

4. Discussion

Pathomechanism of SMON by clioquinol is still unclear even after 40 years of its discontinuation of clioquinol in Japan. We previously focused on the NGF/Trk-mediated signal transduction pathway for neuronal survival and demonstrated that clioquinol inhibits NGF-induced autophosphorylation of Trk receptor on PC12 neuronal cell line (Asakura et al., 2009). Clioquinol reduced NGF-induced Trk autophosphorylation in a concentration-dependent manner and 1 μ M was a critical concentration of clioquinol toxicity to PC12 cells. It is compatible with the previous observation using animal model of SMON, i.e., plasma levels of clioquinol were approximately 0.5–5 μ g/ml (1.7–17 μ M) (Matsuki et al., 1997). Recently, clioquinol has been the focus of attention as a potential medicine for malignancies, Alzheimer's disease, Parkinson disease, and Huntington's disease (Chen et al., 2007; Cherny et al., 2001; Nguyen et al., 2005; Ritchie et al., 2003). For these new indications, further understanding of clioquinol neurotoxicity is necessary to avoid potential side effects of this drug.

In the present study, 1 μ M of clioquinol reduced acetylated histone and HDAC inhibitor, i.e., TSA, counteract clioquinol-induced reduction of acetylated histones in PC12 cells. In contrast, clioquinol increased acetylated α -tubulin and HDAC inhibitor retained higher levels of acetylated α -tubulin. HDAC inhibitor actually reduced morphological changes (neurite retraction) and the neuronal cell death by clioquinol. In addition, HDAC inhibitor reversed the clioquinol-induced decrement of Trk receptor autophosphorylation provoked with NGF. At present, detailed molecular mechanism why clioquinol induces histone deacetylation in the cells remains unknown. Moreover, the question why a failure of neurotrophin signaling results in histone deacetylation remains to be solved in the future study.

HDAC inhibition induces increased acetylation of histone proteins, causing chromatin to conform more openly so that transcriptional factors and RNA polymerase interact with DNA to modulate transcription (reviewed in Camelo et al., 2005). The consequences of an inhibition of HDACs may result in contradictory results (Cao et al., 2013; Vashishta and Hetman, 2014), which seem to depend partially on cell type (Dietz and Casaccia, 2010). Overall, HDAC inhibitors have been reported to be neuroprotective in several models of neuronal injury. It has been reported that acetylation of α -tubulin rescues axonal transport in primary neurons and in *Drosophila* with leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) mutations (Godena et al., 2014). In this study HDAC inhibitor retained high levels of acetylated α -tubulin and reduced neurite retraction by clioquinol in PC12 cells. Therefore, the increase of acetylated α -tubulin in this study may contribute to neuroprotection. Novel HDAC inhibitors, W2 and I2, decreased A β levels by decreasing gene expression of β - or γ -secretase components and increasing the A β degradation enzymes (Sung et al., 2013). HDAC inhibitor, TSA, prevented mitochondrial fragmentation and elicited early neuroprotection in Parkinson's disease cell model induced by MPP⁺ (1-methyl-4-phenylpyridine, a toxic metabolite of MPTP causing symptoms of Parkinson's disease) (Zhu et al., 2014). HDAC inhibitor, LB-205 (Zn²⁺-dependent pan-inhibitor of class I and class II HDACs), enhanced astrocyte migration and wound repair in an astrocyte scratch assay (Lu et al., 2013). In rat acute traumatic injury model, LB-205 up-regulated the expression of NGF and phosphorylated Trk pathway and resulted in neuroprotection (Lu et al., 2013), which is similar to the results of our present study.

Thus, a part of the mechanism of clioquinol neurotoxicity is suggested to be closely related to the levels of histone deacetylation and this observation may provide a new approach when clioquinol is used as a potential drug for malignancies and neurodegenerative diseases.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest in the present work.

Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found in the online version.

Acknowledgments

This study was supported in part by the MEXT-Supported Program for the Strategic Research Foundation at Private Universities 2010–2014 (T.M.) and a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology (KA: 24591279, TM: 22590945) (K.A. and T.M.), and a grant from the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan (H23-Nanchi-Ippan-017) (T.M.).

References

- Asakura, K., Ueda, A., Kawamura, N., Ueda, M., Mihara, T., Mutoh, T., 2009. Clioquinol inhibits NGF-induced Trk autophosphorylation and neurite outgrowth in PC12 cells. *Brain Res.* 1301, 110–115.
- Boyalp, C., Zhang, Y., Fritah, S., Caron, C., Giliquin, B., Kwon, S.H., Garrido, C., Yao, T.P., Vouret, C., Matthias, P., Khochbin, S., 2007. HDAC6 controls major cell response pathways to cytotoxic accumulation of protein aggregates. *Genes Dev.* 21, 2172–2181.
- Camelo, S., Iglesias, A.H., Hwang, D., Due, B., Ryu, H., Smith, K., Gray, S.C., Imitola, J., Duran, G., Assaf, B., Langley, B., Khoury, S.J., Stephanopoulos, G., De Girolami, U., Ratan, R.R., Ferrante, R.J., Dangond, F., 2005. Transcriptional therapy with the histone deacetylase inhibitor Trichostatin A ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 164, 10–21.
- Cao, B., Li, J., Zhu, J., Shen, M., Han, K., Zhang, Z., Yu, Y., Wang, Y., Wu, D., Chen, S., Sun, A., Tang, X., Zhao, Y., Qiao, C., Hou, T., Mao, X., 2013. The antiparasitic clioquinol induces apoptosis in leukemia and myeloma cells by inhibiting histone deacetylase activity. *J. Biol. Chem.* 288, 34181–34189.
- Chen, D., Cui, Q.C., Yang, H., Barrea, R.A., Sarkar, F.H., Sheng, S., Yan, B., Reddy, G.P., Dou, Q.P., 2007. Clioquinol a therapeutic agent for Alzheimer's disease, has proteasome-inhibitory, androgen receptor-suppressing, apoptosis-inducing, and antitumor activities in human prostate cancer cells and xenografts. *Cancer Res.* 67, 1636–1644.
- Cherny, R.A., Atwood, C.S., Xilinas, M.E., Gray, D.N., Jones, W.D., McLean, C.A., Barnham, K.J., 2001. Treatment with a copper-zinc chelator markedly and rapidly inhibits beta-amyloid accumulation in Alzheimer's disease transgenic mice. *Neuron* 30, 665–676.
- Dietz, K.C., Casaccia, P., 2010. HDAC inhibitors and neurodegeneration: at the edge between protection and damage. *Pharmacol. Res.* 62, 11–17.
- Fischer, A., Sananbenesi, F., Mungenast, A., Tsai, L.H., 2010. Targeting the correct HDAC(s) to treat cognitive disorders. *Trends Pharmacol. Sci.* 31, 605–617.
- Godena, V.K., Brookes-Hocking, N., Moller, A., Shaw, C., Oswald, M., Sancho, R.M., Miller, C.C.J., Whitworth, A.J., De Vos, K.J., 2014. Increasing microtubule acetylation rescues axonal transport and locomotor deficits caused by LRRK2 Roc-COR domain mutations. *Nat. Commun.* 5, 5245. doi:http://dx.doi.org/10.1038/ncomms5245.
- Gräff, J., Tsai, L.H., 2013. Histone acetylation: molecular mnemonics on the chromatin. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 97–111.
- Haberland, M., Montgomery, R.L., Olson, E.N., 2009. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat. Rev. Genet.* 10, 32–42.
- Katsuyama, M., Iwata, K., Ibi, M., Matsuno, K., Matsumoto, M., Yabe-Nishimura, C., 2012. Clioquinol induces DNA double-strand breaks, activation of ATM, and subsequent activation of p53 signaling. *Toxicology* 299, 55–59.
- Kaur, D., Yantiri, F., Rajagopalan, S., Kumar, J., Mo, J.Q., Boonplueang, R., Viswanath, V., Jacobs, R., Yang, L., Beal, M.F., DiMonte, D., Volitaskis, I., Ellerby, L., Cherny, R. A., Bush, A.I., Andersen, J.K., 2003. Genetic or pharmacological iron chelation prevents MPTP-induced neurotoxicity in vivo: a novel therapy for Parkinson's disease. *Neuron* 37, 899–909.
- Kawamura, K., Kuroda, Y., Sogo, M., Fujimoto, M., Inui, T., Mitsui, T., 2014. Superoxide dismutase as a target of clioquinol-induced neurotoxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 452, 181–185.
- Konagaya, M., Matsumoto, A., Takase, S., Mizutani, T., Sobue, G., Konishi, T., Hayabara, T., Iwashita, H., Ujihira, T., Miyata, K., Matsuoka, Y., 2004. Clinical analysis of longstanding subacute myelo-optico-neuropathy: sequelae of clioquinol at 32 years after its ban. *J. Neurol. Sci.* 218, 85–90.
- Lahm, A., Paolini, C., Pallaoro, M., Nardi, M.C., Jones, P., Neddermann, P., Sambucini, S., Bottomley, M.J., Lo Surdo, P., Carfi, A., Koch, U., De Francesco, R., Steinkühler,

