

(4) 倫理面への配慮

本研究は神戸大学医学倫理委員会による承認を得て行われた。

C. 研究結果

(1) COP-PCR

[COP-PCRのパターン解析] COP-PCR反応により *SMN1* exon 7 と *SMN2* exon 7 の特異的増幅が可能であった (図1)。

[シーケンスによる増幅産物の特異性の検証] COP-PCR産物の特異性を確認するため、シーケンス分析を実施した。*SMN1* と *SMN2* の違いは、イントロン6内に存在する1塩基違い(エクソン7から遡って-44の位置)、すなわち *SMN1* は G、*SMN2* は A である。今回の結果はこの1塩基の違いを確認出来ていることを証明した。
[新鮮血-DNAのPCR-RFLPと乾燥濾紙血-DNAのCOP-PCRの比較] 乾燥濾紙血-DNAを用いたCOP-PCRの結果は、新鮮血-DNAを用いたPCR-RFLPの結果と完全に一致した。

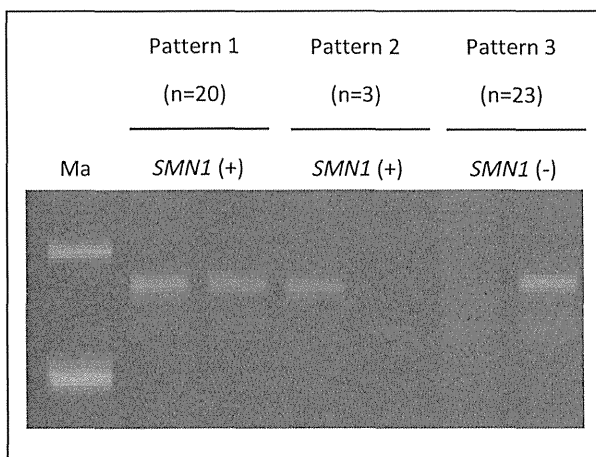


Fig. 1 COP-PCR amplification patterns. COP-PCR clearly distinguishes three genotypes: *SMN1*(+)/*SMN2*(+) (Pattern 1; *SMN1* and *SMN2* retention), *SMN1*(+)/*SMN2*(-) (Pattern 2; *SMN1* retention and *SMN2* deletion), and *SMN1*(-)/*SMN2*(+) (Pattern 3; *SMN1* deletion and *SMN2* retention).

(2) PCR-HRMA

[PCR-HRMAのパターン解析] PCR-HRMAにより *SMN1* exon 7 と *SMN2* exon 7 の特異的曲線が得ら

れた (図2)。

[新鮮血-DNAのPCR-RFLPと乾燥濾紙血-DNAのPCR-HRMAの比較] 乾燥濾紙血-DNAを用いたPCR-HRMAの結果は、新鮮血-DNAを用いたPCR-RFLPの結果と完全に一致した。

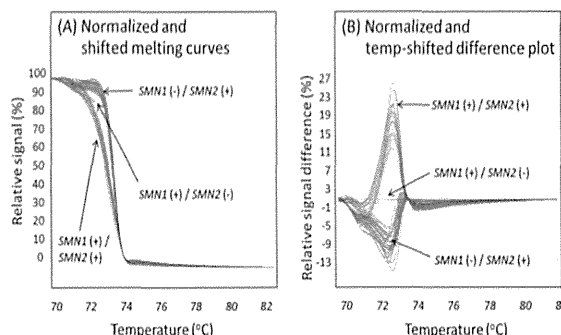


Fig. 2 HRMA data of three genotypes. (A) Normalized and shifted melting curves. (B) Normalized and temperature-shifted difference plot. HRMA distinguished three genotypes: *SMN1*(+)/*SMN2*(+) (*SMN1* and *SMN2* retention), *SMN1*(+)/*SMN2*(-) (*SMN1* retention and *SMN2* deletion), and *SMN1*(-)/*SMN2*(+) (*SMN1* deletion and *SMN2* retention).

D. 考察

今回、我々は、乾燥濾紙血-DNA抽出とPCR分析を組み合わせることによって、正確な *SMN1*-欠失検出システムを確立した。

乾燥濾紙血は、取り扱い、輸送、保存およびコスト面で、実用的である。また、乾燥濾紙血-DNAは、PCR鑄型として十分量のDNAを取得することが出来る。このような点で、乾燥濾紙血-DNAは、非常に有用な診断ツールになる。

また、COP-PCR法は十分な施設のない地域のDNAスクリーニングに適した方法であり、PCR-HRMA法は大量の検体を扱う大規模スクリーニングに適した方法であると言えよう。

今後、SMAの治療法の確立とともに、早期診断のためのスクリーニング法が必要になるものと思われる。

E. 結論

今回の研究結果から、乾燥濾紙血-DNA を用いた COP-PCR 法、PCR-HRMA 法は、SMA 患者のスクリーニングに有用であると判断された。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Yamamoto T, Sato Hideyuki, Lai PS, Nurputra DK, Harahap NI, Morikawa S, Nishimura N, Kurashige T, Ohshita T, Nakajima H, Yamada H, Nishida Y, Toda S, Takanashi J, Takeuchi A, Tohyama Y, Kubo Y, Saito K, Takeshima Y, Matsuo M, Nishio H. Intragenic mutations in SMN1 may contribute more significantly to clinical severity than SMN2 copy numbers in some spinal muscular atrophy (SMA) patients. *Brain & Development*, 36(10):914-920, 2014.

(2) Harahap NI, Takeuchi A, Yusoff S, Tominaga K, Okinaga T, Kitai Y, Takarada T, Kubo Y, Saito K, Sa' adaha N, Nurputra DK, Nishimura N, Saito T, Nishio H. Trinucleotide insertion in the SMN2 promoter may not be related to the clinical phenotype of SMA. *Brain & Development*, 2014, in press.

(3) Kato N, Sa' adah N, Rochmah MA, Harahap NI, NurputraDK, Sato H, Nishimura N, Sadewa AH, Astuti I, Haryana SM, Saito T, Saito K, Nishio H, Takeuchi A. SMA screening system using dried blood spots on filter pater: Application of COP-PCR to the SMN1 deletion test. *Kobe J Med Sci*, 60(4) 2014, in press.

(4) Sa' adah N, Harahap NI, Nurputra DK,

Rochmah MR, Morikawa S, Nishimura N, Sadewa AH, Astuti I, Haryana SM, Saito T, Saito K, Nishio H. A Rapid, Accurate and simple screening method for spinal muscular atrophy: High-resolution melting analysis using dried blood spots on filter paper. *Clinical Laboratory*, 2014, in press.

(5) Saito T, Nurputra DK, Harahap NI, Harahap ISK, Yamamoto H, Muneshige E, Nisizono H, Matsumura T, Fujimura H, Sakoda S, Saito K, Nishio H. A Study of valproic acid for patients with spinal muscular atrophy. *Neurology and Clinical Neuroscience*, 2014, in press.

(6) 西尾久英. 脊髄性筋萎縮症[SMA I型 (infantile acute SMA、Werdnig-Hoffmann病)、SMA II型 (infantile chronic SMA、Dubowitz病)]. 日本臨床 新領域別症候群シリーズ No. 27, 533-537, 2014.

(7) 西尾久英. 脊髄性筋萎縮症 遺伝子診断から治療戦略まで. 日本小児科学会雑誌, 118(9): 1315-1323, 2014.

