

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

(平成 25 年度研究報告)

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)
植村 直子 (国立病院機構徳島病院理学療法部)
中林 依未 (国立病院機構徳島病院看護部)
安原真理子 (国立病院機構徳島病院看護部)
原 万美子 (国立病院機構徳島病院看護部)
芦和かおり (国立病院機構徳島病院看護部)
上田 裕子 (国立病院機構徳島病院看護部)
佐藤 裕美 (国立病院機構徳島病院看護部)
斎藤 泰憲 (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 (一般名は clioquinol) 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 30 人、男性 10 人、女性 20 人 (平均年齢はそれぞれ 78 歳、81 歳) であった。集団検診 (21 人)、在宅訪問検診 (6 人)、徳島病院外来 (2 人)、そして入院 (1 名) であった。本年度の検診を受けられた方の Barthel index はほぼ昨年度と同等であり、ADL の悪化が見られないことが確認できた。Clioquinol の神経細胞障害機序を活性酸素種の観点から、培養神経細胞株 SH-SY5Y をもちいて解析した。Clioquinol によって誘導された SH-SY5Y 細胞の細胞死は caspase 3 活性の増加を伴っていた。Clioquinol を添加すると、ウシ赤血球精製 SOD1 と SH-SY5Y 細胞の細胞質分画の SOD1 活性は濃度依存性に低下した。また、clioquinol 存在下で培養された SH-SY5Y 細胞では、細胞質 SOD1 活性の低下を認めた。すなわち、SH-SY5Y 細胞では clioquinol が SOD1 活性を直接阻害することが判明した。ウシ赤血球精製 SOD1 を同時に添加することによって、clioquinol によって誘導された SH-SY5Y 細胞の細胞死と活性酸素種の産生亢進のいずれもが抑制された。以上の結果から、clioquinol の神経細胞毒性には活性酸素種の産生亢進が関与し、その活性酸素種産生は clioquinol による SOD1 活性阻害によってもたらされ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 25 年度の検診の結果を調査する。また、キノホルム (一般名は clioquinol) 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。集団検診は例年通り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。

キノホルムの培養神経細胞に対する毒性機序の検討：
 ① Clioquinol 50 μ M 存在下で培養神経細胞株 SH-SY5Y を8時間培養し、caspase 3 活性を EnzChek[®] Caspase-3 assay kit #2 (Molecular Probes, OR, USA) を用いて測定した。
 ② ウシ赤血球精製 SOD1 1 unit あるいは SH-SY5Y 細胞の細胞質分画に clioquinol を直接添加した後、cytochrome C 法を用いて SOD1 活性を測定した。Clioquinol 50 μ M 存在下で20時間培養した SH-SY5Y 細胞から調整した細胞質分画の SOD1 活性を cytochrome C 法を用いて測定した。Diethylthiocarbamate (DDC) 100 μ M 存在下で同時間培養した SH-SY5Y 細胞の細胞質分画 SOD1 活性を陽性コントロールとした。
 ③ SH-SY5Y 細胞に clioquinol とウシ赤血球精製 SOD1 を同時に添加・培養したのち、SH-SY5Y 細胞の cell viability と細胞質内活性酸素種を CellQuanti-Blue Cell Viability Assay Kit (BioAssay Systems, CA, USA), Cell Meter[™] Fluorimetric Intracellular Total ROS Activity Assay Kit (AAT Bioquest, CA, USA) を用いて測定した。

C. 研究結果

検診：平成25年度の検診者数は30人、男性10人、女性20人（平均年齢はそれぞれ78歳、81歳）であった。集団検診（21人）、在宅訪問検診（6人）、徳島病院外来（2人）そして入院（1名）であった（図1）。平成24年、25年度と二年続けて検診を受けた29名の検診者では、Barthel index は18名で不変、1名で増加、10名で低下していた。増加した1名と低下した

検診受診者（合計）

	人数		平均	発症年齢	平均	罹病期間	平均
男	10	74~89	78	28~45	33	44~49	46
女	20	67~96	81	18~51	36	43~49	45
計	30	67~96	80	18~51	35	43~49	45

検診内訳

	男	女	計	平均年齢
集団検診	9	12	21	79
訪問検診	1	5	6	89
病院外来	0	2	2	64
入院	0	1	1	81

図1 平成25年度の検診受診者の内訳

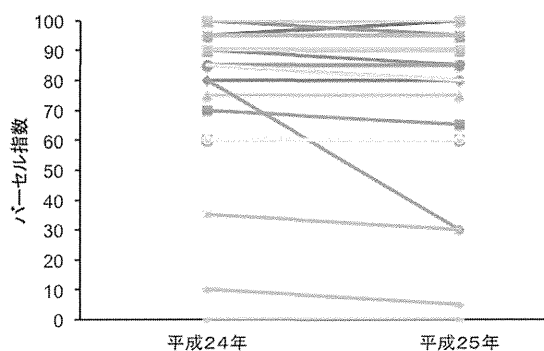


図2 日常生活動作における障害度の変化

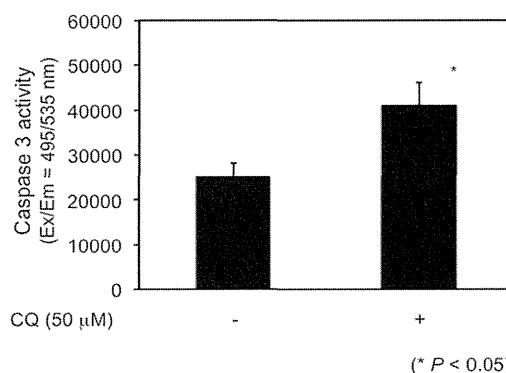


図3 Clioquinol 50 μ M を添加8時間後の SH-SY5Y 細胞の caspase 3 活性

10名のうちの9名は5点の増減であった。低下を示した検診者の1名は、Barthel index が80点から30点に低下した。転倒による腰椎圧迫骨折が原因であった。

キノホルムの培養神経細胞に対する毒性機序の検討：
 ① Clioquinol 50 μ M を添加8時間後、caspase 3 活性は有意に増加した（図3）。
 ② ウシ赤血球精製 SOD1 と SH-SY5Y 細胞質分画の SOD1 活性は、ともに、直接添加された clioquinol の濃度依存性に低下した（図