- C., Gallinari, P., 2007. Unraveling the hidden catalytic activity of vertebrate class IIa histone deacetylases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 17335–17340.
- Lu, J., Yang, C., Chen, M., Ye, D.Y., Lonser, R.R., Brady, R.O., Zhuang, Z., 2011. Histone deacetylase inhibitors prevent the degradation and restore the activity of glucocerebrosidase in Gaucher disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 21200–21205.
- Lu, J., Frerich, J.M., Turtzo, L.C., et al., 2013. Histone deacetylase inhibitors are neuroprotective and preserve NGF-mediated cell survival following traumatic brain injury. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 10747–10752.
- Matsuki, Y., Yoshimura, S., Abe, M., 1997. SMON and pharmacokinetics of chionoform with special reference to animal species difference. *Yakugaku Zasshi* 7, 936–956 [in Japanese with English abstract].
- Minucci, S., Pelicci, P.G., 2006. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6, 38–51.
- Muroh, T., Hamano, T., Tokuda, A., Kuriyama, M., 2000. Unglycosylated Trk protein does not co-localize nor associate with ganglioside GM1 in stable clone of PC12 cells overexpressing Trk (PCTrk cells). *Glycoconj. J.* 17, 233–237.
- Muroh, T., Tokuda, A., Miyadai, T., Hamaguchi, M., Fujiki, N., 1995. Ganglioside GM1 binds to the Trk protein and regulates receptor function. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 5087–5091.
- Nakae, K., Yamamoto, S., Shigematsu, I., Kono, R., 1973. Relation between subacute myelo-optic neuropathy (S.M.O.N.) and clioquinol: nationwide survey. *Lancet* 1, 171–173.
- Nguyen, T., Hamby, A., Massa, S.M., 2005. Clioquinol down-regulates mutant huntingtin expression in vitro and mitigates pathology in a Huntington's disease mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 11840–11856.
- Ritchie, C.W., Bush, A.L., Mackinnon, A., Macfarlane, S., Mastwyk, M., MacGregor, L., et al., 2003. Metal-protein attenuation with iodochlorhydroxyquin (clioquinol) targeting Abeta amyloid deposition and toxicity in Alzheimer disease: a pilot phase 2 clinical trial. *Arch. Neurol.* 60, 1685–1691.
- Shiraki, H., et al., 1979. Neuropathological aspects of the etiopathogenesis of subacute myelo-optico-neuropathy (SMON). In: Vinken, P.J., Bruyn, G.W., Cohen, M.M. (Eds.), *Intoxications of the Nervous System: Part 2. Handbook of Clinical Neurology*, vol. 37. North-Holland, Amsterdam, pp. 141–198.
- Sobue, I., et al., 1979. Clinical aspects of subacute myelo-optico-neuropathy (SMON). In: Vinken, P.J., Bruyn, G.W., Cohen, M.M. (Eds.), *Intoxications of the Nervous System: Part 2. Handbook of Clinical Neurology*, vol. 37. North-Holland, Amsterdam, pp. 115–139.
- Sung, Y.M., Lee, T., Yoon, H., et al., 2013. Mercaptoacetamide-based class II HDAC inhibitor lowers Abeta levels and improves learning and memory in a mouse model of Alzheimer's disease. *Exp. Neurol.* 239, 192–201.
- Tateishi, J., 2000. Subacute myelo-optico-neuropathy: clioquinol intoxication in humans and animals. *Neuropathology (Suppl. 20)*, S20–S24.
- Tsubaki, T., Honma, Y., Hoshi, M., 1971. Neurological syndrome associated with clioquinol. *Lancet* 1, 696–697.
- Vashishta, A., Hetman, M., 2014. Inhibitors of histone deacetylases enhance neurotoxicity of DNA damage. *Neuromol. Med.* 16, 727–741.
- Ververis, K., Kaiagiannis, T.C., 2011. Potential non-oncological applications of histone deacetylase inhibitors. *Am. J. Transl. Res.* 3, 454–467.
- Walkinshaw, D.R., Tahmasebi, S., Bertos, N.R., Yang, X.J., 2008. Histone deacetylases as transducers and targets of nuclear signaling. *J. Cell. Biochem.* 104, 1541–1552.
- Zhu, M., Li, W.W., Lu, C.Z., 2014. Histone deacetylase inhibitors prevent mitochondrial fragmentation and elicit early neuroprotection against MPP+. *CNS Neurosci. Ther.* 20, 308–316.

