

分担研究報告書

大脳認知機能の客観的評価法の開発および感覚系ニューロン関連蛋白発現変化の検討

分担研究者 重藤 寛史 九州大学大学院医学研究院神経内科 講師
林 信太郎 九州大学大学院医学研究院神経内科 講師
研究協力者 吉良 潤一 九州大学大学院医学研究院神経内科 教授

研究要旨 目的： 油症認定患者では約6割に自覚的感覚障害が存在するが末梢神経伝導速度検査や神経学的診察で客観的な末梢神経障害を示すものは2割程度であり、この主観的認知と客観的認知が乖離している。この原因として末梢神経伝導検査やベッドサイドにおける末梢神経検査では感知できない、もっと高次の脳機能が障害されている可能性が否定できない。そこで、触覚刺激を用いた脳磁界反応を計測し、主観的意識下での誘発脳磁界と非意識下での誘発脳磁界との相違を抽出し、一般の末梢神経伝導速度検査では検出できない高次脳機能障害を抽出できるか否かを検討する。油症患者組織における感覚伝導路の病理学的変化について現時点で未解明であるが、今後患者の高齢化に従い剖検例が増加することは予想される。そこで、感覚伝導路の病理変化の検出に有用なマーカー蛋白について検討した。**方法：** 点字にプラスチック製2×4ピンで構成されたピエゾ型触覚刺激装置を用いた。規則的触覚刺激と不規則的触覚刺激を作成し、この2種の刺激を刺激間隔1.2~1.6秒の間隔で各刺激約100回ずつランダムオーダーで右示指に与えた。主観・注意状態の影響を検討するために、この2種類の刺激を弁別するようにタスクを与えた注意下刺激セットと、タスクを与えない環境下での非注意下刺激セットを行い、全頭型脳磁図で計測。204-chのグラジオメーターの波形について解析した。計測結果はMRI皮質上に電流源が平面分布すると仮定した最小ノルム法を用いて誘発電流源を推定した。正常コントロールと疾患コントロールの剖検標本を用いて、ヒトの中枢神経系ニューロンで発現が確認されているカルシウム結合蛋白(CaBP)、カルビンディン(CB)、カルレチニン(CR)、パルプアルブミン(PV)に対する一次抗体を用いて免疫染色を施行した。**結果：** 非注意下では規則的触覚刺激と不規則的触覚刺激で差を認めなかったが、注意下では右側半球において規則的触覚刺激と不規則的触覚刺激の反応の振幅に有意差を認め、不規則触覚刺激の反応の方が振幅が高く、その電流源は右半球の2次体性感覚野に推定された。脊髄剖検標本ではRexed I-II層の後角ニューロンにおいてCBとCRが免疫陽性であった。脳幹(延髄)においては、CaBPのいずれもが内側毛帯で免疫陽性でありCBとCRは横走線維、PVは縦走線維に局在が分かれて存在した。一方、脊髄後索においては何れのCaBPも免疫陰性であった。**結論：** 触覚刺激を弁別するという能動的なタスクを与えた時に、一次体性感覚野では差が出ないが、右半球の二次体性感覚野における脳磁界反応に差が認められた。これは弁別という能動的な意識の影響を客観的に抽出できる可能性を示唆しており、感覚認知の高次脳機能レベルでの評価に有用であると考えられた。以前の我々の研究で電気生理学的に後索-内側毛帯系の波形を検出し得る方法を確立したが、CaBPに着目すると患者剖検組織の内側毛帯における病理変化を検出できること、同時に生前の患者に施行した電気生理学的異常所見と剖検病理所見との比較検討が可能になる事が示唆された。