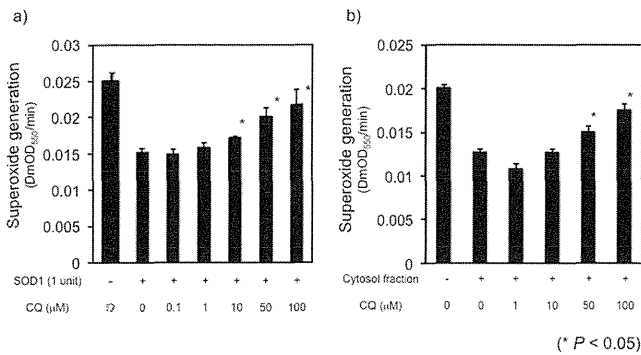


図4 Clioquinolを添加後のSOD1活性 [a] ウシ赤血球精製SOD1、b) SH-SY5Y細胞質分画

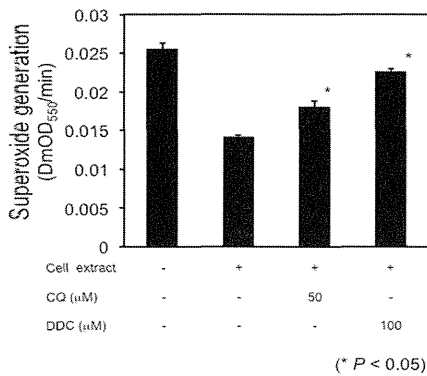


図5 clioquinol 50 μMを添加20時間後のSH-SY5Y細胞の細胞質SOD活性

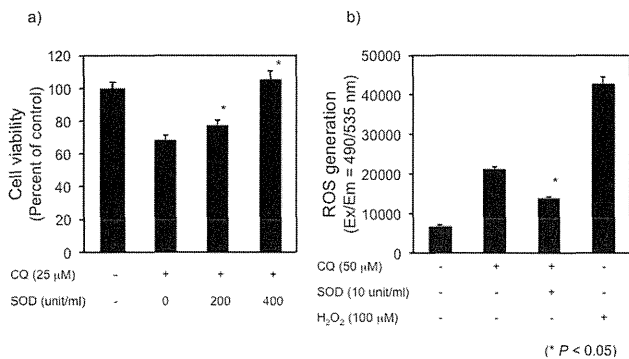


図6 Clioquinolとウシ赤血球精製SOD1を同時に添加・培養後のSH-SY5Y細胞のcell viability (a)と活性酸素種産生 (b)

4)。Clioquinol 50 μMの存在下で20時間培養されたSH-SY5Y細胞の細胞質SOD1活性は有意に低下していた(図5)。③ウシ赤血球精製SOD1をclioquinolと同時に添加することで、非添加群と比較して、cell viabilityは有意に増加し、細胞質内活性酸素種は低下した(図6)。

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43年が経過する。徳島県下におけるスモン症例の罹病期間は平均45年、受診者の平均年齢は80歳である。平成24年と平成25年度の比較では、多くの方(29名中28名)でBarthel indexの変動は5点以下であり、日常生活動作における障害度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た方では、転倒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が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を可溶化することから、その治療薬としても注目されている。

我々は「clioquinolはSOD1活性を阻害することによって神経細胞毒性を発揮するのではないか?」との仮説をたて、clioquinolの神経細胞障害機序を活性酸素種の観点から解析している。昨年度は、①Clioquinolは濃度依存性にSH-SY5Y細胞の細胞死を誘導すること、②Clioquinolによって誘導された細胞死は活性酸素種の産生亢進を伴っていることを報告した。本年度は、これらの結果より生じた「clioquinolはアポトーシスを誘導するのか」、「活性酸素種の産生亢進は神経細胞死の原因となりうるのか、あるいは結果であるのか」という新たな疑問に対する答えを導くために研究を進めた。まず、clioquinol存在下でSH-SY5Y細胞のcaspase 3活性が増加したことから、clioquinolによって誘導された細胞死はアポトーシスであることが判明した。次に、clioquinolを添加すると、ウシ赤血球精製SOD1とSH-SY5Y細胞の細胞質分画のSOD1活性はともに濃度依存性に低下した。Clioquinol存在下で培養されたSH-SY5Y細胞においても、細胞質SOD1活性は低下した。すなわち、clioquinolがSOD1活性を直接阻害することと、その阻害が培養細胞で実際におこっていることが示唆された。最後に、ウシ赤血球

精製 SOD1 を同時に添加することで、clioquinol によって誘導される SH-SY5Y 細胞の細胞死と活性酸素種の産生亢進がともに抑制されたことから、clioquinol による SOD1 活性の阻害が神経細胞死の原因であることが判明した。

E. 結論

1. 平成 25 年度の検診者数は合計 30 人で、平成 24 年度に比べ 7 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。
2. 培養神経細胞 SH-SY5Y 細胞に対して、キノホルムは活性酸素種の産生を増大させることで細胞障害をきたすことが示唆された。その機序として、キノホルムによる SOD 活性の抑制が関与していると考えられた。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Clioquinol の神経細胞に対する傷害作用 (1)

(平成 25 年度研究報告)

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

ニワトリ後根神経節の初代培養神経細胞で clioquinol の細胞傷害作用を検討した。20 μ M 程度の濃度での clioquinol での細胞死が確認された。これまでの検討に一致し、clioquinol の細胞傷害濃度は、培養細胞レベルでは細胞の種類によらないことが推定された。

A. 研究目的

これまで、Clioquinol はどのような培養細胞においても、20 μ M 以上で細胞傷害をきたすことを報告してきた。体細胞由来、神経細胞由来でほぼ同様の、細胞傷害濃度を示した。

