

神経内科学教室における研究

松本博之, 千葉 進, 今井富裕,
野中道夫, 久原 真

札幌医科大学医学部神経内科

Introduction of Current Research Activities in Neurology Department

Hiroyuki MATSUMOTO, Susumu CHIBA, Tomihiro IMAI
Michio NONAKA, Shin HISAHARA

Department of Neurology, Sapporo Medical University School of Medicine

ABSTRACT

Our main research interests have been focused on (1) phrenic nerve conduction velocity in transient phrenic nerve palsy after cardiopulmonary surgery and age-related changes; the palmar cutaneous branch of the median nerve in carpal tunnel syndrome; and transcranial magnetic stimulation study on neck flexion to detect the prognosis in Hirayama disease, (2) non-invasive respiratory care using volume-cycled ventilators in various neurological disorders including amyotrophic lateral sclerosis and multiple system atrophy, (3) pathophysiological roles of *Helicobacter pylori*-derived antibodies in immune-mediated peripheral (Guillain-Barré syndrome and Fisher syndrome) and central (multiple sclerosis) nerve diseases with emphasis on vacuolating cytotoxins of *Helicobacter pylori* and heat shock proteins, (4) functional analyses of NAD-dependent histone deacetylase SIRT in the central nervous system.

(Accepted November 26, 2004)

Key words: Nerve conduction study, Non-invasive respiratory care, Immune-mediated neurological disease, *Helicobacter pylori*, NDA-dependent histone deacetylase, SIRT

はじめに

神経内科学教室の研究は、臨床に基づきその成果が臨床の場で患者さんに還元できることを意図して行ってきた。その意味において症例を大切に診断と治療にあたることもまた臨床研究の一部をなすが、ここでは現在われわれが体系的に進行している主な研究について紹介したい。

1 病態を探る電気生理学的研究 (今井富裕講師担当)

1・1 ヒトの横隔神経伝導の生理と臨床応用

横隔神経伝導検査は患者の呼吸状態を評価する上で非常に重要な電気生理学的診断法である。はじめにわれわれは正常対象における横隔神経活動電位の胸壁上電位分布を調べ、それに基づいて最も臨床応用しやすい電極配置を決定した。ついで加齢による横隔神経伝導速度の変化を調べ、新生児や乳児まで横隔神経伝導検査の適応年齢を広げた¹⁾。2004年にはその臨床応用として乳児の胸部外科手術後に一過性にみられる横隔神経麻痺について報告した²⁾。現在、

老年期の横隔神経活動電位が加齢によってどのように変化するかに着目している。

1・2 正中神経にみられる特殊な絞扼性神経障害

これまで手根管症候群において手掌枝は正常対照の神経側枝であり、臨床的にその障害が問題になるのは主に術後合併症としてであった。ところが、最近われわれは術前からある確率で母指基部の感覚障害を訴える手根管症候群患者が存在し、その中で手掌枝のSNAPに異常が検出される症例は手掌枝の絞扼が合併していることを明らかにしてきた^{3, 4)}。現在更なるデータを蓄積中であるが、今のところ本電気診断法の sensitivity は 75% であり、specificity は 100% である。

1・3 経頭蓋的磁気刺激運動誘発電位から推定できる平山病の治療予後

平山病の発症機序として、頸椎前屈時の頸髄—頸椎の不均衡、あるいは硬膜管などの形態的变化が重要視されてきた。しかし、これまで頸椎前屈によって実際に下行性伝導

路に機能的障害が生じるのかどうかは必ずしも明らかになっていなかった。われわれは頸椎前屈による罹患肢の経頭蓋的磁気刺激運動誘発電位 (MEP) の変化から漸減型⁵⁾と漸増型⁶⁾が存在することを報告した。平山病では進行期に頸椎カラーを装着することが推奨されているが、必ずしも頸椎カラーが症状の進行防止に有効なわけではなく、カラー装着時にその有効性が予め推定できることが望ましい。われわれの研究から前述の MEP 所見は頸椎カラーの有効性を推定する指標になりうる可能性が明らかになってきた。すなわち、頸椎前屈時に漸減型 MEP を示した症例は頸椎カラーを装着しても症状の改善は乏しく、逆に漸増型 MEP を示した症例には頸椎カラーは有効で、症状進行の停止さらには機能回復が期待できると考えられた。現在、この仮説を検証するため症例を集積している。

2 神経疾患の呼吸管理 (野中道夫助手担当)

神経変性疾患のほとんどは未だ有効な治療法が見いだされていない。疾患の進行に伴って生じてくる問題点のひとつとして呼吸障害があるが、呼吸障害があると、機能予後とくに生命予後が極めて不良となる。通常の気管切開による人工呼吸器を装着することは、患者さんの QOL の観点からみると大きな問題点をはらんでいる。そのため、非侵襲的陽圧人工呼吸 (NPPV) の検討が重要であると考えている。