脊髄前角細胞におけるキノホルムの興奮性シナプス伝達増強作用

泉 尚史^{1),2)} 谷口 亘²⁾ 山中 学¹⁾ 曾根勝真弓¹⁾
西尾 尚子²⁾ 中塚 映政²⁾ 吉田 宗平³⁾ 吉田 宗人¹⁾

和歌山県立医科大学整形外科学教室¹⁾
関西医療大学保健医療学部疼痛医学分野²⁾
関西医療大学保健医療学部神経病研究センター³⁾

An enhancement of excitatory synaptic transmission by Clioquinol in spinal ventral horn neurons

Naofumi Izumi^{1),2)}, Wataru Taniguchi²⁾, Manabu Yamanaka¹⁾, Mayumi Sonekatsu¹⁾,
Naoko Nishio²⁾, Terumasa Nakatsuka²⁾, Souhei Yoshida³⁾, Munehito Yoshida¹⁾

¹⁾Department of Orthopedic Surgery, Wakayama Medical University

²⁾Pain Research Center, Kansai University of Health Sciences

³⁾Research Center of Neurological Diseases, Kansai University of Health Sciences

Key Words : Clioquinol, ventral horn neurons, patch-clamp

Abstract

Subacute myelo-optico neuropathy (SMON) is the harmful effects of a medicine, which was induced by Clioquinol. However, the cellular mechanism about Clioquinol-induced neurotoxicity is not fully understood. We investigated the effect of Clioquinol on excitatory synaptic transmission in ventral horn of the rat spinal cord by using the whole-cell patch-clamp methods. The application of Clioquinol significantly increased the frequency of spontaneous excitatory postsynaptic currents (sEPSCs). Clioquinol-induced enhancement of sEPSCs frequency depended on its concentration. In the presence of tetrodotoxin, the application of Clioquinol increased the frequency of miniature EPSCs. And then, sEPSCs were completely blocked by an AMPA receptor blocker, CNQX without Clioquinol-induced sEPSCs enhancement. Moreover, we found that a chelate compound formed of a zinc ion and Clioquinol significantly increased the frequency of sEPSCs. This effect was larger than that of Clioquinol alone. Next, we investigated whether a reactive oxygen species (ROS) scavenger, PBN or a TRPA1 selective antagonist, A-967079 could

inhibit Clioquinol-induced enhancement of sEPSCs. PBN and A-967079 could not block the enhancement of sEPSCs by Clioquinol. These results indicate that Clioquinol has pre-synaptic actions in the ventral horn and enhance release of the excitatory neurotransmitter glutamate regardless of both ROS and TRPA1.

【はじめに】

亜急性脊髄視神経症(Subacute-Myelo-Optico-Neuropathy: SMON)は、整腸剤キノホルム(Clioquinol: 5-Chloro-7-iodo-8-quinolinol)による薬害であり、1955-1970年に本邦において多数発生した。主な症状として腹痛、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に出現し、腹部・胸部まで至る。さらに下肢の痙縮・脱力を引き起こし、重症例では視神経障害による失明に至る場合も存在する。1970年のキノホルム使用停止以降新たな患者は発生していないが、SMONの後遺症に苦しんでいる患者は未だに多い。

ClioquinolによるSMONの発生機序については古くからビタミンB₁₂の不足から発生する説、キレート作用による神経細胞障害、Clioquinolがミトコンドリアを障害することでの酸化ストレス、神経成長因子受容体の自己リン酸化反応の抑制¹などのさまざまな説があるが、明確なSMON発生機序については明らかとなっていない。これら研究の多くは培養細胞や単離細胞を用いた研究であり、脊髄レベルでClioquinolの作用機序について行った研究は渉猟し得た限りでは存在しない。さらに電気生理学的にClioquinolが与える影響について解析した研究も未だない。そこで、本研究ではClioquinolが脊髄前角における興奮性シナプス伝達に対して、どのような影響を与えるかをwhole-cell patch-clamp法を用いて解析を行った。

【方法】

本実験計画は関西医療大学動物実験委員会の審査を受けて承認された。

1. 脊髄スライス標本の作製

幼若Sprague-Dawley系雄性ラット(9~11日齢)にペントバルビタール(60mg/kg)を腹腔内投与し麻酔後、腰仙部の椎弓切除を行い、1.0~1.5cmの長さで脊髄を摘出し、酸素付加(95% O₂, 5% CO₂)した2~4℃の人工脳脊髄液(NaCl 117mM; KCl 3.6mM; NaH₂PO₄·2H₂O 1.2mM; CaCl₂·2H₂O 2.5mM; MgCl₂·6H₂O 1.2mM; NaHCO₃ 25mM; Glucose 11mM)に浸した。

脊髄から実体顕微鏡視下に硬膜、前根、後根、くも膜、軟膜を除去した後、脊髄を寒天ブロックに作った溝に設置し、マイクロスライサー(D.S.K.社 DTK-1000)を用いて、約500μmの厚さの脊髄横断スライス標本を作製した。切片化した脊髄スライスを記録用のチャンバーに移し、固定グリッドで固定後、酸素付加した人工脳脊髄液で5~10ml/分の速度で灌流した。

2. 脊髄前角細胞からのパッチクランプ記録

赤外線システム含有の顕微鏡を用いて、脊髄前角のIX層の細胞をモニターで観察しながら、微小ガラス電極を刺入、whole-cell patch-clamp法を適用し、単一細胞からデータ記録を行った。記録用電極には電極内液(K-gluconate 135mM; KCl 5mM; CaCl₂·2H₂O 0.5mM; MgCl₂·6H₂O; 2mM; EGTA 5mM; Mg-ATP 5mM; HEPES 5mM)を充填した先端抵抗5~12MΩの微小ガラス電極を用いた。得られた記録電流はパッチクランプ用アンプ(Molecular Devices社 AXOPATCH 200B)、A/D変換器(Molecular Devices社 DIGIDATA 1440A)、データ記録・解析用ソフト(Axon Instruments社 pClamp 10.0・Synaptosoft社 Mini Analysis Program 6.0.1)を用いて、記録・解析した。膜電位は-70mVに電圧固定した。実験結果は平

均 ± 標準誤差で表し、検定はpaired student's t-testおよびunpaired student's t-testを用いた。危険率5% (P<0.05)をもって有意と判定した。

【結果】

脊髄前角細胞から膜電位固定下(-70mV)に whole-cell patch-clamp法を適用し、記録を行うと、神経終末内に存在するシナプス小胞から神経伝達物質が放出されることによって発生する自発性興奮性シナプス後電流(spontaneous excitatory postsynaptic current : sEPSC)が観察された。sEPSCはグルタミン酸受容体拮抗薬である6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) (10 μM)の投与により完全に消失されることから、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸を介した反応であることが示された。

Clioquinol 100μMの灌流投与を5分間行うと、sEPSCの増強を認めた(Fig.1A)。この増強における頻度の増加は129.9 ± 8.9%で有意な増強であった(P = 0.001)が、振幅の増強は106.0 ± 2.7%で有意差を認めなかった。(P = 0.51) (n = 38)。

次に濃度の変化によるClioquinolのsEPSCに対する増強効果の違いを検討するためにClioquinol 10μMを5分間単独投与したところ、sEPSCは頻度の増加傾向を認めた(110 ± 13.7 %)が有意差は認めなかった(P = 0.47)。一方、振幅の増強は認めなかった(95.8 ± 2.5 % ; P = 0.12) (n = 10)。Clioquinol 10μM投与群とClioquinol 100μM投与群のsEPSCの増加率を比較したところ、100μMの方が有意に強く、ClioquinolのsEPSCの頻度増加作用は濃度依存性であった(Fig.1B)。

次にClioquinolのシナプス前作用を解析するためにNa⁺チャンネル拮抗薬であるテトロドトキシン(tetrodotoxin : TTX)存在下(1μM)でClioquinol 100μMを投与したところ、微小興奮性シナプス後電流(miniature EPSC : mEPSC)の頻度の有意な増幅が観察された(163.0 ±

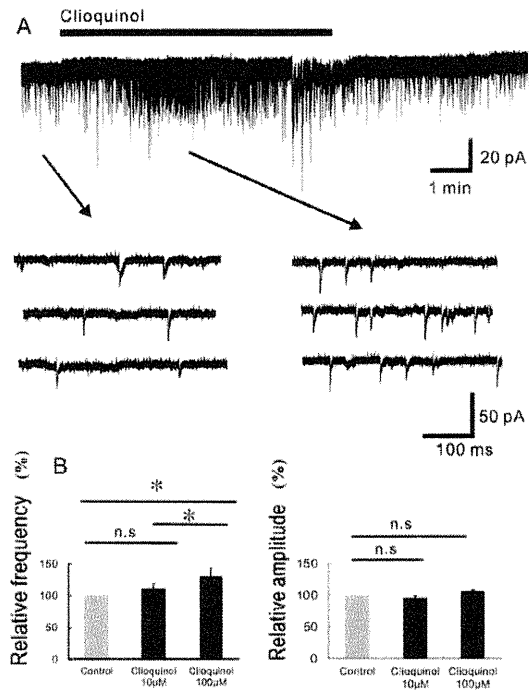


Fig. 1 An effect of Clioquinol on excitatory synaptic transmission in the ventral horn.

