

厚生科学研究研究費補助金

脳科学研究事業

乳幼児期に生じるけいれん発作の病態と治療に関する研究

平成 12 年 総括・分担研究報告書

主任研究者 飯沼 一字

平成 13 年（2001 年） 4 月

目次

I. 総括研究報告	
乳幼児期に生じるけいれん発作の病態と治療に関する研究 飯沼 一字	1
II. 分担研究報告	
1. 皮質形成異常症の新技术を用いた機能解析 飯沼 一字	9
2. グリシン脳症モデルマウスの作成とその解析 呉 繁夫	20
3. 新生児ラットにおける皮質てんかんモデルに関する研究 田中 達也	28
4. 幼若脳におけるクロライド・コトランスポーター遺伝子発現の特殊性 佐藤 康二	33
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	38
IV. 研究成果の刊行物・別刷	

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

総括研究報告書

乳幼児期に生じるけいれん発作の病態と治療に関する研究

主任研究者 飯沼 一字（東北大学医学部）

分担研究者 呉 繁夫（東北大学医学部）、田中 達也（旭川医科大学）、

佐藤 康二（浜松医科大学）

研究要旨 乳幼児期に生じるけいれんの特徴と、その物質的背景を解明するため、本年度は新生児期から激裂なけいれんを生じるグリシン脳症モデルラットの開発、ラットの成熟段階におけるクロライド・コトランスポーターの mRNA の発現様式、けいれん誘発物質であるカイニン酸を新生児ラットに局所注入することによる皮質形成異常の作成、皮質形成異常症の一つである band heterotopia 症例の新技术による脳機能の解析を行った。

グリシン脳症の原因であるグリシン開裂系酵素のドミナント・ネガティブ効果をもつ遺伝子を導入することによるトランスジェニックマウスでグリシン脳症のモデルを作成した。得られた 10 系統のうち 4 系統について、脳内グリシン濃度、および行動学的観察を行った。第一の系統は生後 1 週間後から振戦などの症状を呈し、生後 3 カ月までに 40%が死亡した。生き残ったマウスはその後症状を示していない。もう一つの系統はすべてのマウスが妊娠後期ないしは生後すぐに死亡した。他の 2 系統は 3 カ月の観察期間で何の症状も示さなかった。

クロライド・コトランスポーター KCC1、KCC2、NKCC1 について胎児から成獣までのラット脳内での遺伝子 mRNA の発現について in situ hybridization 法を用いて検討した。KCC2mRNA の発現はほぼ脳全体にわたっており、しかも神経細胞特異的であった。KCC2 を介したクロライドの汲み出しが大部分の神経細胞にとって非常に重要であることを示唆する。特に嗅球での成熟段階の KCC2mRNA の発現は、嗅球の神経細胞の中でも成熟の早い順に発現が観察された。KCC2 を発現して細胞内フロライドを低値に保てること、換言すれば GABA に対して抑制性に応答できることが、成熟神経細胞にとって重要であることを示唆している。

新生児ラットのカイニン酸を大脳皮質局所に注入すると、全身けいれんを起こした。脳病理組織では注入部位の周囲に層構造の異常、異常神経細胞の出現といった皮質形成異常が認められた。これはカイニン酸注入により、速やかに二次性全般化てんかん性興奮が起こり、正常な神経細胞の移動が障害されたためと考えられた。

皮質形成異常の特異型である band heterotopia 症例で、MRS、fMRI、MEG による脳機能解析を行った。表層の皮質と深層の灰白質では細胞構成成分は同様と考えられた。また fMRI による運動野同定、SEF による感覚野同定では、健常人に推定される部位の表層の皮質に同定された。しかし、てんかん性放電を MEG で検索した結果、深層の灰白質にその電流源が推定された。細胞構成成分は同様でも正常機能である運動や感覚は皮質で、異常興奮活動は異所性灰白質で営まれていることが示唆された。

本年度は各分担研究者の 4 面からけいれん発現とその抑制機序の基盤となる知見が得られた。

A. 研究目的

乳幼児に発症するけいれんは難治のものが少なくなく、未熟脳では興奮性の亢進と、抑制性の未熟さが基盤にあると考えられる。乳幼児期のけいれんの特徴と難治化の物質的基盤を解明するため、グリシン脳症モデルマウスの作成、新生児ラットへのカイニン酸注入による皮質形成異常モデルを作成し、これらの興奮性と抑制性の機序を解明する。またクロライド・コトランスポーターが抑制性機序に重要な関与があることから、この遺伝子発現を胎児から成獣に至るさまざまな段階のラットで検討する。けいれん発現、抑制機序に関与する種々の受容体や、特に脳に存在するトランスポーターなどの動態を検討し、グリシン脳症および皮質形成異常モデルでのこれらの脳関連物質の動態を解析する。特に幼若期におけるこれらの脳関連物質の変化が、乳幼児期けいれんの難治化に関与しているかを評価する。われわれの作成したモデル動物では、その異常の物質的基盤が既知であるので、それと脳関連物質との関与を解析する上で、有用である。