2・1 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) における NPPV

ALS における NPPV の装着は、球症状により困難であることが多い。しかし、開放系の呼吸療法である NPPV の特徴を理解し、従来使われてきた BiPAP などの従圧式呼吸器に代えて従量式呼吸器を用いることにより適応の拡大が可能となる。従量式呼吸器を使用しマスクや設定の工夫をしたわれわれの経験では、MI-E を併用した排痰介助で有効な呼吸補助が可能となり、呼吸器感染症を繰り返す球症状の強い症例でも呼吸不全の改善に加えて発熱、炎症反応の陽性頻度が明らかに減少した。すなわち、従量式呼吸器の使用は、球症状の強い ALS についても NPPV の装着を可能にすると考えられる⁷⁾。

2・2 多系統萎縮症の睡眠時声帯開大障害の病態生理と治療法の研究

睡眠時に吸気性喘鳴に伴って酸素飽和度が低下する多系統萎縮症 (MSA) において、propofol による導眠下で声帯開大障害の評価を行うとともに NPPV の効果を検討した。覚醒時においても全例で声帯開大制限があり、導眠すると声帯は奇異性運動を示した。導眠下での陽圧に対する声帯の状態から治療圧を設定し、NPPV を導入したところ、吸気性喘鳴の消失、酸素飽和度の正常化に伴い、睡眠構築の改善を認めた。MSA の伴う睡眠時声帯開大障害に対して NPPV は有効であり、導入にあたって導眠下での評価が

重要であると考えられた。

3 免疫性末梢神経・神経根障害の病態に関する研究 (千葉 進 助教授担当)

3・1 *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 感染と末梢神経・神経根障害

末梢神経・神経根障害と免疫異常との関連では、近年、Guillain-Barré 症候群 (GBS) における抗糖脂質抗体の役割が注目され、とりわけ、*Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) の先行感染が、抗 GM1、GQ1b 抗体などの抗糖脂質抗体の産生を促し、発症に関与するとされる。一方、GBS は運動神経優位の髄鞘障害を呈する脱髄型 (acute inflammatory demyelinating polyneuropathy)、運動神経優位の軸索障害を呈する軸索型 (acute motor axonal neuropathy)、軽度の感覚障害も加わる acute motor sensory axonal neuropathy、小脳失調、外眼筋麻痺を中核症状とする Fisher 症候群 (FS) に分類される。欧米の GBS の約 80% が脱髄型であるが、日本では軸索型が相対的に多く、脱髄・軸索型ともに約 35% とされ、地域により病型が異なる。抗糖脂質抗体の発見は、GBS の病態解明に大きな進歩をもたらしたが、これら抗体の検出率は GBS の 70% 未満であり、抗体陽性例は圧倒的に軸索型が多いことも判明した。従って、現時点では脱髄型 GBS の病態が最も良くわかっていない。

われわれは *C. jejuni* にきわめて近縁な *H. pylori* 感染と末梢神経・神経根障害に何らかの関連がある可能性に着目して検討した。

3・1・1 *H. pylori* 粗抗原および分画抗原を用いた検討

H. pylori 粗抗原、heat shock protein (HSP)、urease B (UB) の分画抗原を用いて SDS-PAGE を行い、患者髄液を一次抗体としてウエスタンブロットで検討し、GBS 7 例中 4 例で *H. pylori* 抗原の分子量 50-65kDa、約 90kDa、約 120kDa の複数の蛋白に対する IgG 抗体を検出した。さらに HSP、UB いずれにも特異的に反応する IgG 抗体も検出した。90kDa の蛋白は空胞化毒素 (VacA) と推測されたが、その時点では確認しえなかった。一方、*C. jejuni* 抗原との交叉抗原性は検出されなかった⁸⁾。

3・1・2 *H. pylori* の VacA を用いた検討

GBS の生理学的異常として、ランビエ絞輪におけるイオンチャンネルの障害が指摘され、さらに VacA のアミノ酸配列の一部が、ヒトを含む種々の動物のイオンチャンネル構成蛋白と部分的分子相同性を持つことが明らかにされたことから、約 90kDa の蛋白は VacA と推測し、それに対する抗体が GBS での病的意義を持つ可能性を考えた。そこでわれわれは、リコンビナント VacA (r-VacA) を抗原としたウエスタンブロットで検討し、GBS の髄液中に明らかに r-VacA を認識する特異抗体を検出した。次いで、電気生理、髄液検査を共に施行した 13 例の患者髄液を用いて検索

