

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 8 月 28 日現在

機関番号：34438

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590967

研究課題名（和文）紀伊筋萎縮性側索硬化症における金属イオンと酸化ストレス障害

研究課題名（英文）Transitional metal and oxidative stress in Kii ALS

研究代表者 紀平 為子 (Kihira Tameko)

(関西医療大学・保健医療学部・教授)

研究者番号：30225015

研究成果の概要（和文）：**目的**. 紀伊半島南部（K 地域）で多発する筋萎縮性側索硬化症(ALS)の発症関連要因を検討した。**方法**. K 地域 ALS 患者と住民の血清・頭髪の元素分析、酸化ストレスマーカー(8-OHdG)の測定、飲用水の元素分析、生活習慣のアンケート調査を実施した。**結果**. 当地 ALS 患者では血清 Ca/Zn 低値、尿中 8-OHdG 高値、頭髪で遷移元素の高値を認め、当地住民でも同様の傾向であった。飲用水は Ca が低値であった。**結論**. 当地 ALS 患者で低 Ca 状態と遷移元素の蓄積、酸化ストレス増加が認められ、発症との関連が推察された。

研究成果の概要（英文）：

Objective. The aim of this study is to investigate a possible association between the transitional metals from environment/lifestyle and oxidative stress of patients with ALS in the K (Kozagawa/Kushimoto) area. **Methods.** Metal contents of the drinking water, serum and hair of patients with ALS and residents in this area were measured. **Results.** We found that the Ca content in the drinking water is low and that the serum levels of Ca and Zn in the residents and patients with ALS in this area were significantly lower, while the oxidative stress markers were significantly higher, than those of the controls. The Mn and V contents of scalp hair from the patients with ALS (n = 7) were significantly higher than those of controls (p < 0.05). The changes of lifestyle including westernization of eating habits were found in this area by the questionnaire. These changes might play a role in decreasing oxidative stress. **Conclusions.** We suggest that the low levels of Ca and Zn are possibly associated with an increase in oxidative stress in patients with ALS in this area, although the causative relationship is not clear. This is a cross-sectional study, and a prospective study is needed in the future.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|----------|-----------|
| H22 年度 | 2,800,000 | 840,000 | 3,640,000 |
| H23 年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| H24 年度 | 200,000 | 60,000 | 260,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3700,000 | 1110,000 | 4810,000 |

研究分野：基礎研究

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学 7206

キーワード：紀伊 ALS, 金属イオン、酸化ストレス、環境要因

1. 研究開始当初の背景

1911年、三浦謹之助により紀伊半島で筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の多発が報告され、その後1960年代に紀伊半島南部、グアム島、西ニューギニアにALSの集積発症が発見された。当時、紀伊半島Kz地区では欧米に比してALS有病率が100-150倍高いと報告された(八瀬1972)。1980年代以降多発地区のALS発症率は減少し、グアム島では消失が報告された(R Garruto, 1985)。この疫学調査結果から、多発地ALS発症と環境要因の関連が推察されたため、地区の土壌や水質の調査がなされた。その結果、これらALS多発地の河川水、飲用水ではカルシウム(Ca)・マグネシウム(Mg)含量の低値が認められた。

我々は紀伊半島のALS症例について継続的に疫学調査と臨床経過観察を行ってきた。紀伊半島南部地区では、1980年代にALS発症率は一旦低下したが、その後の調査でやはり他地域より発症率が高いことが認められた。2000年以降これまで発症の認められなかったKu町0地区に新たな発症例が確認され、Kz/Ku地区(旧Ko町を含む、以降Kz, Ku, Ko地区を総称してK地区とする)における2000年から2008年間の年平均粗発症率は5.7/10万人(全国の一般的な発症率は0.4-2.6/10万人)で、紀伊半島ではALS多発が現在も継続し、さらに多発地域の拡大が推察された(紀平ら2010)。2000年以降の調査では、ALS発症者の男女比が逆転し、女性の調整発症率増加、発症年齢の高齢化が認められた。本地区では1950-70年代には、山林・漁業従事などの労働条件や生活様式に由来する身体的負荷、頸椎症、外傷、重金属への曝露、これらと関連した酸化ストレスが多かったと推察されるが、このような外的要因の変化が特に男性の調整発症率低下に寄与したと考えられた。一方で、最近の女性の調整発症率増加から、地区内にとどまって暮らすことの多い女性に当地区の発症関連要因がより強く作用したと考えられた。我々は、0地区に多発が拡大したのは、同地区の水源が1975年以降Kz水系から取水していることに関連すると考え、Ca摂取不足による必須元素の平衡異常と有害元素の吸収増加による酸化ストレス増大が神経細胞変性脱落の一つの要因ではないかと推察した。