さらに皮質形成異常症の臨床例での局所の興奮性などを SPECT、fMRI、MRS、MEG などの新しい脳機能解析技術を用いて検討する。手術での摘出例については摘出材料について、動物モデルで得られた脳関連物質の動態を解析する。

B. 研究方法

グリシン開裂系 (GCS) に対するドミナント・ネガティブ変異をもった変異酵素の遺伝子をマウスに導入するが、一組の loxP に挟まれた部分に蛍光蛋白を組み込み、このままではドミナント・ネガティブ効果を発揮しないマウスと Cre 組換え酵素をもったマウスを掛け合わせると、蛍光蛋白部分は抜け落ちるため蛍光は発せず、ドミナン

ト・ネガティブ効果を発揮する。このようにして数系統のマウス系を樹立し、それぞれの系のグリシン開裂系酵素の残存活性を測定し、同時に脳内グリシン濃度を測定し、これらを種々の実験に供する。

胎児期から成獣に至るまでの種々の段階のラット脳の各部位におけるクロライド・コトランスポーターである KCC1、KCC2、NKCC1mRNA の発現を検討する。まずコトランスポーターにそれぞれ特異的な cDNA プローブを作成した。さまざまな段階のラット脳を取り出し、クライオスタットで 20 μ m の切片を作成し、上記のプローブをハイブリダイズし、オートラジオグラフィ法にて観察した。脳内各部位特に嗅球について上記遺伝子の発現を成熟段階毎に検討した。

ハロセン麻酔下に新生児ラットの大脳皮質にカイニン酸 0.5 μ g または 1 μ g を注入した。Bregma から側方 3mm 前方 2mm の部位に 27G の注射針で頭皮上から頭蓋を穿孔し、その後同部位に径 0.3mm のステンレスパイプを頭皮から 3mm 刺入してカイニン酸を注入した。その 1 ヶ月および 2 ヶ月後に深麻酔下に 10%ホルマリンで灌流後、ラット脳を取り出し、病理組織を観察した。

皮質形成異常症例に対して MRS を用いて、皮質と形成異常部の NAA/Cr 比および Cho/Cr 比を求め、神経細胞成分、および膜成分の構成を推測した。また fMRI を用いて、手の把握運動をさせ、血液量の増加から運動野の同定を行った。MEG を用いて正中神経電気刺激による感覚野の同定を行うと同時に、自発てんかん放電の電流源推定を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験についてはそれぞれの施設の動物実験倫理指針に則って行った。

臨床症例については、今回研究を行った

各種の検査は非侵襲的ではあるが、検査方法、検査の意義、検査の危険性、好ましからざる状況について十分に説明をし、患者本人および保護者から文書での承諾を得た。

C. 研究結果

GCS に対してドミナント・ネガティブ効果を持つ遺伝子を導入したマウスの系統樹立に成功した。得られたトランスジェニックマウスは 10 系統で、このうち、本年度は 4 系統の表現型を解析した。第一の系統 G11-1 は生後 1 週後から振戦などの症状を呈し、生後 3 か月までに 40% が死亡した。生き残ったマウスはその後、特に症状を示さず現在観察を続けている。もう一つの系統 G15-5 は、すべてのマウスが妊娠後期ないしは生後すぐに死亡した。他の 2 系統に関しては 3 カ月の観察期間では特に症状を示さなかった。脳内グリシン含量が高い 2 系統のマウスを用い検索を進めた。まず、24 時間の基礎運動量を調べてみると、2 系統共に対照マウスに比べて基礎運動量が増加しており、多動であることが判明した。また、電撃により誘発されるけいれんの持続時間を測定した。その結果、これらのマウスは対照マウスに比し有意に長いけいれん持続時間を持ち、けいれん閾値が低かった。