したところ、6例で髄液中抗 VacA 抗体が陽性で、興味深いことに全例が脱髄型 GBS であった⁹⁾。従って、GBS の髄液中抗 VacA 抗体は、分子相同性を持つランビエ絞輪でのイオンチャンネル、ないしは未知の標的分子を障害し、脱髄型 GBS の病態に関与する可能性が推測された。

3・1・3 GBS 患者の胃粘膜から分離した *H. pylori* の VacA とヒト末梢神経・根組織との分子相同性の検討

脱髄型 GBS と確定診断され、髄液中抗 r-VacA 抗体を検出した男性2例を対象とした。胃粘膜より分離・培養した *H. pylori* を用い、PCR によりそれぞれの VacA の塩基配列、アミノ酸配列を同定した。標準株、HP60190 を含む4種の菌株との間に一部にアミノ酸の置換をみたものの、明らかな変異は認めなかった。しかし、相同性解析により、signal sequence 下流域のアミノ酸配列の一部と、ヒト (Na^+/K^+) ATPase α subunit の細胞内ドメインの一部とに不連続ながらアミノ酸7個の一致を認め、さらにその C 末側に、ミエリン P0 蛋白の細胞外ドメインと不連続に4個(うち3個は連続)のアミノ酸が一致する配列も検出された。現在、これらの蛋白を精製・分離し、GBS 患者髄液に検出された抗 VacA 抗体との反応性を検討中である。

3・1・4 FS の一部患者髄液中にも抗 VacA IgG 抗体が検出される

GBS の亜型である FS12 例の髄液を用い、抗 VacA 抗体の検出を試みた。r-VacA ないしは native VacA を抗原とし、ウエスタンブロットで検討したところ、FS 8 例の髄液中に VacA に特異的に反応する IgG 抗体を検出した。髄液中抗 VacA 抗体は、末梢神経のみならず、脳幹・小脳のイオンチャンネルも機能的に障害し、FS の病態に関与する可能性が推測された¹⁰⁾。

3・2 免疫性末梢神経疾患患者における抗 HSP 抗体の検索

HSP は熱や活性酸素などのストレスに誘導される分子シャペロンの機能をもつ一連の蛋白質群であり、変性蛋白の除去を促進し細胞を防御する。また、HSP はある種の自己免疫疾患における抗体の標的分子として、一方、抗 HSP 抗体は局所の免疫応答を修飾する重要な因子として注目される。われわれは、GBS、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー (CIDP) 患者の血清・髄液中の複数の HSP に対する抗体の検出を試みた。

3・2・1 GBS における髄液中の抗 HSP 抗体の検討

GBS、多発性硬化症 (MS)、運動ニューロン疾患 (MND) 患者の髄液、GBS 患者と健常者の血清を用い、HSP60 family, HSP27 family, HSP70 family, HSP90 を含む 10 種類の抗原とし、ELISA 法で各疾患群間の抗体価を比較検討した。その結果、GBS では MND に比較し、哺乳類、細菌の由来を問わず、すべての HSP に対する

髄液中抗体の有意な上昇を認めた。さらに、HSP27 family, HSP60 family に対する抗体は、MS に対しても有意に高値を示した。一方、血清ではいずれの HSP に対する抗体も GBS と健常者間に有意な差はなかった。従って、GBS の髄液中の抗 HSP 特異抗体は、GBS 発症に関わる免疫応答に重要な役割を果たす可能性が推測された¹¹⁾。

3・2・2 CIDP 患者の血清および髄液中の抗 HSP 抗体の検討

CIDP についても髄液・血清中の抗 HSP 抗体を測定した。CIDP9 例の血清・髄液、MND の髄液、健常者の血清を用い、GBS と同様に 10 種類の HSP を抗原とした ELISA 法により検討した。CIDP 髄液では、HSP27 family 3 種類すべてと HSP70, HSP90 に対する抗体が MND に比較し有意な上昇をみた。一方、血清では 10 種類全ての HSP に対する抗体においても CIDP と健常者との間に差は認めなかった。これらの事実から、CIDP においても特定の HSP に対する特異抗体が病態に関与する可能性が示唆されたが、高値を示す抗 HSP 抗体は GBS で高値を示した抗 HSP 抗体と一部重複するものの、GBS と異なり、細菌由来の HSP に対する抗体が検出されなかった点が特徴的であった。