A. 研究目的

油症患者における末梢神経障害は感覚神経障害が主であるが、筋萎縮や筋線維攣縮を認めることがある末梢運動神経障害と異なり、その評価は患者の主観に頼る部分が多い。客観的な末梢感覚神経障害の評価方法として、神経診察と神経伝導速度検査があるが、我々のこれまでの報告で、客観的末梢神経障害検査の一つとしてのアキレス腱反射の低下を認める人数は発症時 34.8%、33 年後 17.4%と減少し、正常対照でのアキレス腱反射低下 14.6%に近くなっていた¹⁻⁵⁾。一方、患者の主観が入る四肢遠位部の自覚的感覚異常は発症時には 39.1%であったものが、33 年後には 59.4%と約 6 割に増加していた。この主観的認知と客観的認知が乖離には末梢神経伝導検査やベッドサイドにおける末梢神経診察では評価しきれない、皮膚レベル、脊髄レベル、あるいはもっと高次の脳機能が障害されている可能性が否定できない。そこで、我々は末梢神経障害の高次脳機能客観的評価法として、末梢神経刺激として従来の末梢神経電気刺激ではなく、指皮下の触覚受容体を刺激することが可能なピエゾ型非磁性触覚刺激装置を用い、記録として骨や脳脊髄液といった容積伝導の影響を受けやすく歪の多い「脳電場」ではなく、容積伝導の影響を受けない「脳磁場」を測定する試み、皮膚刺激による脳における生理学的変化を検出することが可能であることを報告した⁶⁾。一方、患者の脊髄感覚伝導路における病理変化は未解明である。我々が過去に行った病理学的研究で、カルシウム結合蛋白が (CaBP) ヒト脊髄の後角ニューロン (後角先端～膠様質) や後角先端～後根間の髓内線維など、感覚経路と関連のある領域にユニークな分布を呈する事を見出している (一部のデータを 2009 年日本神経学会学術集会で発表)。現在油症患者の高齢化が進んでいるので、今後剖検例が増えることは予想される。油症による被害は直接被曝した患者のみでなく、2 世、3 世にも及んでいる可能性が示唆さ

れているので、患者剖検標本を適切に解析する方法を確立することにより類似症状に苦しむ患者子孫に恩恵をもたらせる可能性が出てくる。

今回の研究では これまでに確立した脳磁図の測定刺激法と解析法を発展させ、より実際の感覚刺激に近い触覚振動を用いて体性感覚誘発磁界を測定し、触覚の認知機能に刺激パラメーターによる差が出るのか確認した。

剖検組織を用いて感覚系ニューロン・伝導路 (特に後索-内側毛帯系) を検討する際に有用なマーカー蛋白を同定する事を目的とした。

B. 研究方法

脳磁図を用いた高次脳機能評価：疾患のない成人を対象とした。刺激として、規則的触覚振動刺激と不規則触覚振動刺激の 2 種類の刺激を手触りの感覚を作成できるピエゾ型触覚刺激装置 (KGS 製) を用いて作成。2.4 mm の等間隔で配列され、点字様に構成され先端が丸みを帯びたプラスチック製 2×4 ピンで、各ピンの直径は 1.3 mm で 0.7 mm 突出・後退動作する。触圧覚の強さは 1 ピンあたり 0.15~0.18 N。規則的触覚刺激として 10Hz、持続 1.5 秒の等間隔の刺激、不規則的触覚刺激として 1.5 秒の間に 150 個の不規則間隔をもった刺激を作成した。この 2 種の刺激を刺激間隔 1.2~1.6 秒の間隔で各刺激約 100 回ずつランダムオーダーで右示指に与えた。主観・注意状態の影響を検討するために、この 2 種類の刺激を弁別するようにタスクを与えた注意下刺激セットと、タスクを与えない環境下での非注意下刺激セットを行った。誘発脳磁界の測定には 306-ch 全頭型 MEG (Elekta, Neuromag) を用いたが、そのうち 204-ch のグラジオメーターの波形について解析した。計測結果は MRI 皮質上に電流源が平面分布すると仮定した最小ノルム法を用いて誘発電流源を推定した。

非神経疾患患者 (正常コントロール) 7

例のホルマリン固定、パラフィン包埋 5 μm 厚の脊髓と脳幹（延髄）の水平断切片を用いてカルシウム結合蛋白であるカルビンディン (CB), カルレチニン (CR), パルプアルブミン (PV)への一次抗体を用いて免疫染色 (ABC 法)を施行した。脊髓灰白質は Rexed の分類に従い I-X 層に分け、各領域に含まれる免疫陽性ニューロンの局在・分布を評価した。疾患コントロールとして感覚系は障害されないとされる筋萎縮性側索硬化症 (ALS)5 例の剖検組織を用いた。

(倫理面での配慮)

個人情報 は原則的に検証の対象としていないが、個人のプライバシーが侵害されぬよう配慮した。

C. 研究結果

規則的触覚刺激、不規則的触覚刺激、注意下刺激、非注意下刺激とも刺激後 1~2 秒に両側側頭部に反応性のゆっくりした低周波反応を認めた。これら 4 種の反応の結果を比較すると、非注意下では規則的触覚刺激と不規則的触覚刺激で差を認めなかったが、注意下では右側半球において規則的触覚刺激と不規則的触覚刺激の反応の振幅に有意差を認め、不規則触覚刺激の反応の方が振幅が高かった(図 1),その電流源は右半球の 2 次体性感覚野に推定された(図 2)。