クロライド・コトランスポーター KCC1、KCC2、NKCC1 の mRNA 発現を成熟ラット脳全体で検討したところ、KCC2 mRNA の発現は、ほぼ脳全体にわたっており、しかも神経細胞特異的であった。しかし、視交叉上核、視床下部室傍核、視床網様核などいくつかの領域で、KCC2 mRNA を全く発現していない神経細胞が発見された。ついで生直後から成熟に至るラット嗅球におけるクロライド・コトランスポーター遺伝子の発現変動を検討した。その結果、KCC2 の遺伝子発現はまず一番初めに、嗅球の神

経細胞の中で最も早く成熟する僧帽細胞に見られた。これまでに³H の取り込み実験によって記載されている順に KCC2 の遺伝子発現は観察された。

新生児ラットへのカイニン酸注入による脳組織(肉眼的所見、HE 染色、cresyl violet 染色)の検討では、注入部位の周囲に層構造が不規則に乱れており、核が濃染しているものや形態が奇異な神経細胞の出現といった皮質形成異常が認められた。

皮質形成異常の一特殊型である band heterotopia 症例において、手の把握運動による fMRI では健常人の運動野と推定される部位に血流の増加を認め、MRS では NAA/Cr 比および Cho/Cr 比は共に浅層も深層も同程度の値をとり、神経細胞、膜成分共に同様の細胞成分を有していると推測された。MEG では正中神経刺激による SEF は健常人で推定される一次感覚野に出現した。自発的棘波放電は深層の heterotopia に認められた。

D. 考察

グリシン脳症モデルマウス G11-1 は、約 60% の産仔しか成獣にならず、けいれんや振戦などの症状が認められることから乳幼児発症型のモデルと考えられる。G15-5 は、新生児死亡や妊娠後期の流産が認められることから、新生児発症型のモデルと考えられる。グリシン脳症の症状は新生児期に最も激しく、それを乗り越えると意識障害やけいれんの程度が軽減することが知られている。このマウスは、その状況をよく反映するものと考えられる。この系統は、現在保有するモデルマウスの中で最も症状が強いと考えられ、ヒトにおける新生児型のモデルマウスと考えられる。

クロライド・コトランスポーターの実験では、KCC2 を介したクロライド汲み出し機構が、大部分の神経細胞にとって非常に

重要であることを示唆している。これらの神経細胞では、その特殊な生理的作用のため細胞内クロライドが異なる系によって調節されていることが推定される。KCC2の遺伝子発現と各々の神経細胞の成熟の程度は正の相関を有することを示唆しており、KCC2を発現して細胞内クロライド濃度を低く保てるのが、換言すればGABAに対して抑制性に応答できることが、成熟神経細胞にとって必須であることを示唆している。

新生児ラットへのカイニン酸注入実験では、カイニン酸注入後に全身けいれんを起こすが、大脳皮質でかん性興奮が速やかに二次性全般化を起こしたものと考えられた。この神経細胞の過剰興奮の結果、正常な神経細胞の移動が起こらなくなり、皮質形成異常に至ったものと考えられた。

Band heterotopiaでは、浅層も深層も灰白質では同様の細胞成分が存在すると考えられるが、正常機能は浅層で、異常機能は深層で営まれていると考えられた。皮質形成異常症で、形成異常を呈している灰白質で異常興奮が確認された。

E. 結論

グリシン脳症モデルマウスを作成し、種々の脳内高グリシン濃度の系統を樹立してきた。これらの中で、生後早期から易けいれん性を有する系統が確認された。

クロライド・コトランスポーターKCC2mRNAは成熟に伴って、神経細胞の成熟の順序に従って発現した。発達段階においてクロライド汲み出し機構が重要な要素であることが推測された。

カイニン酸注入によって局所の皮質形成異常が作成された。これはけいれん物質カイニン酸により局所神経細胞の過剰興奮が速やかに全般化することによって、神経細胞移動の障害が起こるためと考えられた。

Band heterotopia 症例では浅層の皮質で正常機能、深層の heterotopia で異常放電が起こっていることが確認された。異所性灰白質が異常興奮を引き起こしていることが患者で確認された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

飯沼一字. 痙攣のPET「症候から診断へ・第4集」(編集:上島国利、鴨下重彦)日本医師会, 東京, p16, 2001.

飯沼一字. 学会名改定検討委員会からのメッセージ「神経機能検査の進歩と小児への応用」. 臨床神経生理学 28: 405-406, 2000.

飯沼一字. 2. 成長・発達・加齢に伴う注意すべき徴候 7. 痙攣. 「症候から診断へ・第4集」(編集:上島国利、鴨下重彦)日本医師会, 東京, pp129-133, 2001.