4 NAD 依存的ヒストン脱アセチル化酵素 (SIRT) の神経系細胞における機能解析 (久原 真薬理学兼務助手担当)

SIRT は NDA 依存的に活性を有する新しいタイプのヒストン脱アセチル化酵素で、哺乳類には7つのファミリー分子が同定されている。ヒストンを脱アセチル化することでヒストンの立体構造を変化させ下流遺伝子の転写を抑制的に制御することが知られている。最近の研究によりこれとは別に p53, Foxo3a, MyoD, NcoR などの転写因子あるいは転写関連分子に直接結合することで細胞増殖、細胞死、細胞周期、(筋・脂肪などの)細胞分化に重要な役割を果たしていることが明らかになったがその一方で神経系における機能についてはほとんど報告がない。われわれは薬理学講座堀尾嘉幸教授らと共同で成体・胎生マウスの中枢神経における主に SIRT1 ならびに SIRT3 の発現と機能を検討している。SIRT1, 3 共に前脳側脳室 subventricular zone に発現が強く、さらに種々のマーカーなどとの組織化学的検討でこれらが神経幹細胞ないしは未分化神経系細胞で発現していることを見出した¹²⁾。SIRT ファミリーが同細胞の自己複製能(増殖)と多分化能に機能していると考え neurosphere assay にて野生型ないしはドミナントネガティブ型 SIRT の強制発現などの実験系を行ったところ両者に関与することを示唆するデータを得た。従って SIRT が未分化神経系細胞の増殖・分化に果たす役割は重要であると考えている。今後は生化学的に神経系において SIRT が制御する分子を同定してその生理的メカニズムをさらに詳細に明らかにすると共に脳梗塞モデルや脱髄モデルなどでの SIRT を

介する神経疾患の病態生理についても検討していく予定である。

おわりに

われわれが研究を進めている (1) 電気生理学的研究, (2) 神経疾患の呼吸管理, (3) 免疫性神経疾患に関する研究, (4) NAD 依存的ヒストン脱アセチル化酵素の神経系細胞における機能解析, についてその概要を紹介した。

参考文献

1. Imai T, Shizukawa H, Imaizumi H, Shichinohe Y, Sato M, Kikuchi S, Hachiro Y, Ito M, Kashiwagi M, Chiba S, Matsumoto H. Phrenic nerve conduction in infancy and early childhood. *Muscle Nerve* 2000; 23: 915-918.
2. Imai T, Shizukawa H, Imaizumi H, Matsumoto H. Transient phrenic nerve palsy after cardiac operation in infants. *Clin Neurophysiol* 2004; 115: 1469-1472.
3. Imai T, Wada T, Matsumoto H. Entrapment neuropathy of the palmar cutaneous branch of the median nerve in carpal tunnel syndrome. *Clin Neurophysiol* 2004; 115: 2514-2517.
4. 今井富裕, 和田卓郎, 松本博之, 静川裕彦, 小松崎文一. 手根管症候群における正中神経手掌枝障害の合併について. *臨床脳波* 2004; 46: 329-333.
5. 静川裕彦, 今井富裕, 小林信義, 千葉 進, 松本博之. 頸椎前屈によって運動誘発電位に変化を生じた平山病の1例. *臨床神経* 1994; 34: 500-503.
6. Imai T, Shizukawa H, Nakanishi K, Kouge N, Hiura K, Kashiwagi M, Chiba S, Matsumoto H. Hyperexcitability of cervical motor neurons during neck flexion in patients with Hirayama disease. *Electromyogr clin Neurophysiol* 2000; 40: 11-15.
7. Nonaka M, Kashiwagi M, Imai T, Chiba S, Matsumoto H, Yuasa H, Ishii Y. Efficiency of non-invasive ventilation using volume-cycled ventilators for bulbar amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 2001; 187 Suppl 1: S162.
8. Chiba S, Sugiyama T, Matsumoto H, Hisano K, Awakawa T, Hiura K, Saitoh M, Imai K. Antibodies against *Helicobacter pylori* were detected in the cerebrospinal fluid obtained from patients with Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurol* 1998; 44: 684-686.
9. Chiba S, Sugiyama T, Yonekura K, Tanaka S, Matsumoto H, Fujii N, Ebisu S, Sekiguchi K. An antibody to VacA of *Helicobacter Pylori* in cerebrospinal fluid from patients with Guillain-Barré syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiat* 2002; 73: 76-78.
10. Chiba S, Sugiyama T, Yonekura K, Tanaka S, Matsumoto H, Fujii N, Yokota S, Hirayama T. An antibody to VacA of *Helicobacter pylori* in the CSF of patients with Miller-Fisher syndrome. *Neurology* 2004; 63: 2184-2186.
11. Yonekura K, Yokota S, Tanaka S, Kubota H, Fujii N, Matsumoto H, Chiba S. Prevalence of anti-heat shock protein in cerebrospinal fluids of patients with Guillain-Barré syndrome. *J Neuroimmunol* 2004; 156: 204-209.
12. Hisahara S, Chiba S, Matsumoto H, Horio Y. NAD-dependent histone deacetylase SIRT (Sir 2 α). *J Pharmacol Sci*. In press 2005.