa, Satoru Morimoto, Misao Yoneda, Yoshihumi Hirokawa, Taizo Shiraishi, Yuko Saito, Shigeo Murayama, Shigeki Kuzuhara. Alfa-Synuclein pathology of amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex in the Kii Peninsula, Japan. The 8<sup>th</sup> International Conference on Frontotemporal dementias, Manchester, UK, 2012.

## H.知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1.特許取得：なし

2.実用新案登録：なし

3.その他：なし

## 紀伊筋萎縮性側索硬化症・パーキンソン認知症複合（ALS/PDC）の 疾患遺伝子の探索

石浦浩之<sup>1)</sup>、三井純<sup>1)</sup>、Budrul Ahsan<sup>1)</sup>、福田陽子<sup>1)</sup>、後藤順<sup>1)</sup>、辻省次<sup>1)</sup>  
小久保康昌<sup>2)</sup>、葛原茂樹<sup>3)</sup>  
日笠幸一郎<sup>4)</sup>、吉村淳<sup>4)</sup>、土井晃一郎<sup>4)</sup>、森下真一<sup>4)</sup>  
原賢寿<sup>5)</sup>、西澤正豊<sup>5)</sup>、桑野良三<sup>5)</sup>  
豊田敦<sup>6)</sup>、藤山秋佐夫<sup>6)</sup>

<sup>1)</sup> 東京大学神経内科、<sup>2)</sup> 三重大学神経内科、<sup>3)</sup> 鈴鹿医療科学大学保健衛生学部、  
<sup>4)</sup> 東京大学新領域創成科学研究科、<sup>5)</sup> 新潟大学脳研究所、<sup>6)</sup> 国立遺伝学研究所

### 研究要旨

新たな家系に関する情報をもとに、連鎖解析を update した。また、大家系に属する 2 名の全ゲノム配列解析を追加で施行した。本疾患の遺伝学的な特性を考慮に入れた連鎖解析と、全ゲノム配列解析の結果から、ALS/PDC の発症にかかわる遺伝子の同定を引き続き試みていく。

### A. 研究目的

紀伊 ALS/PDC は、運動ニューロン症状に加えパーキンソニズム、認知症を伴い、病理学的に広範な tau の沈着を認める特徴的な疾患である。家族集積性が認められ、遺伝学的素因が強く発症に関わると推定される。現在まで多数の発症者を認める大家系の存在が知られているが、遺伝形式の点からは常染色体優性遺伝が示唆されるものの不完全浸透の可能性があること、さらには、近親婚が多く含まれていることから、常染色体劣性遺伝の可能性も排除できないことなど、遺伝形式が必ずしも明確でない。さらに、高齢発症であり、他の原因による類似疾患の混入（phenocopy）の存在を完全には除外できず、単一遺伝子疾患にもとづくパラメトリック連鎖解析で結論を得ることが困難であった。また、大家系に属する剖検例 2 例に加えて、大家系には属していないが、病理

学的に診断が確定した症例 5 例の合計 7 例について全ゲノム配列解析を行ったものの、全例に共通する新規非同義置換は認めていない。

本年は、多発大家系に着目し、連鎖解析の進め方についての再検討を行うとともに、本家系に属する 2 名の発症者についてさらに全ゲノム配列解析を追加した。

### B. 研究方法

大家系（発症者 9 名、非発症者 25 名）については以前の研究でマイクロサテライトマーカーを用いて遺伝子型が決定されている。パラメトリック二点解析（浸透率 90% の不完全浸透優性遺伝モデル、disease allele frequency 1%、phenocopy 3%）を行った。さらに、本疾患の遺伝子座の絞り込みを進める上で最適と考えられる連鎖解析のアプローチについて検討をした。

また、本家系に属する 2 名の末梢血由来の

genomic DNA について、HiSeq2000 (Illumina) を用いて全ゲノム配列解析を行った。

#### (倫理面への配慮)

東京大学、三重大学において倫理申請を行い承認された研究である。

### C. 研究結果

大家系に属する 2 名の married-in の発症者に関して姉妹であるという知見が得られ、連鎖解析を計算しなおし、いくつか LOD スコアが上昇したり下降したりするマーカーを見出した。また、affected-persons-only method を用いた解析では、新たに LOD スコアが 2.8 となるマーカーを認め、さらなる確認を行う必要があると考えられた。