2. 研究の目的

本研究では、上記仮説の検証のため、K地区内の水質調査を実施し、発症との関連を検討する。さらに、症例および多発地住民において、血清中元素の変化と酸化ストレスマーカーにつき検討する。また、低Ca・Mg食投与実験動物において酸化ストレスマーカーの変化について免疫組織学的に明らかにすることを目的とする。

1) 期間内に明らかにすること

(1) K地区、対照地区の水質調査を行う。

(2) K地区ALS症例(Kii ALS)の発症要因の検討を、特に元素の特徴に注目し行う。

(3) 多発地住民の元素分析と生活・食習慣の特徴、特に酸化ストレスとの関連を検討する。

(4) Ca/Mg欠乏食を慢性投与した実験動物で、DNAの酸化ストレスマーカーである

8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OHdG)と細胞外Ca濃度に反応して細胞内濃度の調整を行うとされるCa-sensing receptorの発現について免疫組織学的に検討する。

3. 研究の方法

1) K地区、対照地区の水質調査

(1) 地区の水質調査

Kz地区、K地区内0地区、対照地区(1970年から2009年までALSの発症が認められない和歌山県内山間部地区)の河川水、飲用水、井戸水、わき水を採取し、元素分析を行った。検査項目は、Ca、Mg、アルミニウム(Al)、鉄(Fe)、銅(Cu)、亜鉛(Zn)、鉛(Pb)、マンガン(Mn)、セレン(Se)、水銀(Hg)、モリブデン(Mo)とした。

2) Kii ALSの発症要因の検討

①症例の集積

K地区のALS症例について医療機関や在宅訪問により診察を行い、臨床症状の把握と経過観察を実施した。特に最近発症が新たに認められる0地区の症例を集積した。

②Kii ALS症例の追跡調査と元素分析

患者の承諾を得て、既往歴や職業、金属曝露と必須元素欠乏の有無など発症前データを追跡し集積するとともに、患者の生化学検査と元素分析(血清および頭髪)を実施した。調査項目は、血糖、必須・微量元素、アルブミン、CaおよびCa代謝関連物質、8-OHdGなどとした。

有害元素の体内蓄積を検討するため、放射化

分析 (Neutron Activation Analysis, NAA) による毛髪中元素分析を行った。NAA は京都大学原子炉実験所の研究用原子炉気送管 Pn-1 で熱中性子束を照射し実施した。短寿命核種では2分間照射後直ちに測定、長寿命核種は120分照射、約1ヵ月の冷却後測定した。ゲルマニウム検出器と波高分析器を用いて計測された γ 線スペクトルからピーク面積を Covell 法で算出、標準試料との比較法で定量した。

3) 多発地住民の検討

①住民の生化学データの集積と元素分析

対象は、K 地区内 O 地区および対照地区住民とした。住民検診を実施し、問診、採血、採尿、頭髪の採取を実施した。質問・検査項目は、職業、金属暴露の有無、生活・食習慣アンケート、血糖、血清および頭髪の必須・微量元素、アルブミン、尿中 8-OHdG 測定などとした。

②住民の生活・食習慣と酸化的ストレス

K 地区内 O 地区と対照地区住民を対象に、生活・食習慣のアンケート調査を実施した。K 地区で ALS が最も多発していた1960年代と現在を比較して生活・食習慣の違いについて2項選択による63項目の質問に思い出しによる回答を求めた。住民の身体測定、神経学的診察結果、生化学検査結果と生活・食習慣の回答とを統計学的に解析し、多発地住民の特徴と酸化的ストレスとの関連を検討した。血清中元素濃度および尿中 8-OHdG など生化学検査は H22-24 年度中に実施、毛髪の元素分析は H23-24 年度中に実施した。

4) 実験動物での検討

筆者らが以前実施した Ca/Mg 欠乏食 (正常の 1/3 量) の慢性投与実験で採取したマウス神経組織の保存パラフィンサンプルを使用し、抗 8-OHdG 抗体と抗 CaSR 抗体を用い免疫染色を行った。

4. 研究成果

1) K 地区の水質調査

(1) K地区の水道水のCa濃度は、対照に比し低値(約1/4)であることが確認された。

(2) K地区内O地区でも水道水のZnとCa含量が極めて低いことが認められた。O地区では従来飲用水として利用していた河川水、井戸水およびわき水(天水を含む)のCa, Mg濃度は対照と同様であった。