2. 学会発表

(1) Nurputra DK, Morita H, Nishio H, Tohyama Y. SMN is essential for the HDAC6 mediated tubulin- deacetylation in fibroblasts. (第61回 日本生化学会近畿支部例会 日時: 2014年5月17日(土)、会場: 京都産業大学、要旨集 p43)

(2) 山田博之, 西田吉伸, 松本貴子, 毎原敏郎, 山本友人, 西尾久英. SMN1 遺伝子 exon6 に frameshift 変異を認めた脊髄性筋萎縮症 1 型の一例. (第56回日本小児神経学会総会 日時:

2014年5月30日（金）、会場：アクトシティ浜
松、要旨集 p411)

(3) Nurputra DK, Morita H, Tohyama Y, Nishio H.
HDAC6, a new therapeutic target of SMA, work
in the downstream pathway of cytoskeleton
dynamics. (日本人類遺伝学会第59回大会2014
年11月20日（木）、会場：タワーホール船堀、
要旨集 p258)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

脊髄性筋萎縮症とケトン体に関する研究

研究分担者 齊藤利雄 国立病院機構刀根山病院 神経内科・小児神経内科

研究要旨

脊髄性筋萎縮症(SMA)に対する栄養介入による病状改善の可能性について検討するため、SMA患者11例で、血液中総ケトン体、血糖を測定した。全測定数26件中総ケトン体値は33.2~2260.0 $\mu\text{mol/l}$ で、基準値を超えていた12件では、血糖は100mg/dl未満であった。ケトン体によるエネルギー産生が、SMN転写、病状、予後に影響するか検討が必要である。

共同研究者

山本洋史, 宗重絵美 (国立病院機構刀根山病院
リハビリテーション科)

松井仁美 (国立病院機構刀根山病院 治験管理
室)

藤村晴俊, 佐古田三郎 (国立病院機構刀根山病
院 神経内科)

は84~154mg/dlであった。総ケトン体が基準値を超えていた12件中9件では、血糖は100mg/dl未満であった(図1)。

1例では2年間に6回の総ケトン体測定を行ったが、3回が基準値を超えていた。うち1回は感染症からの回復後検体採取であった。本例の肺活量はケトン体上昇時低値であったが(図2)、発達など他の因子による影響が考えられた。

A. 研究背景・目的

筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、パーキンソン病といった神経変性疾患ではケトン食の病状改善に対する有効性が報告されている。また、脊髄性筋萎縮症(SMA)モデルマウスでは高脂肪食摂取による生存期間延長が報告されている。本報告では、SMAに対する栄養介入による病状改善の可能性について検討する。

B. 研究方法

目的に対する基礎情報収集のため、脊髄性筋萎縮症患者11例で、血液中総ケトン体、血糖を測定した。対象患者の年齢は3~42歳、男性6例、女性5例であった。1患者の測定回数は1~6回、全測定数は26件、いずれも定期検査での検体採取、採取時の全身状態は安定した状態で、食事内容に制限は加えていない。

(倫理面への配慮)臨床情報、検査データ処理にあたっては匿名化を行った。

C. 研究結果

総ケトン体値は33.2~2260.0 $\mu\text{mol/l}$ で、血糖

D. 考察

血糖100mg/dl未満でのケトン体上昇は、飢餓状態でのケトン体利用によるエネルギー産生状態の反映であると考えられる。一方、モデルマウスでは高脂肪食栄養併用D156844投与では脊髄レベルでのSMN蛋白上昇が報告されている。ケトン食や高脂肪食により、さらにケトン体高値の状態とすることで、ケトン体によるエネルギー産生を促すことが、SMN転写産物増加や病状改善・予後改善に寄与するか、食事内容や、評価方法などの検討が必要である。

E. 結論

SMAでのケトン体値は、血糖100mg/dl未満で高値であった。ケトン体によるエネルギー産生が、SMN転写、病状、予後に影響するか検討が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 齊藤利雄. 神経筋疾患による脊柱変形に対する脊椎外科治療アンケート調査. Journal of Spine Research 2014; 5 (1): 18-23.
- 2) Saito T, et al. A study of valproic acid for patients with spinal muscular atrophy. NEUROLOGY AND CLINICAL NEUROSCIENCE. 2014 NOV 25. DOI: 10.1111/ncn3.140.
- 3) Harahap NI, ..., Saito T, Nishio H. Trinucleotide insertion in the SMN2 promoter may not be related to the clinical phenotype of SMA. Brain Dev. 2014 Oct 31. pii: S0387-7604(14)00254-X. doi: 10.1016/j.braindev.2014.10.006.
- 4) Sa'adah N, ..., Saito T, et al. A Rapid, Accurate and Simple Screening Method for Spinal Muscular Atrophy: High-Resolution

Melting Analysis Using Dried Blood

Spotson Filter Paper Clinical Laboratory
(in press)

- 5) Kato N, ..., Saito T, et al. SMA Screening System Using Dried Blood Spots on Filter Paper: Application of COP-PCR to the SMN1 Deletion Test. Kobe J. Med Sci (in press)

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（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

図1 総ケトン体と血糖

1患者の測定回数1~6回
全測定数26件

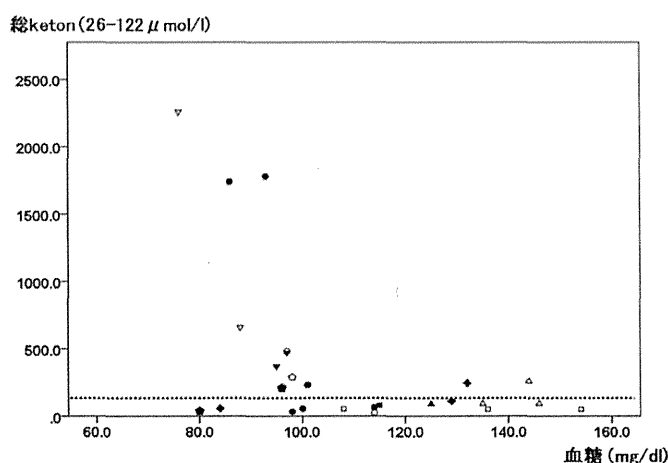
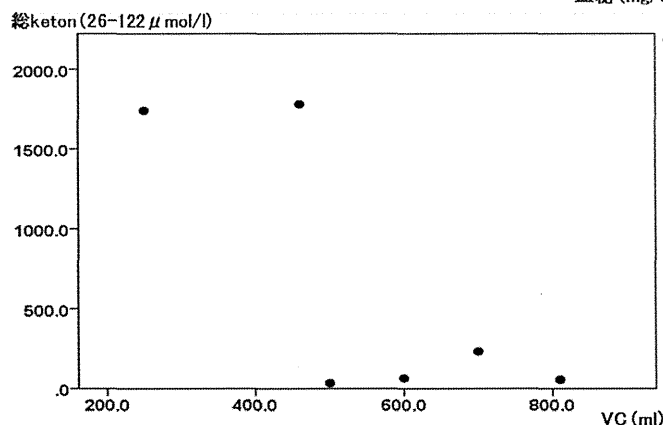