- A) A continuous chart recording of sEPSCs before and during the application of Clioquinol (100μM). Three consecutive traces of sEPSCs are shown in an expanded scale in time, before (lower left) and during the application of Clioquinol (100μM). They indicate that the frequency of sEPSCs increased during Clioquinol perfusion compared with those of controls. The average amplitude of sEPSCs did not change by Clioquinol.
- B) Summary of sEPSC frequency (left) and amplitude (right) under the action of Clioquinol 100 μM and Clioquinol 10 μM relative to those in the control. In this and subsequent figures, vertical lines accompanied by bars show SEM. Statistical significance between data shown by bars is indicated by an asterisk; *P < 0.05; n.s., not significant.

17.0%, $P = 0.003$)。一方、振幅に関しては有意な増加は見られなかった($103.3 \pm 2.77\%$, $P = 0.25$) ($n = 12$) (Fig.2A・B)。さらにCNQX存在下ではsEPSCは完全にブロックされ、Clioquinolを投与しても変化はみられなかった($n = 6$) (Fig.2C)。

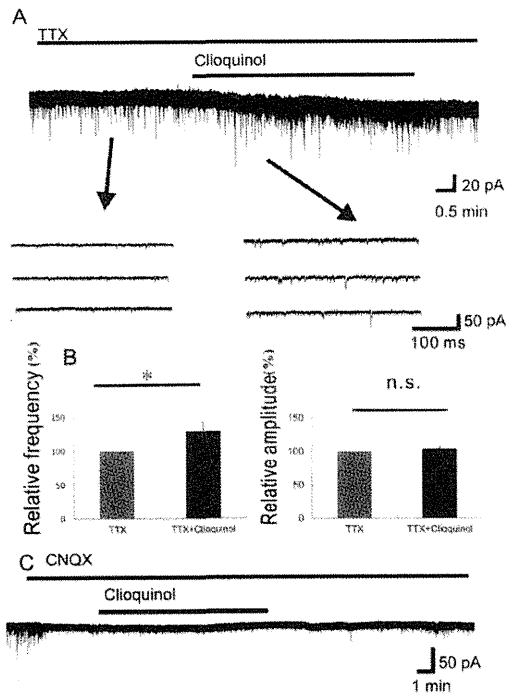


Fig. 2 Analysis of Clioquinol pre-synaptic actions in the ventral horn.

- A) Effect of Clioquinol ($100\mu\text{M}$) on mEPSCs in the presence of TTX ($1\mu\text{M}$). The application of t-BOOH markedly increased the frequency of mEPSCs in the presence of TTX. The average amplitude of mEPSCs did not change by Clioquinol.
- B) Summary of mEPSC frequency (left) and amplitude (right) under the action of Clioquinol relative to those in the control.
- C) Effect of Clioquinol ($100\mu\text{M}$) on sEPSCs in the presence of CNQX ($20\mu\text{M}$). CNQX blocked sEPSCs not only in the absence of Clioquinol, but also in the presence of Clioquinol.

Clioquinolは銅や亜鉛に選択的キレート作用を有し、これがSMONの作用機序に重要であるとの指摘があることから、 ZnCl_2 存在下でClioquinolをキレート化しての投与実験を行った。 ZnCl_2 存在下($10\mu\text{M}$)でのClioquinol投与時のsEPSCは単独投与時と同様に増強を示した(Fig.3A)が、その頻度増加率は、 $163.3 \pm 16.1\%$ であった($P = 0.0008$; $n = 21$)。これはClioquinol $100\mu\text{M}$ 単独投与群と比較した場合、より強く増加していた($P = 0.023$)。一方、振

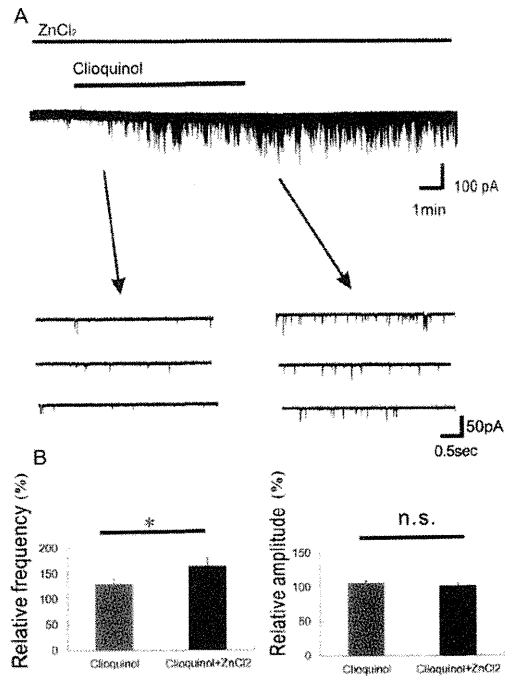


Fig. 3 Analysis of the effect by chelate compound formed of a zinc ion and Clioquinol on excitatory synaptic transmission.

- A) A chelate compound formed of a zinc ion and Clioquinol ($100\mu\text{M}$) significantly increased the frequency of sEPSCs. This effect was larger than that of Clioquinol alone.
- B) Summary of sEPSC frequency (left) and amplitude (right) under the action of a chelate compound formed of a zinc ion and Clioquinol relative to those in the control.

幅には有意な増加はみられなかった(101.4 ± 4.0%; n = 21) (Fig.3B)。

次にClioquinol因性の酸化ストレスの関与を調べるため、活性酸素種(reactive oxygen species : ROS)の非選択的消去剤であるN-tert-Butyl- α -phenylnitron (PBN) によってClioquinolのsEPSC増強作用が抑制できるか検討した。また、ROSはTRPA1受容体を活性化するといくつかの研究から報告されているため、TRPA1の選択的拮抗薬であるA-967079存在下においてまた投与実験を行った。PBN (1mM) 存在下のClioquinol 100 μ M投与時の

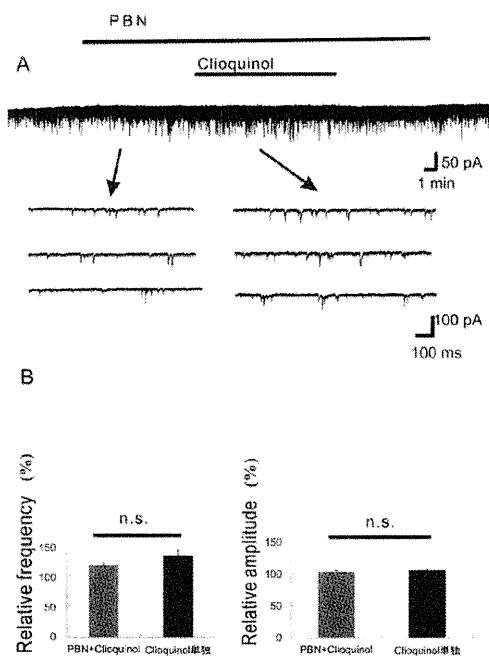


Fig. 4 Analysis of the inhibitory effect by ROS scavenger on Clioquinol-induced enhancement of the sEPSCs frequency.