2) K地区ALS症例の追跡調査と元素分析

(1) 発症率の検討

K地区の2000年-2009年の年平均粗発症率は 6.42/10万人、O地区では 25.5/10万人であった。

この値は日本の他地域に比して高値であった。

(2) Kii ALS 症例の特徴

近年、家族性ALSのみでなく弧発性ALSにおいても遺伝子異常が報告され、ALSは不均一な疾患と考えられつつある。K地域のALSが均一な疾患かどうかを明らかにすることは、当地域での多発の要因を検討する上で重要と考えられる。このため、K地域のALS症例の追跡調査記録から1950-2011年間のK地区出身ALS患者を抽出し、臨床的特徴を検討した。その結果、該当するALS患者58例(男性 33名、女性 25名、男女比 1.32)を認めた。発症時年齢には、40歳代(若年発症)と60歳代(高齢発症)に2峰性のピークが認められた。近年は若年発症者の占める割合が減少し、高齢発症者の割合の増加が認められた(図1)。

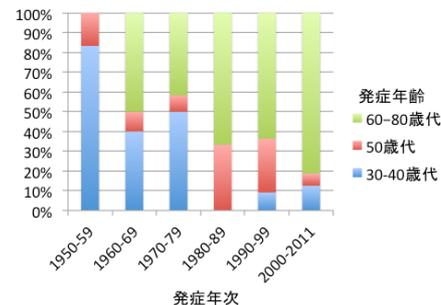


図1. 発症年齢別の症例数の推移

家族歴は、パーキンソン病の家族歴を含めると 24.1%に認められ、臨床表現型はALS症状に認知症や精神症状、パーキンソン症状などを示す例が約 26%に認められた。このようにK地区ALSは、幅広い臨床スペクトラムを示しており、臨床的に不均一な疾患を含むと考えられた。また、近年の発症年齢の高齢化から環境要因の発症への関与が強く示唆された。

(3) Kii ALS患者血清中の元素分析

血清元素分析では、K地区のALS患者では対照に比し血清中CaとZnの有意な低値(図2)、酸化的ストレスのマーカーとされるCu/Zn比の高値、DNAの酸化的ストレスマーカーである尿中8-OHdG高値が認められた(図3)。当地区のALS患者では、酸化的ストレスが増大している可能性が示唆された。これが発症要因と関連するか更に検討が必要である。

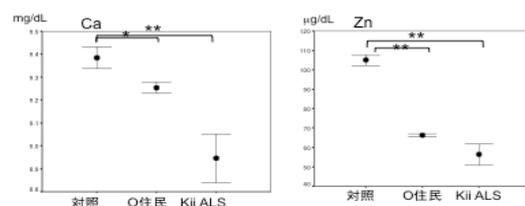


図2. Kii ALS と多発地住民の血清元素

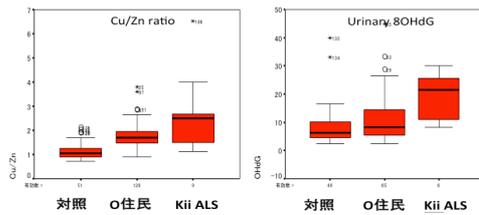


図3. Kii ALSと多発地住民の酸化ストレス

(4) Kii ALS 患者頭髪の元素分析

頭髪の元素分析は、パーマなどの処理をしていない Kii ALS 症例(7例)、対照(19例)、O住民(86名)、K地域以外の孤発性 ALS 症例(10例)で実施した。Kii ALS 症例では対照に比し、毛髪中 V と Mn および Mg が高値を示した ($p < 0.05$)。

(5) Kii ALS 患者剖検脳の免疫染色

神経細胞の低Caによる影響を検討するため Kii ALS 剖検脳脊髄組織において、CaSR および 8-OHdG に対する抗体を使用して免疫染色を行った。一部の脊髄前角神経細胞で、抗CaSR抗体と抗8-OHdG抗体に陽性所見を認めたが、染色性は一定ではなかった。この意義については今後さらに多数例で検討し判断する必要がある。

3) 多発地住民の元素分析および生活・食習慣と酸化ストレスの検討

(1) 住民の血清元素分析と酸化ストレス

K地区内O地区住民の血清元素分析では、CaとZnが対照に比し有意な低値を示し、Cu/Zn比が有意な高値を示した。O地区住民では、血清Zn低値、相対的なCu高値による酸化ストレス増大が推察された。尿中8-OHdGはO地区住民で対照に比し軽度高値であったが、24時間尿に換算した調整8-OHdG値では対照と有意差を認めなかった。