追加で施行された 2 名の全ゲノム配列解析については、シーケンスは終了し、現在情報解析を行っている。

### D. 考察

家系構造に関する追加データにより、連鎖解析を update した。しかしながら、パラメトリック連鎖解析では、phenocopy や低浸透、genetic heterogeneity の影響を強く受けるため、結果の解釈については慎重になるべきであり、確認を行っていく必要があると考えられた。

同一家系に属する発症者については共通する variant を持つ可能性が高いと考えられるため、大家系の発症者 2 名について全ゲノム配列解析を追加した。これにより、疾患に関連した variant をできる可能性があると考えている。通常の一塩基置換などでは結論がつかない可能性もあり、structural variant や repeat expansion など、次世代シーケンサーで検出困難な variant の検出も積極的に検討していく必要があると考えられる。

### E. 結論

本疾患の遺伝学的な特性を考慮に入れた連鎖解析と全ゲノム配列解析を行うことで、引き続き ALS/PDC の発症にかかわる遺伝因子を探索する。

### F. 健康危険情報

特になし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Ishiura H, Takahashi Y, Mitsui J, Yoshida S, Kihira T, Kokubo Y, Kuzuhara S, Ranum LP, Tamaoki T, Ichikawa Y, Date H, Goto J, Tsuji S. C9ORF72 repeat expansion in amyotrophic lateral sclerosis in the Kii peninsula of Japan. *Arch Neurol* 2012;69:1154-8.

Majounie E, Renton AE, Mok K, Dopper EG, Waite A, Rollinson S, Chiò A, Restagno G, Nicolaou N, Simon-Sanchez J, van Swieten JC, Abramzon Y, Johnson JO, Sendtner M, Pamphlett R, Orrell RW, Mead S, Sidle KC, Houlden H, Rohrer JD, Morrison KE, Pall H, Talbot K, Ansorge O; Chromosome 9-ALS/FTD Consortium; French research network on FTL D/FTLD/ALS; ITALSGEN Consortium, Hernandez DG, Arepalli S, Sabatelli M, Mora G, Corbo M, Giannini F, Calvo A, Englund E, Borghero G, Floris GL, Remes AM, Laaksovirta H, McCluskey L, Trojanowski JQ, Van Deerlin VM, Schellenberg GD, Nalls MA, Drory VE, Lu CS, Yeh TH, Ishiura H, Takahashi Y, Tsuji S, Le Ber I, Brice A, Drepper C, Williams N, Kirby J, Shaw P, Hardy J, Tienari PJ, Heutink P, Morris HR, Pickering-Brown S, Traynor BJ. Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study. *Lancet Neurol* 2012;11:323-30.

Naruse H, Takahashi Y, Kihira T, Yoshida S, Kokubo Y, Kuzuhara S, Ishiura H, Amagasa M, Murayama S, Tsuji S, Goto J. Mutational analysis of familial and sporadic amyotrophic

lateral sclerosis with OPTN mutations in Japanese population. *Amyotroph Lateral Scler* 2012;13:562-6.

## 2.学会発表

石浦浩之、小久保康昌、三井純、福田陽子、日笠幸一郎、吉村淳、斉藤太郎、森下真一、豊田敦、原賢寿、西澤正豊、葛原茂樹、後藤順、辻省次。紀伊筋萎縮性側索硬化症・パーキンソニズム認知症複合（ALS/PDC）の全ゲノム配列解析による疾患遺伝子の探索。日本神経学会学術大会、2012年5月、東京。

## H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

### 1.特許取得

特になし

### 2.実用新案登録

特になし

### 3.その他

特になし

## エピゲノム解析を通じた三重県南部に多発する家族性認知症-パーキンソン 症候群の病態解析

岩田 淳<sup>1)</sup>

1) 東京大学医学部附属病院 分子脳病態科学

### 研究要旨

Kii-ALS-PDC の表現形のバリエーションとして筋萎縮性側索硬化症(ALS), パーキンソン・認知症複合(PDC)に大別される。同一化系内は時代の変遷と共に ALS の表現形が減少し, PDC の表現形が残存する傾向にある。その原因は食生活や就労形態などの生活スタイルの変化などにあると想定されているが, 未だ不明である。我々は, その分子病態的バックグラウンドにエピゲノム変化があると考え, 死後脳を使用して解析を行い, 特異的な変化を同定した。