今回は、神経細胞に対する傷害を、初代培養神経細胞で確認することを試みた。

B. 研究方法

受精鶏卵 17 日胚から後根神経節を取り出した。卵殻を消毒し、断頭後に腰仙部を切り出し、初め腹側から腎臓基質をのぞき腰髄神経を露出させた。ついで脊椎体を切除して脊髄膨大部も除き、後根神経節が椎弓に付着したまま切離した。椎弓を除いたのち (図 1)、0.5% トリプシンにいれ、30 分 37°C でインキュベートした。1 ml の Daigo T 培養液 20% ウシ胎子血清で細胞分離した。1 ml ピペットで 10 往復とした。培養液 6 ml に浮遊させ、Matrigel (Corning) で処理したカバーガラス底のプレートに散布した。100/mm² 程度の濃度とした。神経細胞体は大型で容易に神経節の間質細胞と見分けがつけられる。(図 2) GIT/20% FBS の培養液で 5% 炭酸ガスインキュベータで培養した。

C. 研究結果

24 時間後には神経細胞の一部から突起がでて軸索様となる。さらに 24 時間培養し (図 3、図 4)、これに対し、1, 5, 10, 15, 20, 35, 50 μ M の clioquinol in

DMSO を添加した。1 日、2 日、4 日後に培養液をフェノールレッド不含 DaigoT 培地にかえ観察すると、1–35 μ M の clioquinol 濃度のいずれでも神経細胞とその突起が見られたが 50 μ M では明らかでなかった (図 5)。細胞密度は 20 μ M 以上で明らかな減少が見られた。

連続的に clioquinol 50 μ M で神経細胞の変化を観察した。成長円錐では filopodia の剥離傾向が見られた (図 6)。神経細胞死はわずかに見られ、軸索は局所に腫大しやがて分断した。神経細胞体は空胞化した。

E. 結論

ニワトリ後根神経節の初代培養神経細胞で、20 μ M 程度の濃度での clioquinol での細胞死が確認された。これまでの検討に一致し、clioquinol の細胞傷害濃度は、培養細胞レベルでは細胞の種類によらないことが推定された。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

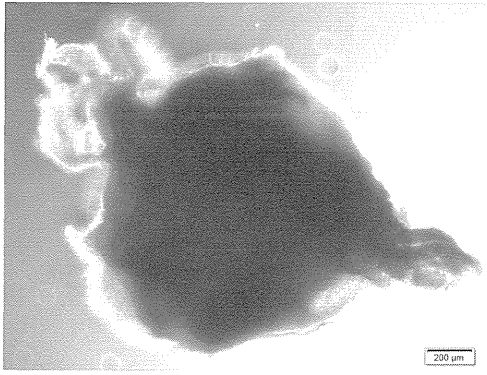


図1 後根神経節

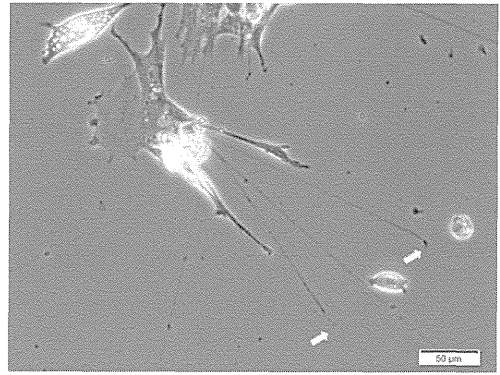


図4 成長円錐 (矢印)

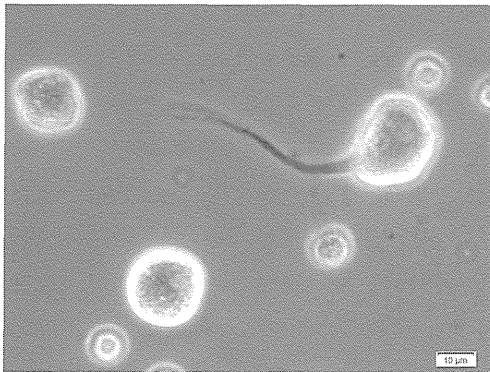


図2 分離神経細胞

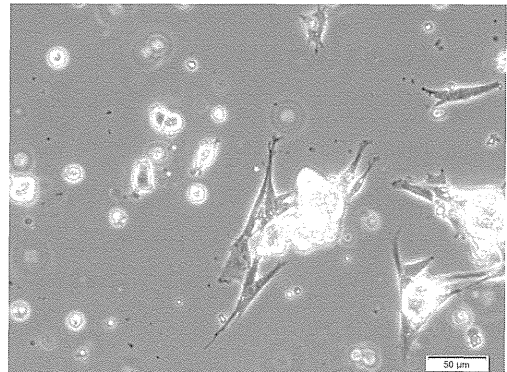


図5 Clioquinol 50 μM、2日後

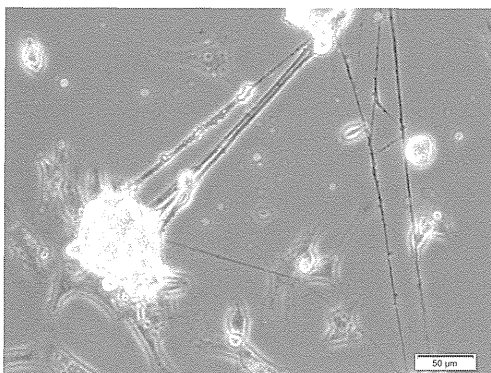


図3 培養神経細胞体と軸索

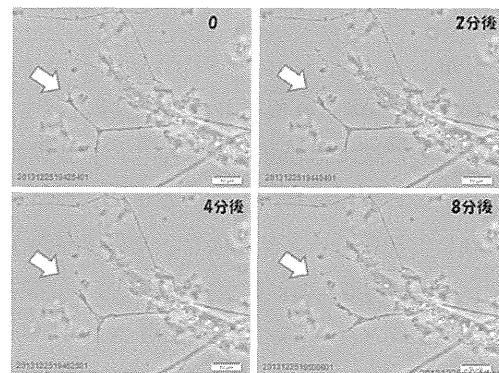


図6 成長円錐の崩壊

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

(平成 24 年度研究報告)

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^{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。

キノホルムの細胞毒性については、酸化ストレス⁽¹⁾、20S プロテアソームの阻害⁽²⁾、cytoplasmic clearance of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) の発現誘導⁽³⁾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⁽⁴⁾。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⁽⁵⁾。

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⁽⁶⁾、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⁽⁷⁾、キノホルムが神経毒性を示すか神