A) A ROS scavenger, PBN (1mM) could not inhibit Clioquinol-induced sEPSCs enhancement. B) Summary of sEPSC frequency (left) and amplitude (right) under the action of Clioquinol in the presence of PBN relative to those in the control.

sEPSCの頻度の増加率(115.4 ± 3.8%)は単独投与群との間に有意差はなく(P = 0.39)、抑制されなかった。また、振幅においても増加率に有意な差はなかった(P = 0.5) (n = 11) (Fig.4A・B)。次に、A-967079 (100 μ M) 存在下にClioquinol 100 μ Mの投与実験を行ったところ、EPSCの頻度の増加が確認された(126.7 ± 6.9%; P = 0.01) (n = 5)が、Clioquinol単独投与時群の頻度の増加率に対して有意差は認められなかった(P=0.89)。振幅において、有意な増加を認めなかった(103.6 ± 5.2%, P=0.75) (n=5) (Fig.5A・B)。

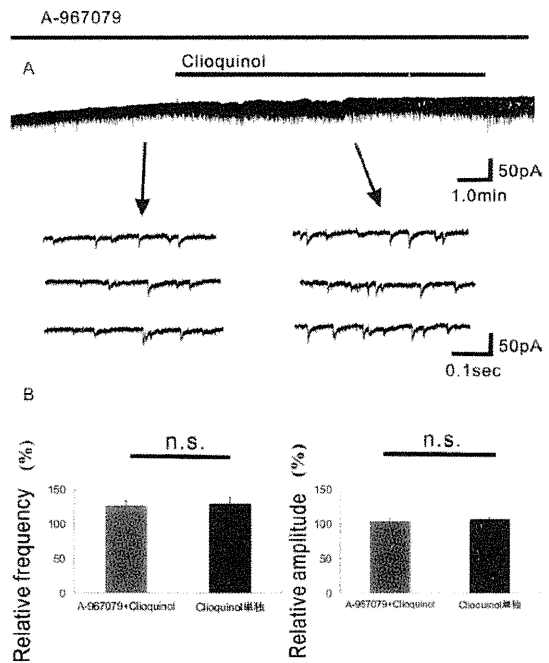


Fig. 5 Analysis of the inhibitory effect by selective TRPA1 antagonist on Clioquinol-induced enhancement of the sEPSCs frequency.

A) A selective TRPA1 antagonist, A-967079 (100 μ M) could not inhibit Clioquinol-induced sEPSCs enhancement. B) Summary of sEPSC frequency (left) and amplitude (right) under the action of Clioquinol in the presence of A-967079 relative to those in the control.

【考察】

今回、脊髄前角細胞にwhole-cell patch-clamp法を適用し、Clioquinolの興奮性シナプス伝達増強作用を解析した。Clioquinolは単独投与により、sEPSCの頻度を増強させたが振幅には影響しなかった。さらにこのClioquinolの増強作用は濃度依存性であることが示された。CNQX存在下ではsEPSCは完全に消失し、Clioquinolにより増強されることはなかった。また、神経終末部における作用を解析するため、NaチャンネルブロッカーであるTTX存在下でClioquinolの作用を解析した。TTX存在下では活動伝播が阻害されるためmEPSCが観察できるが、ClioquinolはTTX存在下においてmEPSCの頻度を増強させ、振幅を変化させることはなかった。以上のことより、Clioquinolは脊髄前角細胞に投射している神経終末部に作用し、グルタミン酸の放出を促進していることが考えられた。SMONにおける麻痺は痙性麻痺であるが、Clioquinolにより神経終末部からのグルタミン酸放出が促進された結果、脊髄前角細胞のsEPSCを増強することによって興奮が持続し、何らかの痙性麻痺の痙性に関与しているのではないかと考えられる。

また、Clioquinolには銅、亜鉛に対して選択的キレート作用があり²、神経細胞の傷害を増強させるということが報告されている。しかし一方で、この選択的キレート作用がアルツハイマー病などの神経変性疾患に効果があると期待されたり³、がん治療においてはClioquinolの有する細胞傷害性と、亜鉛イオンを細胞内に取り込む「亜鉛イオノフォア」の作用が注目されつつある⁴。今回の本研究ではZnCl₂存在下でClioquinolのキレート作用による反応は、Clioquinol単独投与時よりも有意に頻度を増強させた。このことから、Clioquinolのキレート化は脊髄前角において興奮性シナプスの伝達作用をより増強し、痙性麻痺を強くするものではないかと考えられる。

過去に、ClioquinolはミトコンドリアのSOD1活性を阻害し、その結果、ROSが増加しての

細胞障害が指摘されている⁵。ROSは細胞障害だけでなく、シグナル伝達にも関与しており、その受容体の一つにTRPA1が関与していることがいくつかの研究結果より報告されている^{6,7}。我々は過去に脊髄後角において神経終末部のTRPA1をROSが活性化させることで、興奮性神経伝達物質のグルタミン酸の放出を増強する事を報告している⁸。また、Clioquinolが細胞内のカルシウム濃度を高め、TRPA1受容体を活性化させるという報告もある⁹。そこで本研究ではROS Scavenger(消去剤)の一つであるPBN存在下と、TRPA1選択的受容体拮抗薬存在下でClioquinolの作用が阻害されるか解析したが、sEPSCの増強作用が阻害されることはなかった。以上のことより、ClioquinolはROSの産生によるTRPA1の活性化とは別の何らかの機序により神経終末部に作用し、グルタミン酸の放出を増強する可能性があると考えられた。この機序については今後さらなる検討を行っていく予定である。

【結語】

脊髄前角細胞にwhole-cell patch-clamp法を適用し、脊髄前角細胞におけるClioquinolの興奮性シナプス伝達増強作用を解析した。Clioquinolは脊髄前角細胞に入力する線維終末部に作用し、興奮性神経伝達物質グルタミン酸の放出を増強する事が判明した。この作用は濃度依存性でキレート化により増強した。この作用機序はROSやTRPA1とは関連しない機序である可能性が示唆された。

【文献】

1. Asakura K, Ueda A, Kawamura N, et al. : Clioquinol inhibits NGF-induced Trk autophosphorylation and neurite outgrowth in PC12 cells. *Brain Res* 1301 : 110-115, 2009
2. Arbiser JL, Kraeft SK, van Leeuwen R, et al. : Clioquinol-ZincChelate: A Candidate Causative Agent of Subacute Myelo-Optic Neuropathy. *Molecular Medicine* 4 : 665-