### A.研究目的

三重県南部に多発する家族性認知症-パーキンソン症候群の病態解明を目的とし, エピゲノム解析からのアプローチにより表現形の違いとエピゲノム情報との関連の有無について検討する。ゲノム DNA の CpG メチル化は当該遺伝子の発現に影響を及ぼす事が知られている。本疾患が家系内においてパーキンソニズム(PDC), 筋萎縮性側索硬化症(ALS)といった表現形が異なる事が知られている。特に, 時代の変遷によって ALS の表現形が減少し, PDC の表現形が残るようになっており, その原因としてエピゲノム情報の変化を想定した。

を正常対照として使用した。選定した遺伝子としては MAPT, GSK3B, APP, SNCA であり, 三重県南部に多発する家族性認知症-パーキンソン症候群と病理学的に類似性のある神経変性疾患の関連遺伝子とした。それぞれの遺伝子で解析する CpG アイランドについてはアルツハイマー病, パーキンソン病などで我々が異常を同定した部位に設定した。メチル化率は bisulfite 変換後の PCR を使用した pyrosequencing 法によって測定した。

(倫理面への配慮)

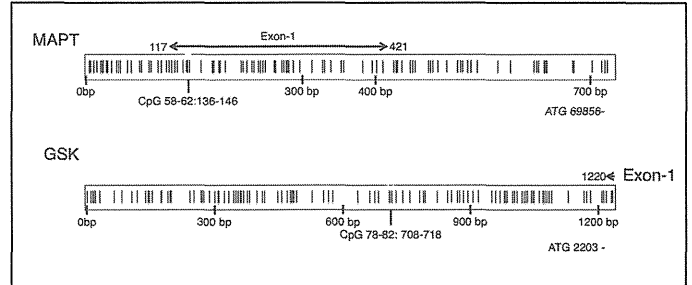
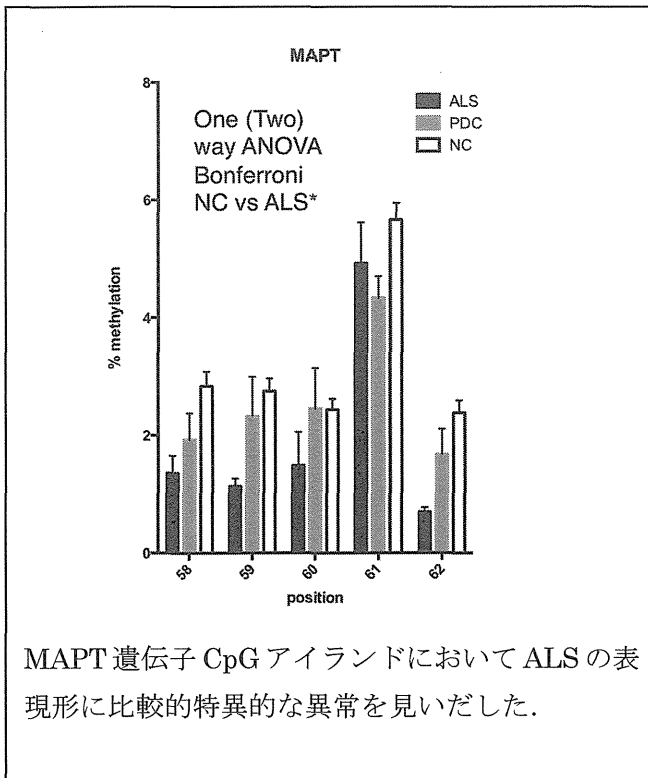
東京大学大学院医学系研究科での倫理委員会許可を受けた上で解析を行った。

### B.研究方法

ゲノム DNA の CpG アイランドのメチル化について特定の遺伝子について検討した。対象は 16 例でそのうち PDC は 8 例, ALS は 8 例。脳の部位としては側頭葉 14, 頭頂葉 3, 小脳 1 であった。我々が所有する側頭葉 88, 頭頂葉 90, 小脳 78 例