(2) 住民の頭髪元素分析

K地区内O地区住民では対照に比し頭髪中 Mg と Hg の有意な高値を認めた ($p < 0.05$)。

(3) 生活・食習慣と頭髪中元素濃度の関連

K地区内O地区住民で漬け物の摂取が多い者に有意に毛髪中 V や Mn が高く、また畑仕事が多い者に毛髪中 Al 高値が認められた。

(4) 生活・食習慣の変化と酸化ストレス

K地区内O地区住民71名(男性15、女性56、 76.2 ± 8.2 歳)、対照地区住民10名に生活・食習慣に関するアンケート調査を実施した(回収率100%)。O地区住民の食品摂取頻度調査では、摂取頻度が1960年頃に比し現在20%以上減少した食品として、ごはん、漬け物、味噌汁、海藻が挙げられ、一方20%以上増加した食品として、食パン、野菜サラダ、卵料理、乳製品が挙げられた。1960年頃O地区では卵料理・乳製品の摂取頻度が対照地区に比し低い傾向であった。魚介類・干物や煮野菜はO地区住民の80%

が当時も現在も「よく食べた(食べる)」と回答した。食品の入手方法としてスーパーマーケット利用が約30%増加し、仕事の頻度は、力仕事や漁業、林業、水田が20%以上減少した。飲用水として現在井戸水の利用は1.4%と減少し、水道水の利用は87.3%と著明に増加した。現在野菜サラダを「よく食べる」と回答した住民は「滅多に食べない」と回答した住民に比べ、体重、身長、握力で高値を、嗅覚検査で高得点を示した(各々 $p < 0.05$)。現在「卵料理はあまり食べない」および「干物をよく食べる」と回答した住民では尿中8-OHdGの高値が認められた(図4)

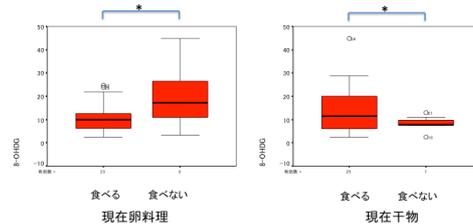


図4. 食習慣と8-OHdG

これらの結果については、思い出しによる回答であることを考慮し判断する必要があるが、K地区では1960年代に比し現在は、食品の欧米化、食品調達の広域化が進み、また林業や漁業が減少し重労働の軽減化があると考えられた。一方、水道水利用が普及し飲用水からの必須元素の摂取は近年減少が推察された。乳製品の摂取増加など食生活の変化で代償されうると考えられるが、今後は高齢化による生活・食習慣の変化についてさらなる継続的調査が必要である。

4) 低Ca/Mg食慢性投与マウスの検討

低Ca/Mg食慢性投与マウスの脳と脊髄の保存パラフィン包埋サンプルを使用し、抗CaSR抗体および抗8-OHdG抗体免疫染色を行ったが、免疫染色性にばらつきがあった。この低Ca/Mg食慢性投与実験では、組織学的検討で脳皮質細胞の減少と脊髄前角に神経原線維の異常蓄積が認められ、既に報告した(Kihira et al, 2002)。食物や飲用水からのCaなど必須元素不足状態下での酸化ストレスについて今後さらに検討が必要である。

以上本研究では、K地区のALS患者において血清中Caの著明な低値と毛髪中遷移元素の増加および酸化ストレスマーカーの上昇が認められ、低Ca状態による有害金属の体内蓄積、これによる酸化ストレスの増加が推察された。当地の住民にも血清Ca低値と酸化ストレスマーカーの軽度の上昇が認められた。生活・食習慣の変化による蛋白質・抗酸化物質・ビタミン類の摂取量の増加や激しい身体負荷の軽減が

ALS の危険因子とされる酸化ストレスや外傷を軽減する要因として作用し、発症率低下と発症の遅延に寄与した可能性が推察された。これらがどのように本症発症に関連するか今後更に検討する必要がある。

本研究の一部は、平成 22-23 年度厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業「牟婁病の実態の把握と治療指針作成（研究代表者小久保康昌）」および平成 24 年度同「三重県南部に多発する家族性認知症-パーキンソン症候群 発症因子の探索と治療介入研究（研究代表者小久保康昌）」から研究費助成をうけ当該報告書に報告した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