- 670, 1998
3. Bareggi SR, Cornelli U : Clioquinol:Review of its Mechanisms of Action and Clinical Uses in Neurodegenerative Disorders. *CNS Neurosciences & Therapeutics* 18 : 41 – 46, 2012
 4. Yu H, Zhou Y, Lind SE, et al. : Clioquinol targets zinc to lysosomes in human cancer cells. *Biochem J* 417 : 133 – 139, 2009
 5. Kawamura K, Kuroda Y, Sogo M, et al. : Superoxide dismutase as a target of clioquinol-induced neurotoxicity *Biochemical and Biophysical Research Communications* 452 : 181 – 185, 2014
 6. Bessac BF, Sivula M, von Hehn CA, et al. : TRPA1 is a major oxidant sensor in murine air-way sensory neurons. *J Clin Invest* 118 : 1899 – 1910, 2008
 7. Andersson DA, Gentry C, Moss S, et al. : Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. *J Neurosci* 28(10) : 2485 – 2494, 2008
 8. Nishio N, Taniguchi W, Sugimura YK, et al. : Reactive oxygen species enhance excitatory synaptic transmission in rat spinal dorsal horn neurons by activating TRPA1 and TRPV1 channels. *Neuroscience* 247 : 201 – 212, 2013
 9. Andersson DA, Gentry C, Moss S, et al. : Clioquinol and pyrithione activate TRPA1 by increasing intracellular Zn^{2+} . *PNAS* 106 : 8374 – 8379, 2009

スモン

subacute myelo-optico-neuropathy

橋本美沙

小長谷正明

定義

スモンとは、亜急性脊髄視神経ニューロパチー(subacute myelo-

optico-neuropathy)の頭文字であるSMONに由来する。

疫学

1955年頃から、日本各地で集団発生し、1970年になって整腸薬キノホルムによる薬害であることが明らかになった。発症患者数は約11,000人とされ、同薬の使用禁止により新規発症患者はほぼなくなった。原因がわかるまで、奇病とされたり感染症が疑われたりな

ど、患者は精神的負担を被ってきた。

原因の特定後は、製薬会社と国の責任が問われ、何年にもわたる訴訟の末、1979年にスモンの原因究明と患者の恒久対策を条件に和解が成立した。

現在、厚生労働省難治性疾患克服研究事業で引き継がれている。

症状

臨床症状(図1)は、腹部症状(腹痛、下痢など)が、おおむね神経症状に先

立つ。下肢末端の異常感覚(ジンジン・ビリビリ感、冷感、痛み、突っ張り感

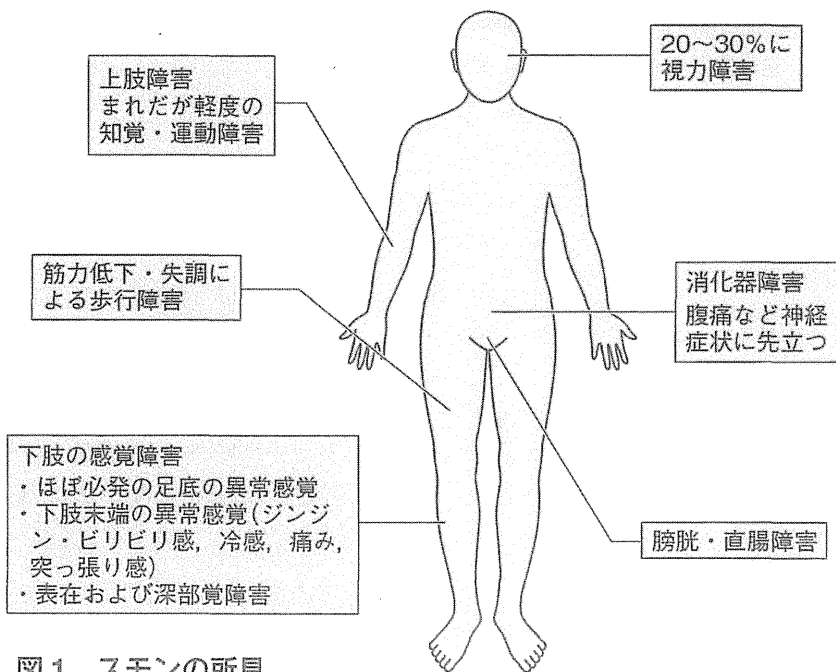


図1 スモンの所見

など)が急性または亜急性に出現し、下肢全体あるいは胸・腹部にまで上行する。下肢の筋力低下、痙性麻痺による運動障害、下肢の深部覚障害による失調を合併し、歩行が障害される。

また、視力障害により、重症例では失明する者もあった。障害は、徐々に回復することが多いが、感覚や歩行、視覚に後遺症を残す患者が多い。

現状

発症後40年以上が経過し、患者の高齢化が進み、スモン本来の後遺症に加えて、高齢化による身体症状を合併し重症化している。スモン罹患後の併発症は、薬害を被った患者を救済し、必

要な医療を補償する考えから、医療費は全額公費負担となっている。

しかし医療機関に十分周知されていないのが問題である。

治療

根本的な治療は困難であり、感覚障害の対症療法が主である。患者の訴えとして特有の感覚障害が多いことを理解し、受容的な対応をする必要がある。

また、不安定歩行・起立による転倒を予防し、日常活動の低下を予防するリハビリテーションも効果的である。

ケアのポイント

スモン患者は発症から長期間が経過し、長年にわたる傷害と療養のために、社会的に孤立していることが多い。高齢化とともに運動器をはじめとする合併症が出現し、看護および介護の必要度が高くなっており、話しやすい環境を作り、訴えに理解を示すことがより良いケアに繋がると考える。

引用・参考文献

- 1) 松岡 幸彦ほか:スモン-Overview-。スモン—神経難病の原点と今日的意義—。神経内科 63(2): 136-140, 2005
- 2) 小長谷 正明:スモン—薬害の原点—。医療 63 (2) : 227-234, 2009

II. 神経難病患者・家族へのかかわり

遺伝性神経難病へのかかわり



- ① 神経内科医は精神科医、地域医療と連携して患者の長期在宅療養をサポートすること、また遺伝カウンセラーと協同して遺伝医療サービスを提供することが望まれる。
- ② 神経内科医、遺伝専門医、遺伝カウンセラー、地域医療・ケア関係者の相互理解と連携を促進するには症例検討会が有効である。
- ③ ハンチントン病や歯状核赤核淡蒼球レイ体萎縮症は重篤な遺伝性疾患であるため、患者や血縁者への病名告知を希望しない家族がある。そのため介護者の想いや血縁者の不安が家族間で共有し難い環境にある。
- ④ ハンチントン病では自殺企図あるいは自殺者は多い。
- ⑤ 2世代にわたる、あるいは複数の同病者を在宅介護している家族がいる。

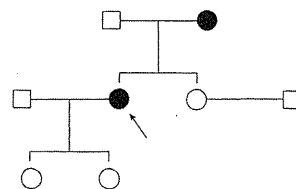
遺伝医学の発展に伴い、神経内科領域の多くの遺伝性疾患でも数ミリリットルの血液採取によって遺伝子変異が確定できるようになった。それに伴い、根本的治療が未だなく対症療法にとどまっている遺伝性神経難病においても、発症者に対して確定診断のための遺伝子検査がなされるようになった。神経内科専門医を対象に行われた調査¹⁾やこれまでの調査（調査1、調査2）と支援経験から、遺伝性神経難病の医療と療養の現状と課題をまとめる。