### C.研究結果



異常を認める CpG の位置としては MAPT が非翻訳領域 exon1 の 5'側, GSK が exon-1 の上流であった。

### D.考察

MAPT, GSK 遺伝子においてそれぞれ 1箇所ずつ正常対照と比べて ALS もしくは PDC の表現形間で有意差の見られる CpG を同定した。

特に MAPT 遺伝子での異常は連続する CpG において共通しており, 遺伝子発現変化に与える影響が強いことが想定される。

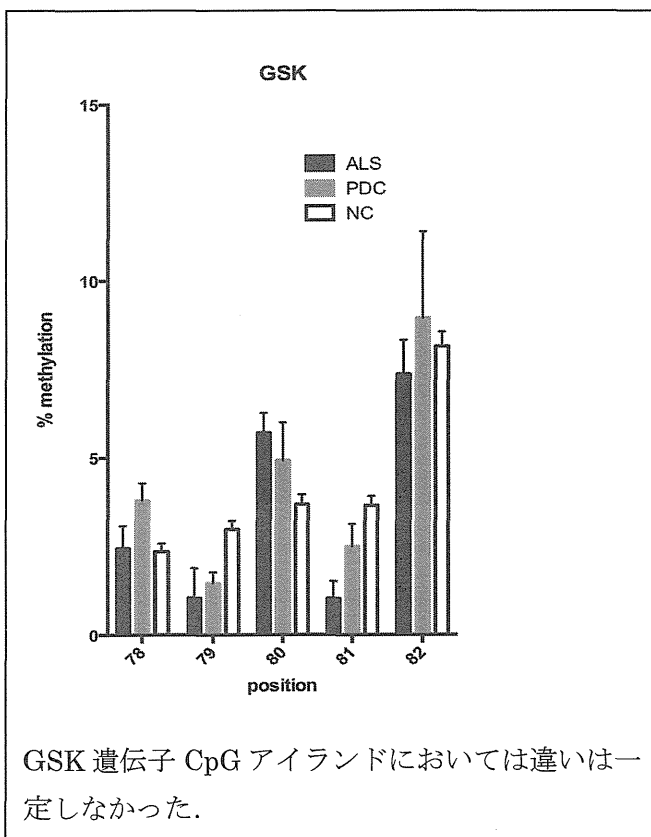
別途行っている解析では, 同部位の CpG メチル化低下は下流遺伝子の発現を増加させる可能性が示唆されており, ALS の表現形において MAPT の発現亢進が想定される。

### E.結論

MAPT 遺伝子の CpG アイランドにおいて ALS の表現形と PDC の表現形で正常コントロールの比較においてメチル化に違いを認める部位を同定した。

### F.健康危険情報

なし



G.研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

1.特許取得

なし

3. 実用新案登録

なし

3.その他

## 紀伊半島の筋萎縮性側索硬化症/パーキンソン認知症複合

### (Kii ALS/PDC、牟婁病) における小脳の免疫組織化学的検討

森本 悟 1)、初田 裕幸 1)、小久保 康昌 2)、葛原 茂樹 3)、村山 繁雄 1)

- 1) 東京都健康長寿医療センター 高齢者ブレインバンク
- 2) 三重大学医学部神経内科
- 3) 鈴鹿医療科学大学保健衛生学部

#### 研究要旨

2012年、石浦らによって古座川流域のALS例の一部にC9orf72遺伝子変異が報告され、小脳病変が注目されている。したがって今回、紀伊半島の筋萎縮性側索硬化症/パーキンソン認知症複合(Kii ALS/PDC、牟婁病)におけるtauopathyの広がり、並びに小脳病変を詳細に検討し、ubiquitin, p62及びubiquilin 2蛋白についても併せて検討を行った。結果、全例にtorpedoとgrumose変性を認め、8例(80%)には多核或いは異常局在を示すPurkinje cellsを見いだした。リン酸化タウ陽性構造物は、白質及び歯状核には全例、プルキンエ細胞には5例(50%)に存在した。また、この5例はPDCの表現型を有し、ALS単独例に比して病変が強い傾向があり、Bergmann gliaやgolgi cellにリン酸化タウの蓄積を認め、分布の多様性を示した。小脳症状は認めなかった。ubiquitin, p62, ubiquilin 2に対する免疫染色は全例で陰性であった。Kii ALS/PDC患者小脳での広範なAT-8陽性所見の分布を確認し、これまでに一部の進行性核上性麻痺症例にのみ報告のあるPurkinje cellsにおけるリン酸化タウの蓄積を認めた。また、多彩なグリア病変も合わせて存在することを確認した。