図2 総ケトン体と肺活量

2年間に6回の総ケトン体測定を行った1例



脊髄性筋萎縮症患者の肺活量と咳のピークフローの経年的変化

研究分担者 齊藤利雄 国立病院機構刀根山病院 神経内科・小児神経内科

研究要旨

脊髄性筋萎縮症（spinal muscular atrophy; SMA）患者は呼吸ケア・マネージメントが必要である。その中でも呼吸理学療法を実施する上で喀痰能力に影響する肺活量（vital capacity; VC）と咳のピークフロー（cough peak flow; CPF）を測定する事は重要である。本研究はこれらを経年的に追い、SMAにおける呼吸理学療法について考察することを目的とした。対象は、過去10年で理学療法を処方されたSMA患者のうち、VCとCPFを継続的に測定できたSMAⅡ型19名とした。VCのピークは10歳前後で、その後は徐々に低下した。観察期間中、喀痰に必要なとされるVCの2000mLやCPFの270L/分を超える症例はなかった。SMAは咳嗽力低下に起因する気道クリアランス障害を呈する。さらに軽微な気道感染でも肺炎などの重篤な状態に陥る。気道感染時はもちろん、日常から呼吸理学療法をおこない、肺合併症を予防することが重要である。

共同研究者

山本洋史, 宗重絵美, 岩田裕美子, 井下兼一郎,
川村佳祐, 久保美佳子, 與那嶺春野, 永山ひろ
み, 柳原慶子, 高田祐斗, 西園博章（国立病院
機構刀根山病院 リハビリテーション科）,
井上貴美子（国立病院機構刀根山病院 神経内
科・リハビリテーション科）

A. 研究目的

脊髄性筋萎縮症（spinal muscular atrophy; SMA）では特にⅠ型とⅡ型は呼吸筋の筋力低下をきたす。その結果、睡眠時の低換気や胸郭と肺の発育不全、さらに喀痰に必要な咳嗽力が低下するため、気道感染症罹患時に急性増悪しやすい。これらのことから、SMA患者は呼吸ケア・マネージメントが必要である。呼吸理学療法において、肺活量（vital capacity; VC）と咳のピークフロー（cough peak flow; CPF）を測定することは喀痰能力を評価する上で重要である。本研究は、これらを経年的に追い、SMAにおける呼吸理学療法について考察することを目的とした。

B. 研究方法

過去10年間で理学療法を処方されたSMA患者39名（Ⅰ型5名、Ⅱ型20名、Ⅲ型13名、Ⅳ型1名）のうち、VCとCPFを継続的に測定できたSMAⅡ型19名（男性8名、女性11名）を対象とした。VCとCPFの測定値は、誕生月に最も近い値を採用し、経年的に評価をおこなった。

（倫理面への配慮）

VCやCPFの測定は、日常診療のために必要な検査であり、その目的やリスクについては被験者（患者）やその家族に口頭で説明し同意を得ている。また本研究において、データ抽出の際には匿名化し、個人が特定されないように管理した。

C. 研究結果

対象となった19名の呼吸理学療法開始時の年齢は 13.2 ± 9.4 歳（mean \pm SD）、研究観察期間は 4.9 ± 2.9 年だった。現在（平成26年11月時点）、対象者の年齢は 17.1 ± 10.4 歳で、非侵襲的陽圧換気（Non-invasive positive pressure ventilation; NPPV）は16名に、機械による咳介助（Mechanical insufflation-exsufflation; MI-E）は16名に導入されていた。

図1に対象者のVCの変化を示す。喀痰に必要なとされる2000mLを超えた症例はなく、最低限必要とされる1000mLを超えたのは7名のみだった。VCのピークは10歳前後で、その後は減少したが、成人では一定水準で推移していた。

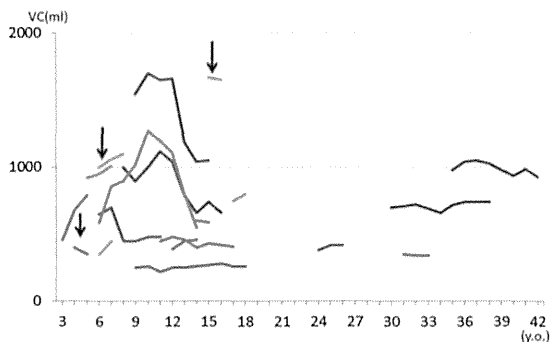


図1 VCの変化

図2にCPFの変化を示す。喀痰に必要な270L/分を超えた症例はなく、日常的に気道内分泌物が喀出困難となる160L/分を超えていたのは4名のみだった。MI-Eを導入していない3名を矢印で示す。

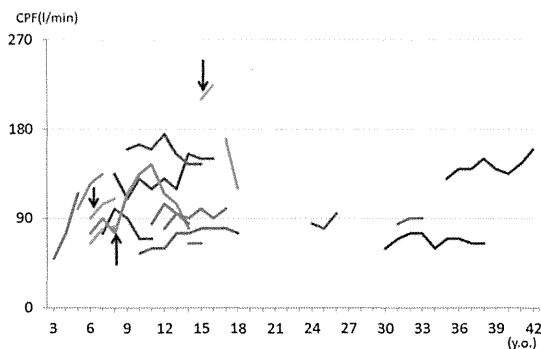


図2 CPFの変化

長期に経過を追えた3名の経過を提示する。
症例A 男児, 8歳6ヶ月にリハビリテーション科初診, 呼吸理学療法の一つである深吸気練習を導入, 9歳10ヶ月からバルプロ酸ナトリウム (Valproic acid; VPA) を開始した。居住地が遠方のため, 近医で理学療法をおこない, 当院は3ヶ月ごとの受診だった。図3に経過を示す。11歳から脊柱変形が増強したため, 12歳で脊柱固定術を実施した。直後はVC, CPF改善するも,

肺炎を発症し, 痰による窒息のため当院ICU入院, NPPVとMI-E導入して退院したが, 自宅でMI-Eを使用しておらず, 半年後, 再度肺炎で入院した。再指導し現在まで肺炎で入院せず経過している。肺炎をきっかけにVCは低下したままであるが, CPFは若干増加した。

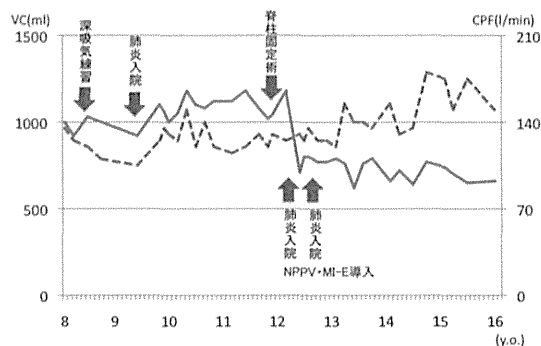


図3 症例A

症例B 男児, 6歳5ヶ月にリハビリテーション科初診, 深吸気練習を導入した。居住地が遠方のため, 近医で理学療法をおこない, 当院は4ヶ月ごとの受診だった。図4に経過を示す。深吸気練習導入前は冬季になると気道感染を繰り返していたが, その後は安定した経過をたどった。経過と共にVCとCPFは増加したが, 11歳3ヶ月で大腿骨骨折受傷, その後VCとCPFは減少, 12歳から脊柱変形が進行し, 食思不振から体重も減少した。VCとCPFも減少したため, 13歳5ヶ月でNPPVとMI-Eを導入, 13歳11ヶ月で脊柱固定術を実施した。その後VCとCPFは改善, 食欲も改善し体重も増加した。



図4 症例B

症例C 女児，11歳7ヶ月にリハビリテーション科初診，深吸気練習を導入した。図5に経過を示す。肺炎で入院したのを契機にNPPVとMI-Eを導入し，12歳で脊柱固定術を実施したが，その後継続的に外来受診し，術後の肺炎による入院はなく，安定した経過をたどっている。