- ・ 神経内科医は、診断確定に際し、おおむね積極的に遺伝子診断を行っている。
- ・ 発症前診断は、専門的な遺伝医療施設に紹介されることが多い。
- ・ 遺伝カウンセリングと連携した神経内科診療を提供できる施設は限られている。
- ・ 遺伝子検査の結果の告知は容易ではなく、心理的支援が困難な疾患においては、遺伝子診断は消極的な傾向にある。
- ・ 遺伝子検査によって患者と家族に生じる諸問題についての神経内科医の認識は十分ではない。
- ・ 疾患の特異性によって、二世帯にわたって発症した、複数の患者が在宅療養をする家族がいる。
- ・ 遺伝に対する社会的・文化的背景もあって、重篤な患者の医療・療養に関する情報の共有化が困難なことがある。

「神経疾患の遺伝子診断ガイドライン」において遺伝子診断の意義と実施の際の留意点が明らかにされているが²⁾、遺伝学的情報や治療、予後などに関する説明が不十分で、また検査結果がもたらす血縁者や家族への影響も配

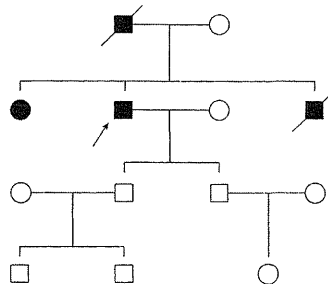
1 症例 1 (52 歳, ハンチントン病の女性)

実母の主治医からハンチントン病の症状、予後、遺伝の説明を受け、在宅介護をしていた。夫とともに行った医療相談会で、担当医師は別室で夫に患者の受診を勧めた。専門病院を受診し、同病と診断された。ADLは自立し、病識は保たれていた。夫の希望で患者への告知はされなかった。



2 症例 2 (70 歳, ハンチントン病の男性)

実父には暴力的言動があったが、患者の妻が在宅介護をした。患者は病識が保たれており、「自分は親父や弟と同じ病気ではないか。親父のように徘徊し、寝たきりになるのではないかと不安、恐怖感を訴えた。妻は患者の不安・精神症状への対応や将来の介護、子どもへの告知などの悩みを訴えた。



慮されずに実施される症例が少なからずみられる。その結果、患者・血縁者・家族間に潜在化していた遺伝に関する問題を顕在化させることにもなった。遺伝子検査によって患者は将来を悲嘆し、その血縁者と家族に発症リスクという将来への大きな不安と苦悩をもたらし、家庭・社会生活の基盤を揺るがすことになった症例もある。遺伝性神経難病の中でも重篤な経過をたどるハンチントン病 (Huntington disease) や 齒状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症 (dentato-rubro-pallido-luysian atrophy: DRPLA) などはその代表的疾患である。

そこでこれらの遺伝性神経難病患者やその血縁者・家族が抱える特異的な課題を示し、遺伝医学と神経内科診療が連携してどのような支援が望まれるかを検討し、支援に向けた取り組みを紹介する。

診療, 在宅療養における課題

これまでに診療したハンチントン病 35 症例や DRPLA とハンチントン病を対象とした 2 つの調査結果をもとに、遺伝と多彩な進行性の症状の視点から神経内科診療や患者・家族の在宅療養における課題を示す。

受診の難しさ

症例 1 (1) において、配偶者と妹は比較的早い時期に症例が発症しているのではと疑いをもっていたが受診の契機を見出せず、初診は発症 4 年後であった。調査 1 では、自らの希望・意思で神経内科に受診した患者は 2 名で、その主訴は「発症しているのではないかと」であった。家族の勧めが 23 名で、発症から診断までの平均期間は 6.5 年であった。このことは医療や在宅福祉

Memo

調査 1

2006 (平成 18) ~ 2013 (平成 25) 年に当院神経内科で診療したハンチントン病患者 29 名 (男性 13 名, 女性 16 名。初診時平均年齢は 49 歳, 平均罹病期間は 11 年, 20 歳未満の発症は 6 名) に対して平成 25 年に行った調査。

サービスの受給や精神症状への治療・対応の遅れに繋がる。

病名告知の難しさ

患者への告知

ハンチントン病の親と同居（介護）し、身近に病状経過を見てきた「at risk」であった患者が発症した症例では舞踏運動や認知症状もごく軽度で病識も保たれていることから、患者の配偶者の意思で告知を見合わせた（症例1；**1**）。「徘徊、暴言・暴力」症状を呈し在宅介護が困難な認知症であった実父と同じ病気ではないかと強い不安・恐怖感を抱いて受診した発症者においても、病名告知はされなかった（症例2；**2**）。

患者の実子への告知

調査2では、成人の実子がいる19名の患者において4名は子どもに病名告知をしていなかった。また、未成年の実子がいる4名ではすべてに病名告知がなされていなかった。症例2においても配偶者は「子どもや子どもの配偶者は遺伝を受け入れないであろう」ことから実子に告知はされていない。告知できない実子やその配偶者などがある家族においては介護者の「想い、介護の大変さ」が家族間で共有されず、「at risk」の発症への不安も共有されないことになる。

療養型病院や福祉施設での療養の難しさと精神科病院

これまでに療養型病院や福祉施設への入院・入所を紹介したが、施設スタッフに「家に帰りたい」「外出したい」とたびたび同じ訴えをしたり、「自分の体が動くのを変な目で見られる」「他の入所者との些細なトラブル」で途中退院・退所となった症例が多かった。また、暴力的言動や自殺企図で在宅困難となり、5名の患者が精神科病院に入院となった。ハンチントン病は中期～末期においては精神症状も安定するため精神科病院を退院し在宅への移行は可能であるが、実際には全例が長期入院となっている。

婚姻

調査1では、ハンチントン病患者がいる25家族において親や兄弟に離婚歴がある患者は11名で、そのうちの7名は離婚理由にハンチントン病が関連していた。成人発症で婚姻した患者の28%は離婚しており、その中で20～49歳に発症した患者では57%が離婚していた。このことから「遺伝」と「若・中年の発症」は家族関係が崩れる大きな要因となっている。

自殺企図・自殺

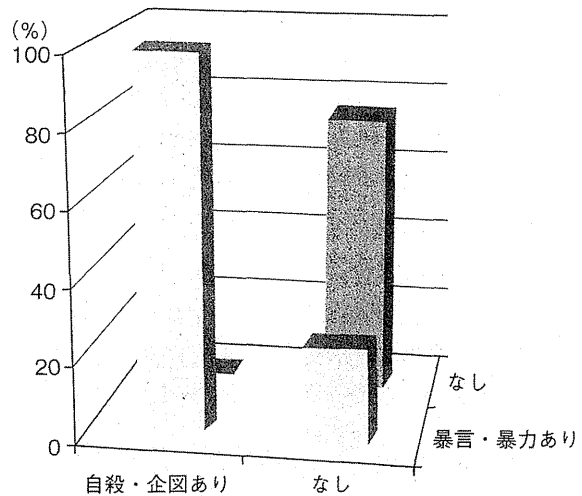
ハンチントン病の自殺率は、患者、実子（at 50% risk）、リスクのない親族、すべてのカテゴリにおいては一般的な米国の人口よりも多かったとの報告がある³⁾。また、診断直前の時期と診断後の自立性が失われつつある時期に自殺のリスクが高まるといわれている⁴⁾。調査2においても、高所から飛び降