#### A.研究目的

紀伊半島の筋萎縮性側索硬化症/パーキンソン認知症複合(Kii ALS/PDC、牟婁病)は、中枢神経系へのリン酸化タウの集積を特徴とする疾患である。また、2012年に古座川流域のALS例の一部にC9ORF72遺伝子変異が見つかり、小脳病変が注目されている。三室らによる小脳のリン酸化タウ病変の報告はあるものの、詳細な検討はなされていない。したがって、Kii ALS/PDCにおけるtauopathyの広がり、並びに小脳病変を詳細に検討した。また、ubiquitin, p62及びubiquilin 2蛋白についても併せて検討を行った。

#### B.研究方法

穂原地区のKii ALS/PDC 10連続剖検例の小脳を用いて、ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックより、6 $\mu$ m/9 $\mu$ m厚の切片を作成し、通常染色(H.E. K.B.染色)、特殊染色(Gallyas-Braak鍍銀染色)に加え、以下の各種抗体を用いて自動免疫染色装置Ventanaを用いて免疫染色を施行し

た。一部はPser242とcalbindinとの蛍光二重染色を施行した。〈使用抗体〉リン酸化(p)-tau(AT-8, Pser242)、ubiquitin、p62、ubiquilin 2、calbindin

(倫理面への配慮)

ご遺族の剖検同意に基づき、高齢者ブレインバンク倫理規定に沿って研究を施行した。

#### C.研究結果

全例にtorpedoとgrumose変性を認め、8例(80%)には多核或いは異常局在を示すPurkinje cellsを見いだした。リン酸化タウ陽性構造物は、白質及び歯状核には全例、プルキンエ細胞には5例(50%)に存在した。この5例はPDCの表現型を有し、ALS単独例に比して病変が強い傾向があり、Bergmann gliaやgolgi cellにリン酸化タウの蓄積を認め、分布の多様性を示した。小脳症状は認めなかった。ubiquitin, p62, ubiquilin 2に対する免疫染色は全例で陰性であった。