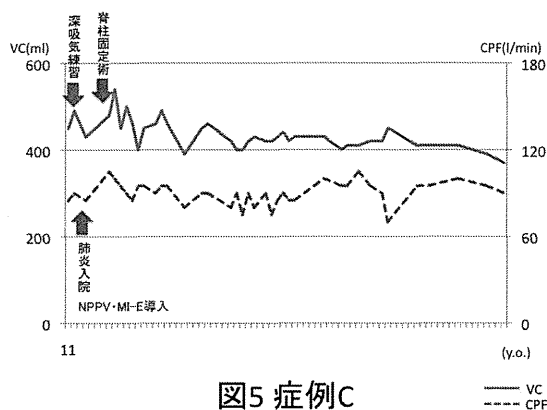


図5 症例C

D. 考察

神経筋疾患における呼吸理学療法の目的は，胸郭や肺コンプライアンス，気道クリアランス能力の維持，無気肺の予防などであり，VCやCPFの定期的な評価が必要とされる。VCの低下は無気肺の発生や咳嗽力低下を引き起こす。CPFが270L/分以下では痰量増加時などに，160L/分以下では日常的に喀痰困難となる。

SMA II型のVCは低値で推移するため，肺胞低換気や無気肺を生じやすい。可及的早期から救急蘇生バッグなどを使用した深吸気練習をおこなうことにより，無気肺予防，喀痰のための咳嗽力の強化が期待できる。また喀痰に必要なCPFに達することなく経過する症例が多く，咳嗽力低下に起因する気道クリアランス障害を呈しやすい。MI-Eを導入していない症例は，NPPVも導入されておらず，軽微な気道感染でも喀痰困難になる。人工呼吸管理の有無にかかわらず，気道クリアランス改善のため早期のMI-E導入が望ましい。

脊柱固定術術後にVCやCPFは改善する症例も

あるが，このような症例でも有効な咳嗽力を獲得できるまでには至らない。MI-Eを含めた呼吸理学療法を実施することで，気道感染罹患時の急性増悪を予防できると考えられる。

E. 結論

SMAは咳嗽力低下に起因する気道クリアランス障害を呈する。さらに軽微な気道感染でも肺炎などの重篤な状態に陥る。気道感染時はもちろん，日常から肺機能検査を含めた呼吸理学療法をおこない，肺合併症を予防することが重要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
(準備中)
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（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

Motion Capture を用いた上肢機能定量評価法

研究分担者 加藤善一郎 岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科 教授

研究要旨

運動スケールなどを含む評価法(outcome measure)において、それぞれの方法が本質的に抱える多くの問題点（汎用性、再現性、タスク多様性・冗長性、結果の非線形性、共有性、人的コストなど）が存在し、十分に標準化されていない。本研究において、より客観的かつ定量的な運動機能の評価手法を確立することを目的として、Motion capture を用いた三次元運動解析を行った。健常成人の前方拳上運動の繰り返し運動を対象として、負荷の有無で運動軌跡がどのように変化するかを比較検討した。評価指標として Spatial Deviation と Direction Variance を計算した。結果として、それぞれの指標について有意な変化がみられた（共に $p < 0.000$ 、両側 Wilcoxon test による）。今後、対象者を小児脊髄性筋萎縮症患者として臨床医の直観的な治療評価との解離について検証を進めていく。Motion Capture を用いた三次元運動機能解析は、新規治療開発や多施設共同研究などにおいて、今後ますます重要な役割を果たすことが期待される。

共同研究者

松丸直樹（岐阜大学医学部附属病院先端医療・臨床研究推進センター）

秋山治彦（岐阜大学大学院医学系研究科整形外科学）

宮本敬（岐阜大学大学院医学系研究科整形外科学）

青木隆明（岐阜大学大学院医学系研究科整形外科学）

加藤忠幸（岐阜大学医学部附属病院リハビリテーション部）

服部良（岐阜大学医学部附属病院リハビリテーション部）

清水紀仁（岐阜大学医学部附属病院リハビリテーション部）

四井康喬（岐阜大学医学部附属病院リハビリテーション部）

大西秀典（岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学）

船戸道徳（長良医療センター臨床研究部再生医療研究室）

A. 研究目的

新規治療開発における課題の一つに、治療効果の客観的評価方法が確立できていない事がある。脊髄性筋萎縮症をはじめとした多くの神経筋疾患においては、治療効果として運動機能の向上が見込まれるが、その評価は主観的かつ定性的なものに頼っているのが現

状である。運動スケールなどを含む評価法(outcome measure)において、それぞれの方法が本質的に抱える多くの問題点（汎用性、再現性、タスク多様性・冗長性、結果の非線形性、共有性、人的コストなど）を看過したまま、十分に標準化されていない。

そこで、モーションキャプチャーによる三次元運動解析を治療評価法のひとつとして応用する可能性について検討し、定量的・客観的な治療評価手法を確立することを目的とした。

B. 研究方法

対象①：理想的半円軌道

モーションキャプチャーにより、運動はあるポイントの位置（xyz 座標）の時系列データとして表現される。データの特徴を把握するために、理想的な半円軌道を仮想的に生成した。

運動の定義は上肢の前方拳上運動とした。上下動十回の繰り返しを一試行とし、試行回数は1とした。

運動データの把握を目的としているため、グラフの視覚的情報を評価指標とした。

対象②：成人男性、健常者

成人男性の右上肢の前方拳上運動を解析した。負荷を掛けずに3回試行した後、重りを保持した状態で前方拳上運動を、1回試行した。

評価指標として二つの指標を考案した：Spatial Deviation と Direction Variance。端的には、Spatial Deviation は軌跡の単位距離あたりの xyz 空間における軌跡の占める体積を表し、Direction Variance はより半円に近く、自然に上下運が実施できているかを表す。両指標とも、筋力低下により大きな代償動作が必要となるほど、大きな値を示す。

これらの評価指標を用いて、負荷の有無で運動軌跡がどのように変化するのかを検討する。

C. 研究結果

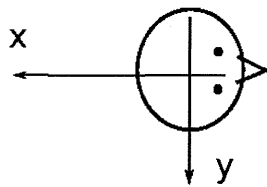


図 1 三次元運動解析における対象被験者と座標軸との関係

対象①：理想的な半円軌道

被験者は x 軸の正方向を背にして xy 平面に垂直になっていると仮定する（図 1 参照）。一試行分の運動軌跡を xyz 空間に示す（図 2）。図 2ab は上昇運動を表し、図 2 下段 cd は下降運動を表している。一本の軌跡の様に見受けられるが、実際には 10 本の軌跡から成る。軌跡が理想的なため、ブレがなく全く同じところを正確にトレースしている。

図 3 に xyz 成分を時系列に沿って示した。Z 軸の時間変化から 10 回の上下運動が確認でき（図 3c）、y 軸方向へのブレはない（図 3b）。x 軸方向に関しては、上肢を拳上する際に、一旦、負の方向へ移動する。その後、腕が xy 平面と水平になった時点で x 軸が最小値を示す。そこから、x 軸成分は上昇に転じ、腕が真上に来たときに 0 に戻る。下降運動の際も、一旦負の方向へ下がり、地面と水平になった地点から正方向へ移動し、0 へ戻るパターンが確認できた（図 3a）。

対象②：成人男性、健常者

運動軌跡を図 4 に示し、xyz 成分の時間変化を図 5 に示した。実データであるため、y 軸方向へのブレが確認できた（図 5b）。x 軸方向への変動も不規則である（図 5a）が、1 回の上下動の間に 2 回の谷型が見られる定性的な変化パターンは変わらない。