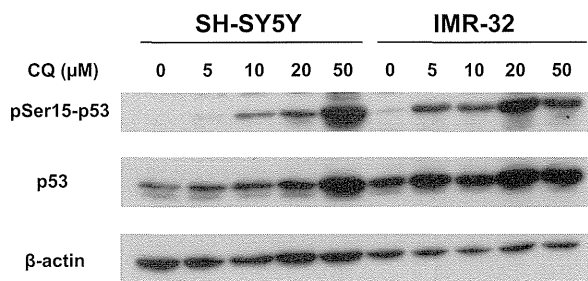


図1 キノホルムによるp53のSer15のリン酸化

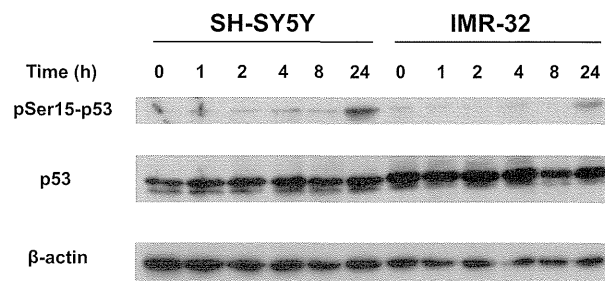


図2 キノホルムによるp53のSer15のリン酸化

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^{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。

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 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。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、 β -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 (γ 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^{Cip1} と GADD45 α 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 μ M 以上で、IMR-32 細胞では5 μ 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 μ M、IMR-32 細胞では10 μ 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 μ M、IMR-32 細胞では10 μ 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、

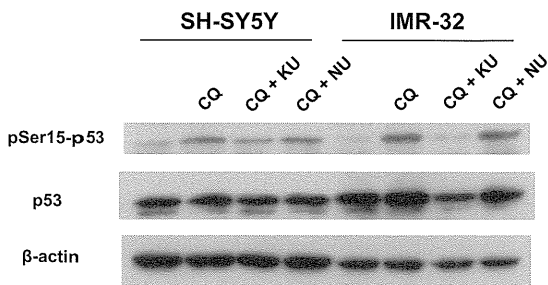


図3 ATM阻害剤によるp53のSer15のリン酸化の抑制

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⁽⁸⁾。また 1.5 g の単回経口

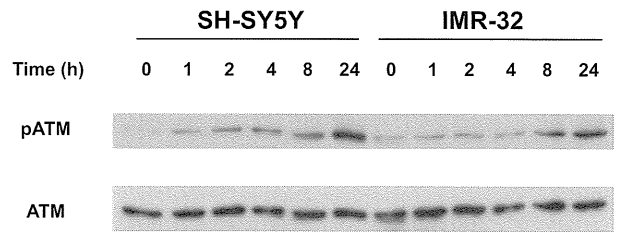


図4 キノホルムによる ATM のリン酸化

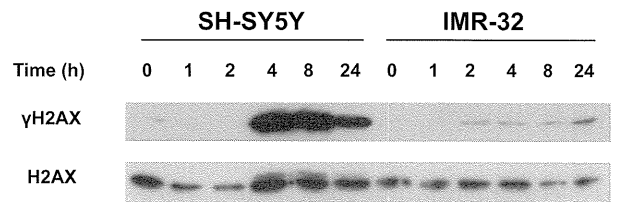


図5 キノホルムによるヒストン H2AX のリン酸化

投与で 4 時間後に約 20 μg/ml (65 μM) 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 μg/ml (98 μM) の血中濃度に達することが報告されており⁽⁹⁾、本研究で用いたキノホルムの濃度 (10 μM~20 μM) 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⁽¹⁰⁾。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⁽¹¹⁾、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) Benvenuti-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.

キノホルムによる神経ペプチド前駆体 VGF の発現誘導

(平成 25 年度研究報告)

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、痛み反応に関与することが知られる神経ペプチド前駆体 VGF 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 VGF の発現誘導機構を解析した。

ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞および IMR-32 細胞を定法により培養した。ヒト VGF 遺伝子のプロモーター領域を単離し、ルシフェラーゼアッセイによりプロモーター活性を測定した。ウエスタンブロット法により転写因子の発現を、ゲルシフトアッセイにより転写因子の結合を検出した。また siRNA の導入により転写因子の発現を抑制し、定量 PCR により mRNA 量を測定した。

SH-SY5Y 細胞および IMR-32 細胞において、キノホルムは VGF mRNA の発現量を増加させた。VGF 遺伝子の転写開始点の約 1370 塩基上流に存在する AP-1 サイトがキノホルムによる転写活性化に重要であった。キノホルムは AP-1 転写因子の c-Fos と c-Jun の発現を誘導した。ゲルシフトアッセイにおいて、c-Fos と c-Jun は VGF 遺伝子の AP-1 サイトに結合した。RNA 干渉により c-Fos の発現を抑制すると、キノホルムによる VGF mRNA の発現誘導は有意に抑制された。

以上のことから、キノホルムは転写因子 c-Fos の発現誘導を介して神経ペプチド前駆体 VGF の発現を誘導することが明らかとなった。

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。

一方近年海外において、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。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は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を明らかにした¹⁾。

スモン患者では痛覚過敏や異痛が認められるが、マウスへのキノホルムの局所投与により、TRPA1 の活性化を介して機械的痛覚過敏や冷感異痛が起こることが報告されている²⁾。我々は網羅的解析によって、痛み反応に関与する神経ペプチド前駆体 VGF がキノホルムにより発現上昇することを見出した。そこで本研究では、キノホルムによる VGF の発現誘導のメカニズムを解析した。

B. 研究方法

【定量 PCR】

キノホルム存在下で 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ックロジーズ社の 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。

【ルシフェラーゼアッセイ】

SH-SY5Y 細胞から VGF 遺伝子のプロモーター領域を PCR により単離し、ルシフェラーゼベクター pNL1.2 (プロメガ社) に組み込んだ。24 ウェルプレートで培養した SH-SY5Y 細胞に TransIT-LT1 試薬 (Mirus 社) を用いてベクターと導入効率補正用ベクター pGL4.23 を導入し、24 時間後にキノホルムを添加してさらに 24 時間培養した。細胞抽出液を NanoGlo 試薬と OneGlo 試薬 (プロメガ社) と反応させ、転写活性を発光測定器で測定した。