1. T Kihira, K Okamoto, S Yoshida, et al. Environmental Characteristics and Oxidative Stress of Inhabitants and Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis in a High-incidence Area on the Kii Peninsula, Japan. 2013 Internal Medicine in press. 査読あり
2. T Kihira, I Sakurai, S Yoshida, et al. Neutron activation analysis for trace elements in scalp hair from ALS patients and residents of the Kii Peninsula, Japan. Amyotrophic Lateral Sclerosis 2012, 13, S1: 126-134. 査読あり
3. T Kihira, S Yoshida, T Kondo, et al. An increase in ALS incidence on the Kii Peninsula, 1960-2009: A possible link to change in drinking water source. Amyotrophic Lateral Sclerosis, 2012; 13: 347-350. 査読あり
4. Ishiura H, Takahashi Y, Mitsui J, Yoshida S, Kihira T, et al. C9ORF72 repeat expansion in amyotrophic lateral sclerosis in the Kii Peninsula of Japan. C9ORF72 repeat expansion in ALS. Arch Neurol. 2012; 69: 1154-8. Jun 4:1-5. 査読あり
5. Naruse H, Takahashi Y, Kihira T, Yoshida S, et al. Mutational analysis of familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis with OPTN mutations in Japanese population. Amyotroph Lateral Scler. 2012; 13: 562-6. Jun 18. 査読あり
6. 紀平為子, 岡本和士, 吉田宗平, 他. 神経難病患者・介護者における補完代替医療利用の実態調査. 日本補完代替医療学会誌 8: 11-16, 2011. 査読あり
7. 紀平為子, 岡本和士, 吉田宗平, 他. 和歌山県内筋萎縮性側索硬化症多発地における元素の特徴に関する疫学的検討. 神経内科 2010, 73, 507-512. 査読あり
8. 紀平為子, 吉田宗平, 村田顕也, 他. 紀伊半島南部地域における筋萎縮性側索硬化症-和歌山県内多発地域における最近の発症率の推移と臨床像の変化. BRAIN and NERVE, 2010; 62: 72-80. 査読あり

[学会発表] (計 10 件)

1. 紀平為子, 岡本和士, 吉田宗平, 他. 紀伊半島南部 ALS 多発地域における生活・食習慣の変化に関する検討. 日本神経学会総会、東京、2013 年 6 月 1 日.
2. Okamoto K, Kihira T, Egami I, et al. Was dried fish a trigger of high-incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Kii Peninsula, Japan? 23rd International symposium on ALS/MND, Chicago, USA, 5 December-7 December 2012.
3. 紀平為子, 櫻井威織, 吉田宗平, 他. 多発地 ALS・PDC の環境要因の検討-放射化分析による毛髪中元素濃度定量-. 第53回神経学会総会、東京、2012年 5月24日.
4. T Kihira, Iori S, S Yoshida, et al. Neutron activation analysis for trace elements in scalp hair from ALS patients and residents of the Kii Peninsula, Japan. 23rd International symposium on ALS/MND, Chicago, USA, 5 December - 7 December 2012.
5. Okamoto K, Kihira T, Kuzuhara S, Kokubo Y. Predictors of increase in severity among Japanese amyotrophic lateral sclerosis patients by discriminant analysis. 22nd International Symposium on ALS/MND. Sydney Australia 30 November - 2 December 2011
6. T Kihira, M Hironishi, K Kobayashi, et al. Chronological shift in neuropathological findings of patients with ALS in Wakayama Prefecture on the Kii Peninsula. 22nd International Symposium on ALS/MND. Sydney, Australia, 30 November - 2 December 2011.
7. 紀平為子, 廣西昌也, 小林喜和, 吉田宗平, 他. 和歌山県内多発地 ALS における神経原線維変化と老人斑. 第 52 回日本神経病理学会、2011

年、6月2～4日、京都。

8. 紀平為子、吉田宗平、近藤哲哉、他. 大島地区でのALS疫学調査-第1報. 第52回日本神経学会総会. 2011年5月16日、名古屋.

9. T Kihira, S Yoshida, T Kondo, K Okamoto, et al. A follow-up study on ALS in the Koza/Kozagawa/Kushimoto focus area of the Kii Peninsula from the 1960s to the 2000s: A new cluster of ALS. 21st International Symposium on ALS/MND. Orlando, USA 11 - 13 December 2010

10. 紀平為子、吉田宗平、石口宏、他. W県内筋萎縮性側索硬化症多発地における発症率の推移と環境要因の検討. 第51回日本神経学会総会、2010年、5月20日、横浜.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

紀平 為子 (KIHIRA TAMEKO)
関西医療大学・保健医療学部・教授
研究者番号：30225015

(2) 研究分担者

吉田 宗平 (YOSHIDA SOHEI)
関西医療大学・保健医療学部・教授
研究者番号：30166954
岡本 和士 (OKAMOTO KAZUSHI)
愛知県立大学・看護学部・教授
研究者番号：60148319