同一の対象者に重りを保持した状態で前方拳上運動を実施した場合の運動軌跡を図 6（三次元空間）、図 7（時系列に沿って）に示した。負荷を掛けたことにより、動作にふらつきが見られ、z 軸方向への動きが若干少なくなった。

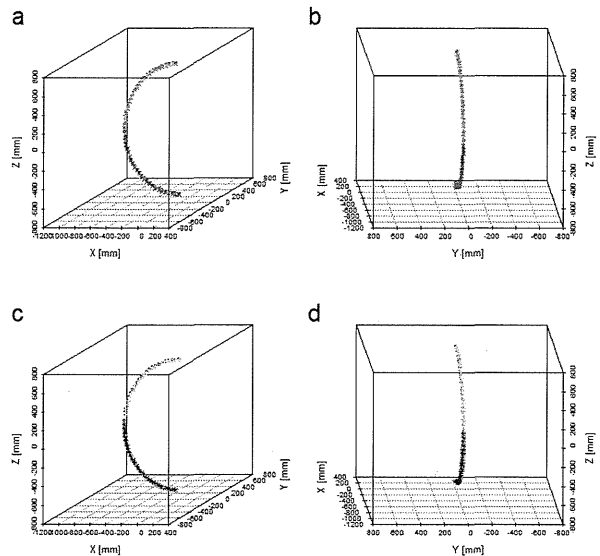


図 2 仮想的に生成した理想的な半円軌道

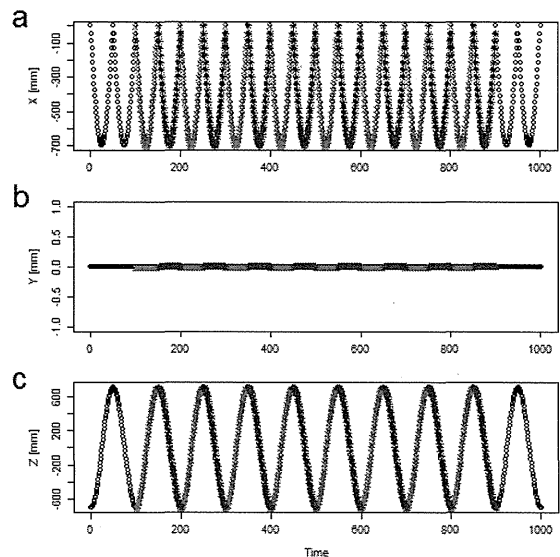


図 3 理想半円軌道における xyz 成分の時間変化

運動軌跡の定量的評価

図 8 において、Spatial Deviation 指標を用いた運動軌跡の比較結果を示す。両側 Wilcoxon test により有意に異なることが確認された ($p < 0.000$)。図 9 において、Direction Variance 指標を用いた比較結果を示す。両側 Wilcoxon test により有意に異なる事が確認された ($p < 0.000$)。

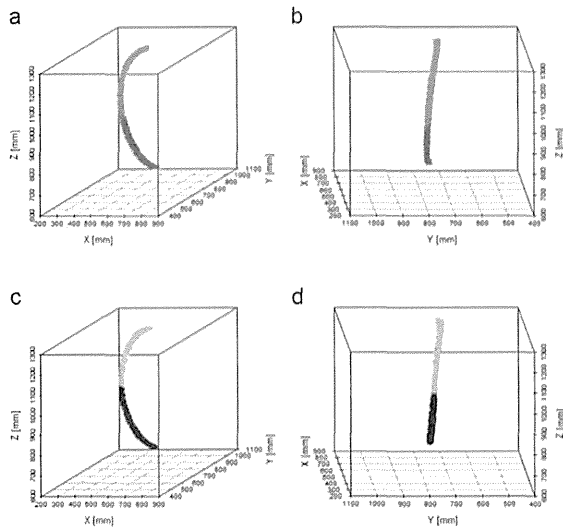


図 4 成人健常者の運動軌跡

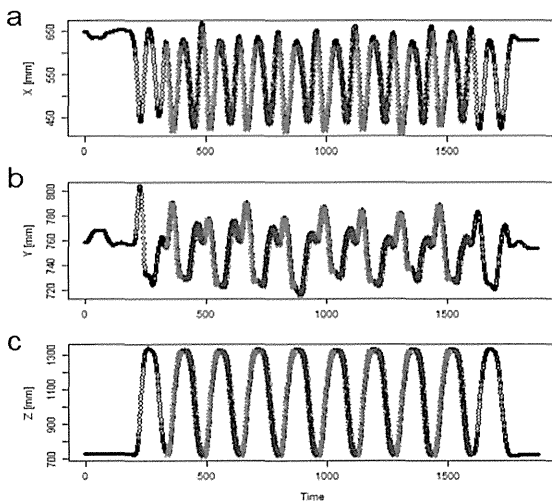


図 5 成人健常者の前方拳上運動における xyz 成分の時間変化

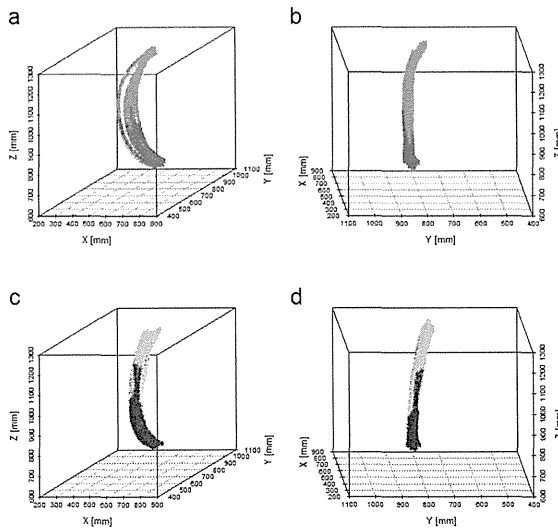


図 6 重りを保持した状態での成人健常者の前方拳上運動の軌跡

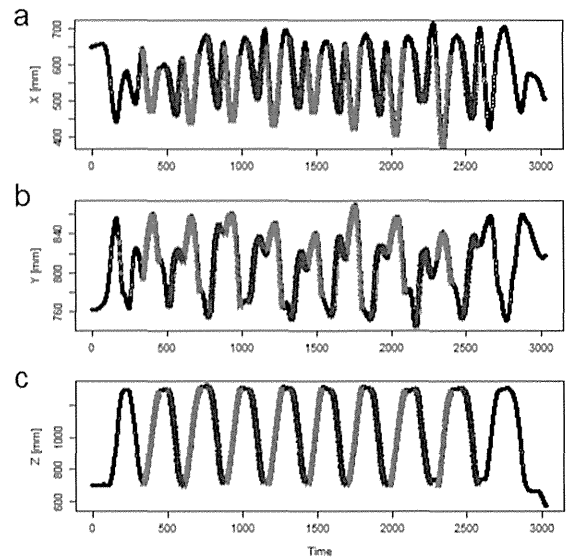


図 7 重りを保持した状態での成人健常者の前方拳上運動における xyz 成分の時間変化

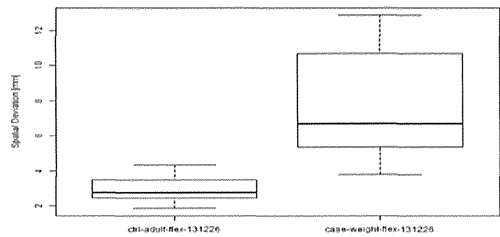


図 8 成人健常者を対象とした負荷の有無における Spatial Deviation 指標の変化

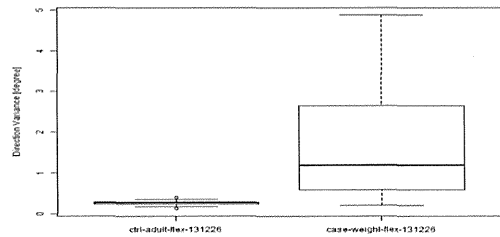


図 9 成人健常者を対象とした負荷の有無における Direction Deviation 指標の変化

D. 考察

本研究において、モーションキャプチャーを用いた三次元運動解析を行った。客観的な評価指標と成り得る2つを考案し、健常者を対象として、それらの有用性について検討を行った。Spatial Deviationは、運動の繰り返し精度に着目しており、運動軌跡がxyz空間を占める体積に依存する。Direction Varianceは、個々の運動軌跡を解析対象としており、如何に滑らかに半円を描いているかに着目している。そのため、