【ウエスタンブロット】

細胞から総蛋白を抽出し、定法により SDS-PAGE とウエスタンブロットを行った。c-Jun と c-Fos を検出した後 strip を行い、 β -actin の検出を行った。

【ゲルシフトアッセイ】

VGF 遺伝子の AP-1 様配列を含むオリゴヌクレオチドを合成し、アニールさせて 2 本鎖のプローブを作製した。センス鎖の配列は 5'-TCTGGCGTGTGTCAT

TGTCAT-3'、変異を導入したプローブのセンス鎖の配列は 5'-TCTGGCGTGTgCATTGTCAT-3' とした。5'末端を [γ -³²P]-ATP で標識し、SH-SY5Y 細胞の核抽出液と 25°C で 30 分間反応させ、4% ポリアクリルアミドゲルで分離した。解析はイメージングアナライザー Fujix BAS 5000 を用いて行った。

【RNA 干渉】

ヒト c-Jun または c-Fos mRNA に対する siRNA をライフテックロジーズ社から購入した。最終濃度 50 nM の siRNA を Lipofectamine RNAiMAX 試薬 (ライフテックロジーズ社) を用いて SH-SY5Y 細胞に導入した。対照群には市販の control siRNA を導入した。c-Jun または c-Fos に対する発現抑制効果をウエスタンブロット法で、またキノホルムによる VGF mRNA の発現誘導に対する抑制効果を定量 PCR により評価した。

C. 研究結果

【キノホルムによる VGF mRNA の発現誘導】

50 μ M のキノホルムで 24 時間刺激した際の VGF mRNA 量の変化を定量 PCR により確認したところ、SH-SY5Y 細胞では約 14 倍、IMR-32 細胞では約 3 倍に増加した (図 1)。

【キノホルムによる VGF 遺伝子の転写活性化】

ヒト VGF 遺伝子のプロモーター領域約 2.3 kb を単離して SH-SY5Y 細胞における転写活性を解析した。キノホルムによる転写活性化に関与する領域は、転写開始点の上流 -1609 から -1280 の間に存在した (図 2 A)。-1374/-1368 には AP-1 サイト様配列が存在したことから、この部位に変異を導入したところ、キノ

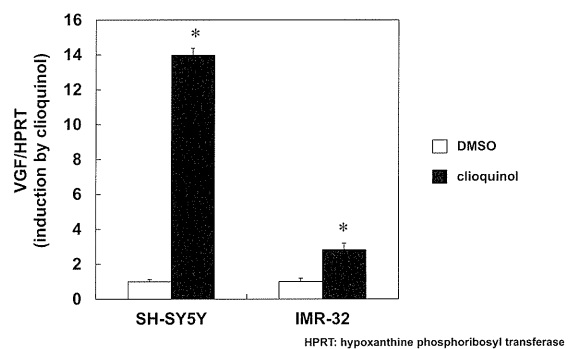


図 1 キノホルムによる VGF mRNA の発現誘導

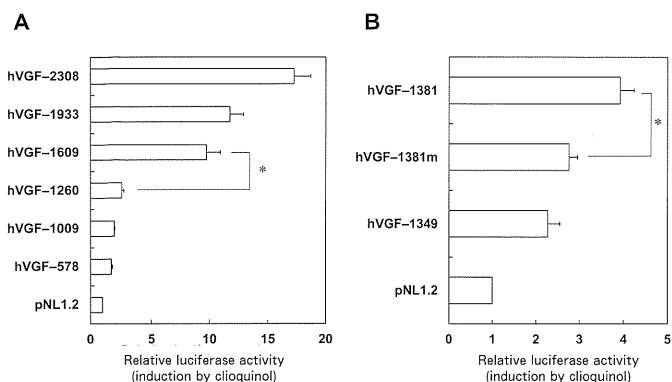


図2 ヒトVGF遺伝子上のキノホルム応答領域

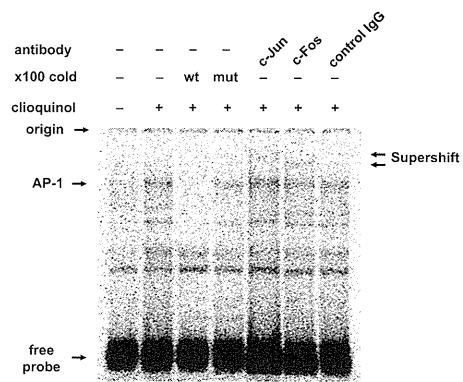


図4 VGF遺伝子のAP-1サイトへのc-JunとC-Fosの結合

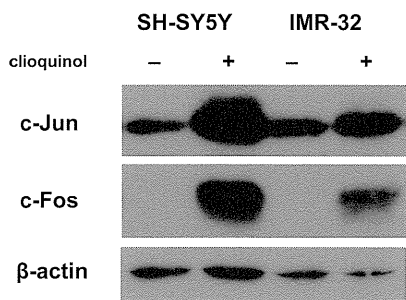


図3 キノホルムによるc-JunとC-Fosの発現誘導

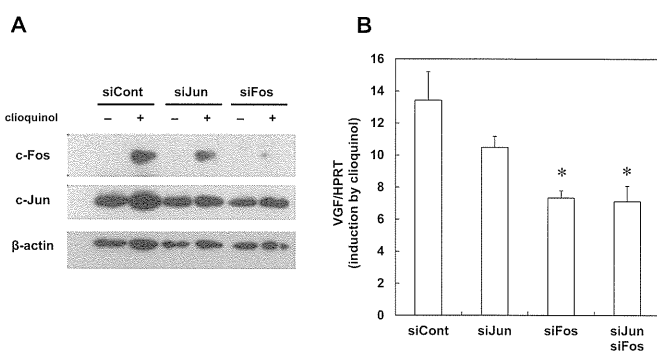


図5 キノホルムによるVGF mRNAの発現誘導はc-Fosに対するRNA干渉で抑制される

ホルムによる転写活性化は有意に減弱した (図2B)。

【キノホルムによるc-Jun、c-Fosの発現誘導】

AP-1 サイトには Jun/Fos ファミリーの転写因子が結合することが知られる。そこでウエスタンブロットにより c-Jun、c-Fos の発現量の変化を確認したところ、キノホルムは SH-SY5Y 細胞、IMR-32 細胞のどちらにおいても、c-Jun と c-Fos の蛋白量を有意に増加させた (図3)。