Memo

調査2

医療・療養相談会と大阪難病医療情報センター（難病支援団体）に来談したハンチントン病患者30名（男女比1:1.3、平均年齢54歳、すべて成人）の相談記録をもとに2009（平成21）年に行った調査。

③ 精神症状と自殺企図・自殺



調査 1 で患者の 24% に暴言や暴力的行為があり、「自殺企図・自殺」は「暴言・暴力的行為」があった患者に多い傾向がみられた。

りる、大量の洗剤を飲む、などの自殺企図あるいは自殺をした患者数は 7 名 (24%) で、経過中に暴言や暴力的行為のあった患者ではその 60% が自殺企図あるいは自殺者であった。このことから暴言や暴力的行為は自殺のリスクと考えられる (③)。自殺を予知しうるサインや検査は明らかではないが、介護者や患者が信頼をおいている家族にこの知見が理解され、予防に向けた見守りと支えができる環境整備が望まれる。

複数の患者がいる、あるいは世代にわたる在宅介護

著明な表現促進現象を示す DRPLA では、高齢発症者とその実子である若年発症者が同居し、2 名、時には 3 名の同居患者を介護している家族をしばしば経験する。また、症例 2 のように、ハンチントン病の義父を介護した数年後に同病を発症した夫を介護する— 2 世代にわたって在宅介護をする家族もある。このような重篤な経過をたどる遺伝性難病では数世代にわたって介護が続く家族が存在するため、長期間の継続した支援が必要となる。

支援に向けた取り組み

「神経疾患の遺伝子診断ガイドライン」では、遺伝子診断を行うに際しては、遺伝カウンセリングの要点を理解しておく必要があること、また必要に応じて臨床遺伝専門医や認定遺伝カウンセラーなどの専門家と連携してチーム診療を進めることを推奨している。一方、臨床遺伝専門医と認定遺伝カウンセラーを配置し、遺伝カウンセリング実施体制を整えている施設は、全国的には大学病院や臨床遺伝専門医研修施設などに限られており、また多くの場合、遺伝カウンセリング料金は自費となっている。このような現状においては、神経内科医と遺伝専門職とが日常的に連携した診療を進めることができる環境を整え、また患者や家族にとって、遺伝に関することを気軽に繰り返し問

い合わせ、相談できる仕組みを整備する必要がある。さらに、地域医療・ケア関係者と遺伝専門職との連携を図ることも望まれる。

そこで、このような観点から、神経内科医、臨床遺伝専門医、認定遺伝カウンセラー、地域の保健・医療職から成るチーム遺伝医療を促進する事業を始めた。

遺伝性神経難病ケア研究会の設立

神経内科診療と遺伝カウンセリングとの連携、地域ケア関係者の遺伝に関する理解を促進し適切な在宅サービスが導入できるネットワーク作りを目指した。臨床遺伝専門医、神経内科医、認定遺伝カウンセラー、看護師、保健師、臨床心理士など多職種から成る遺伝性神経難病ケア研究会*1を設立した。特に遺伝カウンセリングを身近に受けられるようにするため、大阪近隣の遺伝子医療部門があるすべての施設の臨床遺伝専門医、認定遺伝カウンセラーには世話人や会員として協力していただいた。2003（平成15）年から研究会が主体となって研修会の開催、遺伝性神経難病医療・療養相談会の実施、神経難病の遺伝相談事業などを行っている。

*1
代表 神戸大学大学院医学
研究科神経内科学 戸田達
史

研修会 ― 「遺伝性神経難病のケア」公開講座

研修会は「遺伝」「血縁者（at risk）」「家族関係」「在宅生活」を主な視点として、ロールプレイを交えて症例を提示し、参加者によるグループワークと討論を行っている。第1回～10回は大阪、11回は東京で開催し、これまでに検討した疾患はハンチントン病、DRPLA、遺伝性プリオン病、家族性アミロイド多発ニューロパチー、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（Duchenne muscular dystrophy）、筋強直性ジストロフィーである。全国から医師、遺伝カウンセラー、看護師、保健師、助産師、臨床心理士、医療ソーシャルワーカー（MSW）、学生など多職種が参加し検討を行うため、多角的な視点から患者・家族の抱える課題が明らかとなり、職種間の相互理解と課題の共有化に繋がっている。

遺伝性神経難病医療・療養相談会

大阪府下の特定疾患受給者証が交付されている遺伝性神経難病患者を対象に年1回開催している。主治医と在宅ケア関係者から情報の提供を受け、それをもとに臨床遺伝専門医、神経内科医、臨床遺伝カウンセラー、臨床心理士、保健師、福祉職がチームで相談に当たり、相談結果を主治医や関係者に報告している。来談者の中で相談会後も継続した支援が望まれる症例については遺伝カウンセラー、難病医療専門員と保健師が継続した在宅支援を行っている。相談会は地域遺伝カウンセリングと生活援助を視野に入れた事業と位置づけている。

神経難病の遺伝相談

遺伝性の病気を親戚や身近な人に相談しにくい社会的状況におかれ、地域で閉ざされた療養生活を送っている患者が多いと思われる。患者のみならず、血縁 (at risk) も遺伝に関する不安や悩みを話すことができる機会は非常に少ない。「全国遺伝子医療部門連絡会議」によれば2014 (平成26) 年1月の時点で全国に「遺伝カウンセリング」を行う施設は104施設あるが、いずれも大学病院をはじめとする高度医療機関であり、また遺伝カウンセリングが有料でもあるため、患者・家族がどんなことでも気軽に相談できる現状ではない。そこで遺伝性神経難病の患者と家族、血縁者を対象に「電話や面談による遺伝相談」を開設した。まだ始まったばかりであるが、この事業によって、患者・家族の遺伝に関する事項を含めた課題を整理し、在宅担当者とともに療養環境の改善を図ること、主治医の遺伝に関わるインフォームドコンセントを支援すること、遺伝子診療施設での遺伝カウンセリングと連携することを目指している。

(澤田甚一, 狭間敬憲, 戸田達史)

文献

- 1) 吉田邦広ほか. 神経内科専門医の遺伝子診断に対する意識調査. 臨床神経学 2013; 53: 337-344.
- 2) 日本神経学会 (監修). 「神経疾患の遺伝子診断ガイドライン」作成委員会 (編). 神経疾患の遺伝子診断ガイドライン 2009. 東京: 医学書院; 2009.
- 3) Di Maio L, et al. Suicide risk in Huntington's disease. *J Med Genet* 1993; 30: 293-295.
- 4) Paulsen JS, et al. Critical periods of suicide risk in Huntington's disease. *Am J Psychiatry* 2005; 162: 725-731.

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業
（難治性疾患等政策研究事業（難治性疾患政策研究事業）））
スモンに関する調査研究
平成 27 年度総括・分担研究報告書

発 行 平成 28 年 3 月 31 日
発 行 所 厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業
（難治性疾患等政策研究事業（難治性疾患政策研究事業）））
スモンに関する調査研究班
研究代表者 小長谷 正明
三重県鈴鹿市加佐登 3-2-1
国立病院機構鈴鹿病院
印 刷 株式会社 一誠社
TEL (052) 851-1171 (代)