Direction Variance は上肢の拳上運動以外の運動に適用する場合には、注意が必要である。

考案した評価指標の検証のために、健常者に負荷を掛けた状態での前方拳上運動を解析したところ、両方の指標において、負荷を掛けない状態に比べて有意に異なる値が示された。このことから、当該指標とモーションキャプチャーを組み合わせることで、筋力低下等による運動機能低下を定量的に感知できる可能性が示唆された。

今後は、脊髄性筋萎縮症の患者を対象として、治療効果の客観的な評価として妥当であるかを検証する。臨床医が直観的に感じる治療効果と当該指標による数値的な評価が大幅に解離しないことを確認し、より臨床的に有用な手法として開発・修正していく。また、広く臨床現場において活用していただけるように、モーションキャプチャーシステムと評価モジュールをパッケージ化することも視野に入れている。

新規治療開発において、治療効果の客観的な評価は非常に重要な課題である。脊髄性筋萎縮症を始めとした多くの神経筋疾患においては、運動機能の向上が治療効果として期待できる。より客観的で再現性・定量性のある運動機能の評価手法として、モーションキャプチャーを用いる取り組みは、既に行われている（山岸ら 2004, Kato et al. 2009）。今回、新たな評価指標を考案できたことで、これまで開発されてきた各種運動スケールに加え、重要な outcome measure のひとつとして、今後の大規模試験などにおける可能性が示唆される。

本評価手法はこれまでの運動スケールでの評価を否定するものではない。むしろ、本システムを用いることで、従来の運動スケールをより客観的・定量的なものに改良していくことも可能であると考えられる。

E. 結論

成人健常者の前方拳上運動に対して、モーションキャプチャーを用いた三次元運動解析を行い、客観的かつ定量的な運動機能評価を実施した。負荷の有無によって運動軌跡が有意に変化したことが認められた

($p < 0.000$ 、両側 Wilcoxon test)。今後、脊髄性筋萎縮症を含め、他の神経筋疾患の自然歴の評価・治療評価

などを含め、多施設共同研究などにおいても、重要な役割を果たすことが期待される。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

脊髄性筋萎縮症に対するTRH療法及び臨床評価法の検討 加藤善一郎ほか、第 56 回日本小児神経学会総会
平成 26 年 5 月 29 日 浜松市

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

SMA 及び神経・筋疾患に対するロボットスーツ HAL 医療用の開発戦略と 進捗について

研究分担者 中島孝 国立病院機構新潟病院 副院長

研究要旨

SMA 患者の日常生活動作の改善のためには、歩行機能の治療研究が必要である。SMA2 患者の成長発達期において、疾患で傷害された脊髄運動ニューロンおよび下肢筋群に対して過剰な負荷をかけず、促通的歩行プログラムをおこなうことが、治療的改善効果を導くのか、逆に悪化させるのか、ロボットスーツ HAL 小児モデル (HAL For Child: HAL-FC) により歩行プログラムを行い、歩行パラメータを測定した。SMA2 型小児の HAL-FC による歩行プログラムによる効果は有望であり、今後、開発研究を進める価値が非常に高いと考えられた。脊髄性筋萎縮症および筋ジストロフィーなどの神経筋疾患患者の中樞神経系の可塑性の評価のために、ニューロンのシナプス終末をイメージングするイオマゼニール SPECT の正常画像データベースの構築を開始した。

共同研究者

遠藤寿子 (国立病院機構新潟病院神経内科)、
池田哲彦 (同上)、
猪爪陽子 (国立病院機構新潟病院リハビリテーション科)
武富卓三 (CYBERDYNE 株式会社研究員)

A. 研究目的

SMA 患者の日常生活動作の改善のためには、歩行機能の治療研究が必要である。SMA2 患者の成長発達期において、疾患で傷害された脊髄運動ニューロンおよび下肢筋群に対して過剰な負荷をかけず、促通的歩行プログラムをおこなうことが、治療的改善効果を導くのか、逆に悪化させるのか、最初に少数例で検討する必要がある。ロボットスーツ HAL 小児モデル (HAL For Child: HAL-FC) は、HAL 医療モデルと同様に歩行周期に合わせて、随意的に股関節、膝関節の運動を最適に行うことができ、促通的歩行プログラムである。HAL-FC により歩行プログラムを行い、歩行パラメータを測定した。

脊髄性筋萎縮症および筋ジストロフィーなどの神経筋疾患患者の中樞神経系の可塑性の評価のために、ニューロンのシナプス終末をイメージングするイオマゼニール SPECT の正常画像デ

ータベースが必要である。

B. 研究方法

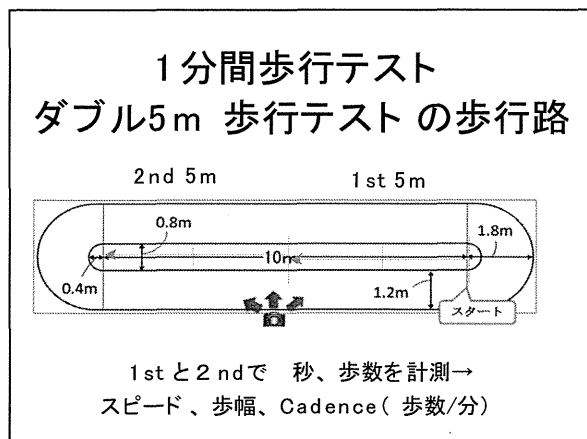
筑波大学サイバニクス研究センターで試験的に製造 (武富卓三および山海嘉之による) された HAL-FC を、SMA2 型の 5 歳 11 ヶ月の女兒に装着し、歩行プログラムを行うプロトコルは、国立病院機構新潟病院倫理委員会にて審査され承認された。親権者にはプロトコルの説明と文書による同意、患者自身に対しては絵やビデオによる十分な説明とアセントをおこなった。患者は 1 歳半検診で SMA2 型と指摘され、現在、ほぼ週に 1 回、理学療法を受けている。3 歳 3 ヶ月から日常生活で車いすを使用している。身長 107.1cm、体重は 14.7kg、MMT は 股関節屈曲: 右 3 左 3-, 股関節伸展左右 2、膝関節屈曲 3-, 伸展 3、足関節背屈 3、底屈 2+。歩行立位能力は短時間の立位維持と 2 歩程度の独歩が可能で歩行器歩行は可能だった。国立病院機構新潟病院に入院 (小児科・神経内科) し、約 40 分の HAL-FC を装着した歩行プログラムを 9 回おこなった。前後および中間に 1 分間歩行テスト (距離)、ダブル 5 m 歩行テスト (スピード) を評価した。歩行路は図 1 の様に設定した。各 visit でアセント繰り返し、工夫してすすめた。