剖検例の免疫染色

脊髓(図 3, Table): CB の染色性は脊髓後角の Rexed I-II 層の小型ニューロンに認められたが、他の領域やクラーク柱、中間質外側核のニューロン、大型運動ニューロンには認めなかった。CR の染色性は CB と同様に、Rexed I-II 層に認めたが、染色強度は CB よりも弱かった。更に Rexed VII 層と VIII 層の小型ニューロン、中間質外側核ニューロンに明確な染色性がみられたが、クラーク柱ニューロン、大型運動ニューロンにはなかった。PV の染色性は Rexed VII 層と VIII 層の小型

ニューロン、クラーク柱ニューロン、大型運動ニューロンに認められたが何れも染色強度は弱かった。ALS 症例の検討では Rexed の I, II 層における小型ニューロンの染色性は、CB, CR とともにコントロールと比較して著変なく保たれていた。脊髓後索はコントロール、ALS とともに陽性所見はなかった。

脳幹(延髄)(図 4):延髄を走行する神経線維において何れのカルシウム結合蛋白も内側毛帯に選択的な局在を示した。さらに CB と CR は(脊髓の長軸を基準として)横走線維に、PV は縦走線維に局在が分かれて存在した。

D. 考察

我々はこれまで、二次体性感覚野 (SII) と一次体性感覚野 (SI) の干渉を解析し、指内の狭い領域内に触覚刺激あるいは形態刺激を与えることが可能であり、感覚認知の微細な差を非侵襲的に評価できる可能性を示してきた。今回、触覚刺激を弁別するという能動的なタスクを与えた時に、一次感覚野では差が出ないが、右半球の二次体性感覚野における脳磁界反応に差が認められた。これは弁別という能動的な意識の影響を客観的に抽出できる可能性を示唆している。右半球はサルの実験においても刺激弁別に関与すると推定されており⁷⁾、今回の結果はそれに類似する二次体性感覚野の働きが人間でも生じていると推定された。これは感覚認知の高次脳機能レベルでの評価に有用であると考えられた。

今回の免疫組織化学的検討で CB は脊髓灰白質後角 (Rexed I, II 層)ニューロンに選択的に局在した。また CR も脊髓灰白質後角の中では Rexed I, II 層のニューロンに局在することが分かった。疾患コントロールとして ALS 標本を用いたが、脊髓後角ニューロンの染色性はコントロールと同様に保たれていた。脊髓後索については全ての検体で免疫陰性であった。延髄内側毛帯にはコントロールや ALS 症例ともに CB, CR, PV の何れもが存在したが、興味深い事に内側毛帯の構造の中で

横走線維はCBとCR、縦走線維はPVによって選択的にラベルされた。カルシウム結合蛋白の種類により内側毛帯で局在が分かれる事はヒトでは過去に報告のない所見であり、今後油症患者の内側毛帯の変化を免疫組織学的に鋭敏に検出できる可能性がある。

脊髄後索はCB、CR、PVの何れも陽性所見はなかった。ラット脊髄の研究ではカルシウム結合蛋白の1つである calmodulin が後索と側索に発現していることが報告されているので⁸⁾、今後ヒト脊髄組織における同蛋白の分布を検討する予定である。

以上より油症患者の剖検組織検索に際してCB、CR、PVに着目すると脳幹内側毛帯の病理変化を検出可能となること、同時に我々が昨年度の研究で確立した電気生理学的手法から得られる異常所見との対比が可能となる可能性が示唆された。今後 in situ hybridization による解析も予定している。

E. 結論

触覚刺激を弁別するという能動的なタスクを与え、その磁界反応を測定することにより、弁別という能動的な意識の影響を客観的に抽出できる可能性が示唆され、感覚認知の高次脳機能レベルでの評価に有用であると考えられた。

患者組織を用いた免疫組織学的解析に際して、CB、CR、PVは脳幹の内側毛帯のマーカーとして使用できる。

F. 文献

- 1) 黒岩ら：福岡医誌 60: 462-463, 1969
- 2) 岩下ら：福岡医誌 68: 139-144, 1977
- 3) 柴崎ら：福岡医誌 72: 230-234, 1981
- 4) 古谷ら：福岡医誌 96: 152-156, 2005
- 5) 重藤ら：食品を介したダイオキシン類等の人体への影響の把握とその治療法の開発等に関する研究,平成 19 年度 総括・分担研究報告書, 2008

6) 重藤ら：食品を介したダイオキシン類等の人体への影響の把握とその治療法の開発等に関する研究,平成 23 年度 総括・分担研究報告書, 2012

7) Jiang W, et al: J Neurophysiol. 77:1656-62, 1997

8) Kovacs B, et al. Brain Res Mol Brain Res 102: 28-34, 2002

G. 研究発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

なし