【キノホルムによるc-Jun、c-FosのVGFプロモーターへの結合】

VGF 遺伝子の AP-1 サイト様配列への c-Jun/c-Fos の結合を、ゲルシフトアッセイにより解析した。-1374/-1368 の AP-1 サイト様配列を含む 2 本鎖オリゴヌクレオチドを ³²P で標識してプローブとし、SH-SY5Y 細胞の核抽出液と反応させてポリアクリルアミドゲルで分離したところ、キノホルムで刺激した細胞で強度が増加するバンドが検出された。このバンドは 100 倍量の非標識プローブの添加により消失したが、AP-1 サイト様配列に変異を導入した非標識プローブでは消失しなかったことから、AP-1 サイト様配列に特異的に転写因子が結合したものと考えられた。ま

た c-Jun または c-Fos に対する抗体の添加により、さらに高分子側にスーパーシフトしたバンドが検出されたことから、c-Jun と c-Fos が VGF 遺伝子の AP-1 サイトに結合することが示された (図4)。

【c-Fosの発現抑制はキノホルムによるVGF mRNAの発現誘導を抑制する】

c-Jun/c-Fos がキノホルムによる VGF の発現誘導に関与するかどうかを、c-Jun/c-Fos に対する RNA 干渉を行い、その発現を抑制することにより解析した。c-Jun または c-Fos に対する siRNA (図5A) を SH-SY5Y 細胞に導入したところ、c-Fos に対する siRNA はキノホルムによる VGF mRNA の発現誘導を有意に抑制した (図5B)。

D. 考察

キノホルムは転写因子 c-Fos の発現誘導を介して神経ペプチド前駆体 VGF の転写を促進し、その発現を誘導することが明らかとなった。過去に述べたように、本研究で用いたキノホルムの濃度 (20 μM~50 μM)

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^{3,4)}。

スモンは腹痛・下痢などの腹部症状に引き続き、特有のしびれ感が足先から下肢全体あるいは腹部・胸部にまで上行する神経疾患であり、下肢の痙縮や脱力をきたし、重症例では視力障害による失明に至る。病理学的な解析においては脊髄や視神経の軸索障害が認められているが⁵⁾、キノホルムの毒性発現のメカニズムの全容は未だ明らかではない。

VGFは元来 nerve growth factor (NGF) 応答性の遺伝子産物として同定された⁶⁾。NGFによる発現誘導機構についてはこれまで多くの報告がなされてきたが、NGF 応答領域よりも上流に位置する AP-1 サイトを介して VGF の発現が誘導されることを示したのは我々が初めてである。

VGF の発現は中枢および末梢の神経と内分泌細胞に限局している。座骨神経の切断により後根神経節に、脊髄損傷によりその周辺部に VGF 量が増加することが知られており、VGF の発現上昇と神経因性疼痛との相関が考えられてきた^{7,8)}。VGF に由来する TLQP-21 などの C 末端ペプチドが痛み反応を引き起こすことも多数報告されている⁹⁻¹¹⁾。これらのことから、VGF の発現誘導がキノホルムによる痛覚過敏や異痛に関与する可能性が考えられる²⁾。

我々は AP-1 転写因子の中で、SH-SY5Y 細胞で顕著に誘導される c-Jun と c-Fos に着目した。RNA 干渉では VGF の発現誘導には c-Jun よりも c-Fos の寄与の方が大きいという結果であったが、用いた siRNA の効率による可能性も考えられる。c-Fos は c-Jun とヘテロ二量体を形成して機能することが知られており、VGF の発現誘導に c-Jun が関与する可能性は否定できない。キノホルムによる c-Jun と c-Fos の発現誘導の程度は IMR-32 細胞では SH-SY5Y 細胞に比して極めて低かったが、このことは VGF の発現誘導の程度が極めて低いこととも一致する。キノホルムの腹腔内投与によりラットやマウスの終脳において c-Fos の発現が誘導されることも報告されている¹²⁾。キノホルムを投与されたスモン患者における c-Fos の発現レベルについては今後の解析が必要である。

E. 結論

キノホルムは転写因子 c-Fos の発現誘導を介して神経ペプチド前駆体 VGF の発現を誘導することが明らかとなった。

G. 研究発表

1. 論文発表

Katsuyama M, Ibi M, Matsumoto M, Iwata K, Ohshima Y, Yabe-Nishimura C. Cloiquinol increases the expression of VGF, a neuropeptide precursor, through induction of c-Fos expression. *J Pharmacol Sci*, in press.

2. 学会発表

勝山真人, 矢部千尋. クリオキノールは c-Fos の発現誘導を介して神経ペプチド前駆体 VGF の発現を誘導する. 第 87 回日本薬理学会年会. 平成 26 年 3 月 21 日. 仙台.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I. 文献

- 1) Katsuyama M, Iwata K, Ibi M, Matsuno K, Matsumoto M, Yabe-Nishimura C. Cloiquinol induces DNA double-strand breaks, activation of ATM, and subsequent activation of p53 signaling. *Toxicology*. 2012; 299: 55-59.
- 2) Andersson DA, Gentry C, Moss S, Bevan S. Cloiquinol and pyriethione activate TRPA1 by increasing intracellular Zn²⁺. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106: 8374-8379.
- 3) Egashira Y, Matsuyama H. Subacute myelo-optico-neuropathy (SMON) in Japan. With special reference to the autopsy cases. *Acta Pathologica Japonica*. 1982; 32 Suppl 1: 101-116.
- 4) Jack DB, Riess W. Pharmacokinetics of iodochlorhydroxyquin in man. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1973; 62: 1929-1932.
- 5) Tateishi J. Subacute myelo-optico-neuropathy: cloiquinol intoxication in humans and animals.