正常被験者に対して添付文書で定められたイオマゼニール（ベンゾダイン注）を投与し臨床用の SPECT 装置で画像化した。

（倫理面への配慮）

臨床試験の倫理指針（厚生労働省 H20 年 7 月 31 日版）にしたがった。

図 1



C. 研究結果およびD. 考察

5歳女兒のアセント、HAL-FC 装着の歩行プログラムは適切にすすめられ、9回の歩行プログラムと前後中間評価をすべて終了することができた。1分間歩行テストおよびダブル5m歩行テストは今回初めて考案したが、その評価尺度の臨床的有用性は肯定的な結果になった。今後も、この試験を発展継続させるべきだと考えられた。また、被験者および親権者、親族などの試験に対する期待は高かったが、終了後、歩行プログラムに対する満足度が高く、今後の試験協力に対しても積極的だった。

イオマゼニール（ベンゾダイン注）SPECT の正常画像データベースの構築を開始した。

E. 結論

SMA2 型小児の HAL-FC による歩行プログラムによる効果は有望であり、今後、開発研究を進める価値が非常に高いと考えられた。そのために、小児領域での HAL 装着のアセントも重要で

ある。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 中島孝, 難病の画期的治療法 HAL-HN01 の開発における哲学的転回, 現代思想, vol142, 第 13 号, 137-145, 2014
2. 中島孝, 脳, 脊髄, 神経・筋疾患に対する HAL[®] の医療応用の基本戦略—医師主導治験の経験から, 臨床評価, Vol. 42, No. 1, 31-38, 2014
3. 中島孝, ロボットスーツ “HAL-HN01 (医療用 HAL)”, 医学のあゆみ, Vol. 249 No. 5, 491-492, 2014
4. 中島孝, ロボットスーツ HAL による歩行改善効果の可能性, 日本医事新報, No. 4691, 50-51, 2014

2. 学会発表

1. HAMの新薬とロボットスーツによる治療法についての講演会、「HAM歩行障害に対する新しい治療、ロボットスーツHAL-HN01による治験準備について」(鹿児島県民交流センター 2014年4月20日)
2. 第55回日本神経学会学術大会 ふくおかブレインフェア、「こんなときは神経内科へ行こう(装着型ロボット)」(福岡国際センター 2014年5月23日)
3. 第55回日本神経学会学術大会 シンポジウム26 身体と機器とのインタラクティブバイオフィードバックに基づく新たなリハビリテーションへ、「ロボットスーツHALによる治療の実際と展望」(福岡国際会議場 2014年5月23日)
4. 第4回ロボットリハビリテーション研究大会 特別講演、「ロボットスーツHALによるリハビリテーションの臨床応用～サイバニ

- クスによる随意運動機能改善とは何か？HAL-HN01治験のめざすもの～」（札幌コンベンションセンター 2014年7月26日）
5. 工学的関心に則したロボット倫理学の構築研究会、「難病における画期的治療法の開発における転回（philosophical revolution）ーロボットスーツ医療機器モデルHAL-HN01治験とは何か」（京都大学吉田キャンパス 2014年8月9日）
6. 第1回日本HTLV-1学会学術集会、「HAMの歩行不安定症に対する歩行改善プログラムに関する検討」演者：遠藤寿子（東京大学医科学研究所 2014年8月23日）
7. レギュラトリーサイエンス学会第4回学術大会シンポジウム講演、「ロボットスーツHAL-HN01の医師主導治験の経験から」（一橋大学 2014年9月6日）
8. 第12回三島・北河内地域神経難病医療ネットワーク検討会、「ロボットHALの神経難病患者への医療機器としての応用」（田辺三菱製薬(株)本社 2014年9月13日）
9. 第1回HAM治療研究研修会 第8回全国HAM患者友の会「アトム」の会」全国大会、「HAM歩行障害に対する新しい治療、ロボットスーツHAL-HN01による治験について」（ホテルグランドアーク半蔵門 2014年9月14日）
10. 日本せきずい基金創立15周年記念 Walk A gain2014 脊髄再生国際シンポジウム、「ロボットスーツHALによる随意運動障害治療」（東京国際交流館 2014年9月20日）
11. HAMの新薬とロボットスーツによる治療法についての講演会、「ロボットスーツHAL-HN01による治験開始についてのお知らせ」（福岡市市民福祉プラザ 2014年9月23日）
12. 第1回三ツ郷屋学会「これからの地域連携・リハビリテーションのために～ロボットスーツHAL治験から見えてきた可能性と役割」（長岡西病院 2014年10月4日）
13. 第30回東海北陸理学療法学会学術大会、「サイバニクスによる新たな随意運動改善方法ーロボットスーツHALの臨床利用の考え方ー」（静岡市民文化会館 2014年11月15日）
14. ロボットスーツHAL第22回地区別HAL勉強会第3回Mie LIP鈴鹿ロボット研究会、「ロボットスーツHALの医師主導治験から見えるもの」（鈴鹿医療科学大学千代崎キャンパス 2014年11月29日）
15. 第18回新潟神経内科シンポジウム、「生体電位駆動装置型ロボットスーツ、医療モデルHAL-HN01による随意運動改善治療について」（ホテルディアモント新潟 2014年12月13日）
16. 第3回日本脳神経HAL研究会、「神経難病とHAL研究」（福大メディカルホール 2014年12月27日）
17. 神経疾患懇話会、「ロボットスーツHALの医療応用ー神経・筋疾患からパーキンソン病までー」（長岡中央総合病院 2015年1月27日）
- H. 知的財産権の出願・登録状況
無し

SMN 蛋白質の新規測定法の開発研究

研究分担者 荒川正行（野本明男）公益財団法人微生物化学研究会
微生物化学研究所 上級研究員（所長）

研究要旨

脊髄性筋萎縮症 (SMA) は原因遺伝子 survival of motor neuron 1 (*SMN1*) の変異・欠失に伴い、その遺伝子産物である SMN 蛋白質が脊髄前角運動神経細胞において減少することに起因する。現在まで根本治療法は無いが、近年、本邦および欧米において SMA に対する治験が行われており、そのエンドポイントの一つのバイオマーカーとして SMN 蛋白質を測定し定量評価することが注目されている。本研究では、これまで報告された治験で用いられた SMN 蛋白質の定量法を見直し、新規 SMN 蛋白質測定法を開発した。

共同研究者

荒川玲子、青木亮子、斎藤加代子
（東京女子医科大学附属遺伝子医療センター）

A. 研究目的

本研究では、本邦における脊髄性筋萎縮症 (SMA) に対する多施設共同医師主導治験におけるエンドポイントのバイオマーカーとして survival of motor neuron (SMN) 蛋白質を、実験行程が少なく、高感度で信頼性の高い新しい測定法を確立することを目的とする。

SMA は脊髄前角細胞の変性による筋萎縮と進行性筋力低下を特徴とする常染色体劣性遺伝性疾患である。本疾患は 5 番染色体長腕 5q13 に存在する survival of motor neuron 1 (*SMN1*) 遺伝子の欠失・変異による SMN 蛋白質の発現低下を生じる。また、SMN 蛋白質は同染色体上の *SMN2* 遺伝子からも翻訳され、生体内でユビキタスに発現していることが知られている。