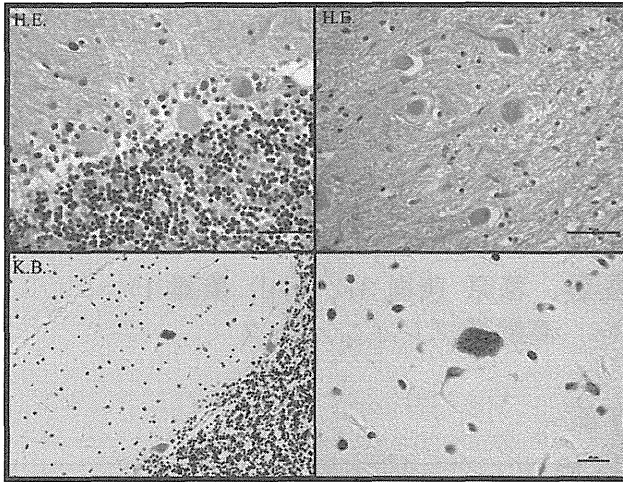


図1. プルキンエ細胞層における torpedo、歯状核におけるグルモース変性、及び分子層における多核かつ異所性のプルキンエ細胞を認める。

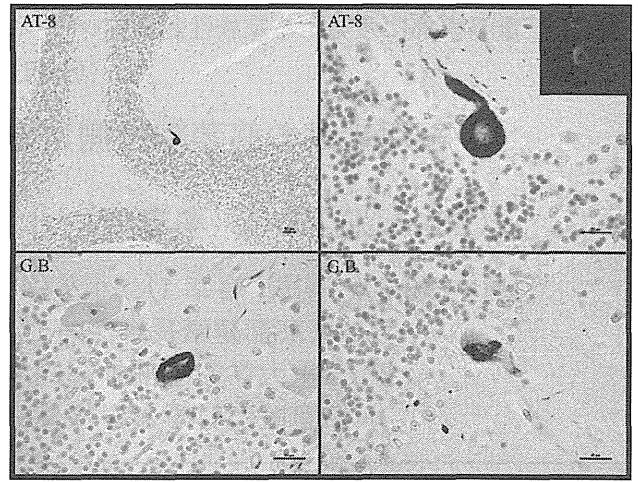


図3. プルキンエ細胞内に銀染色、AT-8 陽性の顆粒状、線維状ないしはそれらが凝集した構造物を認め、突起にまで及んでいる。Calbindin と Pser242 との蛍光2重染色にてプルキンエ細胞内のリン酸化タウの蓄積が確認された。

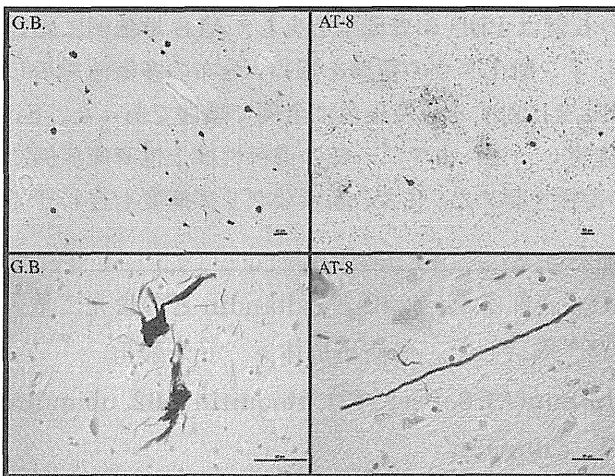


図2. 歯状核において、多数の NFT (或いは pre-tangle)、coiled body を認め、AT-8 では neuropil threads, long neurite を散見する。

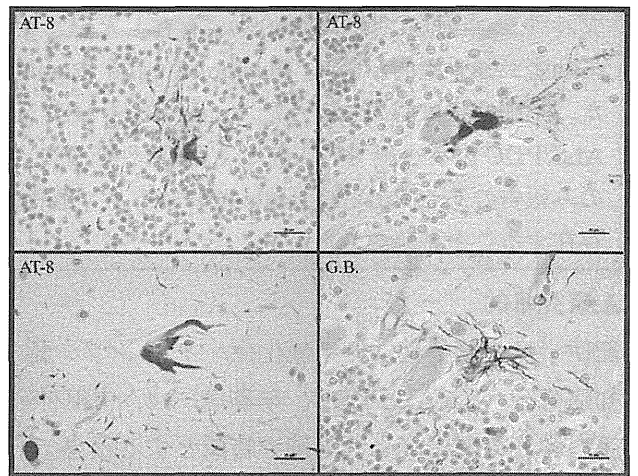


図4. AT-8 による染色では、顆粒層に astrocyte の突起と思われる構造物、プルキンエ細胞を取り囲む glia、あるいは bergmann glia、更には golgi 細胞にも陽性所見を認める。

Case/P	Age	Sex	DOF (year)	Phenotype			Types of degeneration				P-tau pathology					
				A	P	D	Dislocation of PCs	Multinucleus of PCs	Torpedo	Grumose degeneration	Cortex		WM		DN	
											PCs	ML	GL	L	D	
Case 1	63	F	4	+	-	-	+	-	+	+	-	+	±	+	-	+
Case 2	70	F	13	+	-	-	+	-	+	+	-	-	±	-	±	±
Case 3	70	F	10	+	-	-	-	-	+	+	-	±	-	+	±	-
Case 4	77	M	7	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Case 5	65	M	3	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Case 6	76	F	6	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
Case 7	70	F	12	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+
Case 8	60	F	8	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Case 9	75	M	7	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	±	-
Case 10	70	F	11	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Positive rate							80%	60%	100%	100%	50%	90%	80%	90%	100%	100%

表1. 染色結果のまとめ

torpedo、grumose 変性を全例に認め、プルキンエの位置異常は 80%、多核形成は 60%に認める。また、リン酸化タウについては、プルキンエ細胞に 50%、分子層に 90%、顆粒層に 80%、小葉間白質には 90%、深部白質には 100%、並びに歯状核に陽性構造物を認めた。