- Neuropathology: official journal of the Japanese Society of Neuropathology. 2000; 20 Suppl: S20-24.
- 6) Levi A, Eldridge JD, Paterson BM. Molecular cloning of a gene sequence regulated by nerve growth factor. *Science*. 1985; 229: 393-395.
 - 7) Valder CR, Liu JJ, Song YH, Luo ZD. Coupling gene chip analyses and rat genetic variances in identifying potential target genes that may contribute to neuropathic allodynia development. *J Neurochem*. 2003; 87: 560-573.
 - 8) Song G, Cechvala C, Resnick DK, Dempsey RJ, Rao VL. GeneChip analysis after acute spinal cord injury in rat. *J Neurochem*. 2001; 79: 804-815.
 - 9) Rizzi R, Bartolomucci A, Moles A, D'Amato F, Sacerdote P, Levi A, et al. The VGF-derived peptide TLQP-21: a new modulatory peptide for inflammatory pain. *Neurosci Lett*. 2008; 441: 129-133.
 - 10) Moss A, Ingram R, Koch S, Theodorou A, Low L, Baccei M, et al. Origins, actions and dynamic expression patterns of the neuropeptide VGF in rat peripheral and central sensory neurones following peripheral nerve injury. *Mol Pain*. 2008; 4: 62.
 - 11) Riedl MS, Braun PD, Kitto KF, Roiko SA, Anderson LB, Honda CN, et al. Proteomic analysis uncovers novel actions of the neurosecretory protein VGF in nociceptive processing. *J Neurosci*. 2009; 29: 13377-13388.
 - 12) Ismail T, Mauerhofer E, Slomianka L. The hippocampal region of rats and mice after a single i.p. dose of clioquinol: loss of synaptic zinc, cell death and c-Fos induction. *Neuroscience*. 2008; 157: 697-707.

スモン検診からみた患者の嚥下機能

(平成 24 年度研究報告)

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、今後も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^{1), 2)}。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

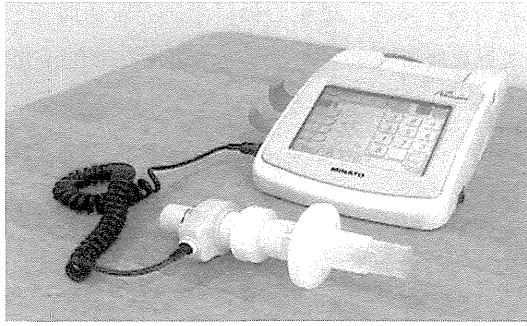


図1 ミナト医科学社製 オートスパイロ AS407

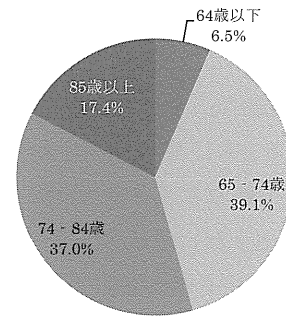


表2 検診受診患者の年齢構成

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

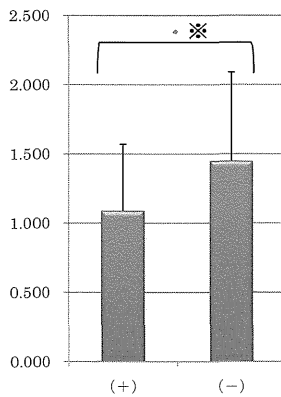


表4 1秒量の結果

※NS 嚥下困難感(+) $n=10$ (-) $n=20$

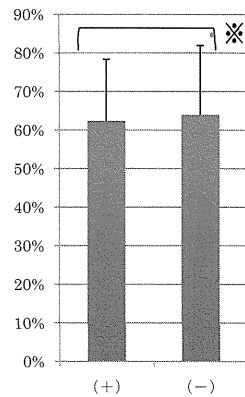


表5 1秒率の結果

※NS 嚥下困難感(+) $n=10$ (-) $n=20$

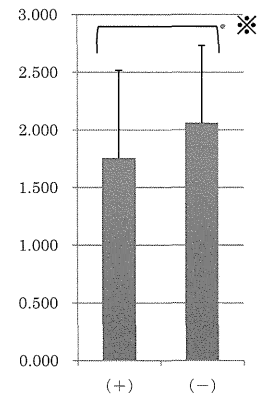


表6 努力性肺活量の結果

※NS 嚥下困難感(+) $n=10$ (-) $n=20$

■22年度 ■23年度 ■24年度

症状	22年度	23年度	24年度
特に異常を感じない	4	5	10
嚥下困難感(+)	3	8	3
口腔内乾燥(+)	4	12	0
時々咽る	2	1	3

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

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³⁾。

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.

スモン患者における嚥下機能評価

(平成 24 年度研究報告)

椿原 彰夫 (川崎医科大学リハビリテーション医学教室)

東野 孝治 (川崎医科大学リハビリテーション医学教室)

平岡 崇 (川崎医科大学リハビリテーション医学教室)

安永 雅 (川崎医科大学リハビリテーション医学教室)

研究要旨

【目的】岡山県下のスモン患者を対象に、摂食・嚥下に関する実態調査を行う。

【方法】岡山県下のスモン患者 190 名に摂食・嚥下に関するアンケート調査を行った。また希望者には嚥下造影検査 (以下 VF) と嚥下内視鏡検査 (以下 VE) を行った。

【結果】128 名から回答を得られた。5 項目以上空欄があった 9 名を除いた 119 名 (男性 41 名、女性 78 名、平均年齢 78 歳) のアンケート結果を解析した。119 名中 55 名 (46.2%) に何らかの自覚的異常を認めた。昨年 (38.5%) と比較すると自覚症状を有する患者が増加していた。VF は 12 名に、VE は 11 名に施行した。VF/VE 上全例で誤嚥は認められなかったものの、準備期・口腔期・咽頭期に何らかの異常を認めた。

【結論】前年度と同様に岡山県下スモン認定患者に対し摂食・嚥下に対するアンケート調査及び希望者には VF・VE を行った。昨年に比し自覚症状を認める症例が若干増加しており、今回の調査でも、高齢者の摂食・嚥下障害の特徴に類似していた。またアンケート結果と検査結果とで乖離を認めていることから、今後はアンケートによる判定基準の厳格化を行うことで、早期から摂食・嚥下障害を発見し、誤嚥性肺炎や窒息などの予防が出来ると考えられる。

A. 研究目的

近年、摂食・嚥下障害を有する高齢者が増加している。また、スモン患者においても高齢化に伴う摂食・嚥下障害の増加が懸念されている。我々は、平成 13 年から岡山県下のスモン患者を対象に摂食・嚥下障害のアンケートによる実態調査を行い、早期発見に努めてきた。今年度も従来通りアンケート調査および希望者を対象に嚥下造影検査 (以下 VF) と嚥下内視鏡検査 (以下 VE) を施行し、その特徴ならびに経時的変化について検討した。