近年、SMA の治療戦略の一つとして *SMN2* mRNA の発現を上昇させ、SMN 蛋白質の発現を誘導する histone deacetylases (HDACs) 阻害剤や exon スキッピングを阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチドなどの薬剤を用いた臨床研究が試みられている。実際、欧米における臨床研究では、薬剤投与前後の SMA 患者から末梢血単核球細胞

やリンパ球を採取し、エンドポイントのバイオマーカーとして SMN 蛋白質を ELISA 法により検出している。従来の ELISA 法では、細胞の蛋白質抽出液の作製やサンプルの凍結保存など煩雑な実験行程が SMN 蛋白質の検出感度に影響する可能性がある。

本研究では、従来の SMN 蛋白質測定法と異なる手法で新しい SMN 蛋白質測定法を開発する。

B. 研究方法

ELISA 法とは異なる新しい検出法として、イメージングフローサイトメトリー (IFC) 法を採用した。この IFC 法は、これまでのフローサイトメトリー法に加え、顕微鏡システムを内蔵することにより細胞表面や内部の蛋白質の発現強度だけでなく細胞内の蛋白質の局在を定量化できるシステムであり、次世代のフローサイトメトリーと期待されている。

本研究では、昨年度（平成 25 年度）、最適化された SMN 蛋白質の免疫組織化学染色法を採用し、IFC である FlowSight（メルク株式会社）を用いて、正常ヒト皮膚線維芽細胞や SMA I 型患者由来皮膚線維芽細胞の細胞内 SMN 蛋白質の検出および定量評価を試みた。さらに、医師主導治験に用いるバルプロ酸ナトリウム (VPA: 0, 0.1, 1, 10 mM) を用いた治療効果に対して定量評価を

試みた。

（倫理面への配慮）

SMA 患者由来検体の採取および実験は、東京女子医科大学と微生物化学研究所との共同研究として、東京女子医科大学倫理委員会の承認の下、インフォームドコンセントおよび同意書による確認を経て行われた。

C. 研究結果

IFC 法に用いる SMN 蛋白質の測定を行うための免疫蛍光染色法を確立し、anti-SMN-FITC 抗体（メルク株式会社）を用いて直接法により SMN 蛋白質を測定でき、定量することに成功した（特願 2014-076985）。さらに、本研究で開発した IFC 法により、VPA 投与量依存的に、SMN 蛋白質の発現を有意に亢進し、その細胞内局在を定量化した結果、統計学的に有意に核内に蓄積したことを明らかにした¹⁾。

D. 考察

本研究において、正常ヒト皮膚線維芽細胞と SMA I 型患者由来線維芽細胞を用いて抗 SMN 抗体による IFC 用の免疫組織染色法を確立し、新しい SMN 蛋白質測定法を開発した。今回用いた IFC は対物レンズが 20 倍であるので、線維芽細胞では細胞内の局在の定量評価が可能だが、血液由来細胞の様に細胞径が小さいものに対しては細胞内の局在を評価するのは難しいと考えられる。血液由来細胞に対応するには、対物レンズの大きいものを搭載した機種にするか、別の手法を用いて定量評価する必要がある。

E. 結論

本研究において、従来の SMN 蛋白質測定法と異なる IFC を用いた新しい SMN 蛋白質測定法を開発した。この方法を用いて本多施設共同医師主導治験で評価を行う。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Arakawa M, Arakawa R, Tatsumi S, Aoki R, Saito K, Nomoto A A novel evaluation method of survival motor neuron protein as a biomarker of spinal muscular atrophy by imaging flow cytometry Biochem. Biophys. Res. Commun. 453(3), 368-374, 2014.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

特許出願中（特願2014-076985）

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
西尾久英	脊髄性筋萎縮症 [SMA I型 (infantile acute SMA、 Werdnig-Hoffmann 病)、SMA II型 (infantile chronic SMA、 Dubowitz病)]	日本臨床社	別冊日本臨床 新領域別症候 群シリーズ No. 27 神経症 候群(第2版)	日本臨床 社	大阪	2014	533-537
Saito T	Coagulation and Fibrinolysis Abnormalities in Patients with Muscular Dystrophy	Krasimir Kolev	Fibrinolysis and Thrombolysis	Intech		2014	187-195
齊藤利雄		日本神経学 会, 日本小 児神経学 会, 国立精 神・神経医 療研究セン ター	デュシェンヌ 型筋ジストロ フィー診療ガ イドライン20 14	南江堂	東京	2014	

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kubo Y, Nishio H, Saito K	A new method for SMN1 and hybrid SMN gene analysis in spinal muscular atrophy using long-range PCR followed by sequencing	J Hum Genet			2015 in press
Furukawa Y, Ogawa G, Hokkoku K, Hatanaka Y, Aoki R, Saito K, Sonoo M	Diagnostic use of surface EMG in a patient with spinal muscular atrophy	Muscle Nerve			2015 in press
Yamada H, Nishida Y, Maihara T, Sa' adah N, Harahap NI, Nurputra DK, Rochmah MA, Nishimura N, Satio T, Kubo Y, Saito K, Nishio H	Two Japanese patients with SMA type 1 suggest that axonal-SMN may not modify the disease severity	Pediatr Neurol			2015 in press

Arakawa M, Arakawa R, Tatsumi S, Aoki R, Saito K, Nomoto A	A novel evaluation method of survival motor neuron protein as a biomarker of spinal muscular atrophy by imaging flow cytometry	Biochem Biophys Res Commun	453(3)	368-374	2014
斎藤加代子	パーソナルゲノム解析の医療応用と遺伝カウンセリングの実践	医薬ジャーナル	50(3)	957-961	2014
斎藤加代子	遺伝子検査施行時の倫理的対応	周産期医学	44(2)	153-156	2014
浦野真理、斎藤加代子	出生前診断の遺伝カウンセリング	小児科臨床	67(10)	1631-1635	2014
久保祐二、伊藤万由理、青木亮子、斎藤加代子	脊髄性筋萎縮症におけるSMN遺伝子のコピー数解析と遺伝カウンセリングへの応用	日本遺伝カウンセリング学会誌	35(3)	99-104	2014
Yamamoto T, Sato H, Lai PS, Nurputra DK, Harahap NI, Morikawa S, Nishimura N, Kurashige T, Ohshita T, Nakajima H, Yamada H, Nishida Y, Toda S, Takanashi JI, Takeuchi A, Tohyama Y, Kubo Y, Saito K, Takeshima Y, Matsuo M, Nishio H	Intragenic mutations in SMN1 may contribute more significantly to clinical severity than SMN2 copy numbers in some spinal muscular atrophy (SMA) patients	Brain Dev	36(10)	914-920	2014
Harahap NI, Takeuchi A, Yusoff S, Tominaga K, Okinaga T, Kitai Y, Takarada T, Kubo Y, Saito K, Sa' adaha N, Nurputra DK, Nishimura N, Saito T, Nishio H	Trinucleotide insertion in the SMN2 promoter may not be related to the clinical phenotype of SMA	Brain Dev			2014 in press
Kato N, Sa' adah N, Rochmah MA, Harahap NIF, Nurputra DK, Sato H, Nishimura N, Sadewa AH, Astuti I, Haryana SM, Saito T, Saito K, Nishio H, Takeuchi A	SMA screening system using dried blood spots on filter pater: Application of COP-PCR to the SMN1 deletion test	Kobe J Med Sci	60(4)		2014 in press