B. 研究方法

岡山県下スモン認定患者 190 名を対象とした。方法は対象者全員に郵送で摂食・嚥下に関するアンケート

を送付し回答を得た。送付したアンケートを表 1 に示す。アンケート内容は、摂食・嚥下に関する 17 項目の質問からなり、肺炎の既往・栄養状態・咽頭機能・口腔機能・食道機能・声門防御機構などが反映される項目となっている。これは、大熊るり¹⁾および藤島一郎²⁾らの発表した摂食・嚥下障害のスクリーニングテストを参考に作成した。一般的に摂食・嚥下は運動学的に先行期、準備期、口腔期、咽頭期、食道期の 5 つのステージに分類して評価する。アンケートでは、既往症や全身状態に関する質問である 1-4 が先行期を反映している。咽頭残留や嚥下時のむせに関する 5-10 および 17 の質問が咽頭期を反映している。送りこみや義歯の問題などに関する質問 11-13 は、準備期および口腔期を評価している。胸につかえる感じや胃

表1 嚥下障害に関するアンケート A (頻繁に) B (時折) C (症状なし)

1. 肺炎と診断されたことがありますか？	先行期
2. 体重が減ってきましたか？	
3. 食べる量が減りましたか？	
4. 食事内容(嗜好)が変わってきていますか？	咽頭期
5. 物が飲み込みにくいと感じることがありますか？	
6. 食事中にむせることがありますか？	
7. お茶でむせることがありますか？	準備期・口腔期
8. 食事中や食後に痰が多くなることがありますか？	
9. のどに食べ物が残る感じはありますか？	
10. 食べるのが周りの人より遅いですか？	食道期
11. 硬いものが食べにくくなりましたか？	
12. 食べ物が口からこぼれることがありますか？	
13. 食べ物が口の中に残ることがありますか？	咽頭期
14. 食べ物や酸っぱいものが胃から戻ってくることがありますか？	
15. 胸に食べ物が残ったり、詰まった感じがすることがありますか？	
16. 夜間に咳で目が覚めることがありますか？	
17. 食後に声がうらがうらになることがありますか？	

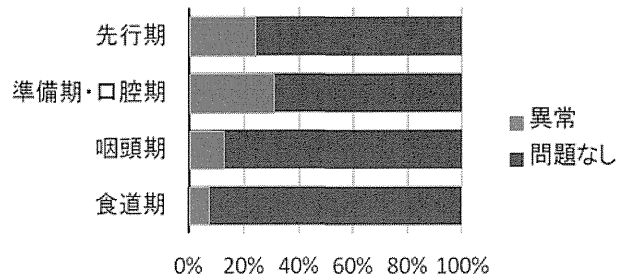
からの逆流といった症状などの質問 14-16 は、食道期を反映している。

それらに対して症状の出現する頻度を A (頻繁に) B (時折) C (症状なし) の 3 段階で回答を得た。その内 A (頻繁に) と回答されたものを異常と判断とした。またアンケートには、川崎医科大学附属病院を受診し、VF・VE を希望するかどうかの意思を問う項目を加えて郵送された。検査を希望した患者を VF・VE の対象とした。検査の手順として、VF では安楽な椅子に普段の食事姿勢で座り、ストレート水分 3cc、5cc、トロミ水分 3 種類 (マヨネーズ状、ヨーグルト状、ポタージュ状) 3cc、5cc、バナナ 6g を自由に嚥下してもらい、側面から撮影する方法で行った。VF の評価は、ステージ毎に年間 100 例以上 VF を評価している医師によって行った。VE では長径 3mm のファイバーを使用して、咽頭や喉頭の形態や動き、安静時の唾液貯留や喉頭侵入・唾液誤嚥、嚥下時の収縮力や咽頭残留などを評価した。検査を受けた者の検査結果と、アンケート結果を比較した。なお本調査は川崎医科大学倫理審査委員会の審査を受けて行った。

C. 研究結果

アンケートの回収が可能であったのは、128 名 (67.3%) であった。5 項目以上の空欄があった 9 名を除外し、119 名のアンケートを解析した。男性が 41 名、女性が 78 名であり、平均年齢は 78 歳であった。119 名中 55 名 (46.2%) の人に異常を認めた。アンケート集計結果は表 2 に示した。先行期障害は 23.5%

表2 アンケート結果



* 各アンケート項目に 1 つでも A (頻繁に) という回答があれば、異常とした。

表3 検査結果とアンケート結果の比較

	先行期	準備期・口腔期	咽頭期	食道期
	VF/VE アンケート	VF/VE アンケート	VF/VE アンケート	VF/VE アンケート
症例1	*	* *	*	
症例2		*		*
症例3		* *	*	
症例4		*	* *	
症例5		*	*	*
症例6-9		*	*	
症例10-12				

先行期障害は対面診察時に判断

(28/119)、口腔・準備期障害は 31.9% (38/119) と比較的高率に異常を認めたのに対し、咽頭期障害は 14.3% (17/119)、食道期障害は 8.4% (10/119) と比較的異常を訴えるものが少ない傾向であった。アンケート内で VF・VE を希望すると回答した患者は 28 名であった。電話で希望者一人ずつに確認を行い、最終的に VF を 12 名に、VE を 11 名に対して行った。

主な VF での異常所見としては、準備期・口腔期では主に咀嚼や舌運動不良に伴う食塊の咽頭への送り込みが障害されていた。咽頭期では咽頭収縮力低下による咽頭残留を認めた。また、アンケート結果で異常なしと判断された 7 人においても、3 名に口腔・咽頭残留を認め、うち 1 名で喉頭侵入 (ストレート水分 5cc) を認めた。

主な VE での異常所見としては、喉頭蓋谷から梨状窩にかけて少量の咽頭残留を認めた。また 1 名では披裂の動きに左右差を認めたが、咽頭・喉頭の形態の異常や明らかな誤嚥は認められなかった。

表 3 はアンケートで異常と判断された者の、VF・VE 結果とアンケート結果を比較したものである。