呉 繁夫

「非ケトーシス型高グリシン血症」
先天異常症候群辞典、日本臨床社(印刷中)

Togashi N., Haginoya, K., Munakata, M., Kato, R., Yokoyama, H. & Iinuma, K. Image analysis of intractable epilepsy: 18F-FDG PET scan of the cortical dysplasia. CYRIC Annual Report 1999, 151-154, 2000.

Haginoya, K., Kon, K., Yokoyama, H., Tanaka, S., Kato, R., Munakata, M., Yagi, T., Takayanagi, M., Yoshihara, Y., Nagai, M., Yamazaki, T., Maruoka, S. & Iinuma, K. The perfusion defect seen with SPECT

in West syndrome is not correlated with seizure prognosis or developmental outcome. *Brain Dev.* 22, 16-23, 2000.

Kure S, Kanako K, Kudo T, Kanno K, Aoki Y, Suzuki Y, Shinka T, Sakata Y, Narisawa K, and Matsubara Y. Chromosomal localization, structure, single nucleotide polymorphisms, and expression of human H-protein gene of the glycine cleavage system (*GCSH*), a candidate gene for nonketotic hyperglycinemia. *J Hum Genet* (in press)

Takayanagi M, Kure S, Tada K, Sakata Y, Kurihara Y, Ohya Y, Kajita M, Tada K, Matsubara Y, Narisawa K. Human glycine decarboxylase (GLCD) gene and its processed type pseudogene: Structures, expression, and identification of a large deletion in a family with nonketotic hyperglycinemia. *Human Genet* 2000;106:298-305.

Kure S, Hou DC, Suzuki Y, Yamagishi A, Hiratsuka M, Fukuda T, Sugie H, Kondo N, Matsubara Y, Narisawa K. Glycogen storage disease type Ib without neutropenia. *J Pediatr* 2000;137:253-256.

Kudo T, Ikeda K, Kure S, Matsubara Y, Oshima T, Kawase T, Narisawa K, Takasaka T. New common mutation in the Connexin 26 gene (*GJB2*) in childhood deafness in the Japanese population. *Am J Med Genet* 2000;90:141-145.

Fujii K, Matsubara Y, Akanuma J, Takahashi K, Kure S, Suzuki Y, Imaizumi

M, Iinuma K, Sakatsme O, Rinaldo P, Kuniaki Narisawa. Mutation detection by TaqMan-allele specific amplification: its application to the molecular diagnosis of glycogen storage disease type Ia and medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Hum Mutation* 2000;15:189-196.

Mizugaki M, Hiratsuka M, Agatsuma Y, Matsubara Y, Fujii K, Kure S, Narisawa K. Rapid detection of CYP2C18 genotypes by real-time fluorescence polymerase chain reaction. *J Pharm Pharmacol* 2000;52:199-205.

Akanuma J, Nishigaki T, Matsubara Y, Fujii K, Takahashi K, Kure S, Suzuki Y, Ohura T, Miyabayashi S, Oagawa E, Iinuma K, Inui K, Okada S, Narisawa K. Molecular diagnosis of 50 Japanese patients with glycogen storage disease type Ia: three mutations in the glucose-6-phosphatase gene account for 96% of mutant alleles. *Am J Med Genet* 2000;91:107-112.

Takahashi K, Akanuma J, Matsubara Y, Fujii K, Kure S, Suzuki Y, Wataya K, Sakamoto O, Aoki Y, Ohura T, Miyabayashi S, Narisawa K. Heterogeneity of mutations in the glucose-6-phosphatase gene in Japanese patients with glycogen storage disease type Ia. *Am J Med Genet* 2000;92:90-94.

Senoo M, Matsubara Y, Fujii K, Nagasaki Y, Hiratsuka M, Kure S, Uehara S, Okamura K, Narisawa K. Adenovirus-mediated in utero gene transfer in mice and guinea pigs: tissue distribution of recombinant

adenovirus determined by quantitative TaqMan PCR assay. *Mol Genet Metab* 2000;69:269-276.

Yong X, Aoki Y, Li X, Sakamoto O, Hiratsuka M, Gibson KM, Kure S, Narisawa K, Matsubara Y, Suzuki Y. Haplotype analysis suggests that the two predominant mutations in Japanese patients with holocarboxylase synthetase deficiency are founder mutations. *J Hum Genet* 2000;45:358-362.

Tanaka T, Hashizume K, Sawamura A, Yoshida K, Takano k, Hodozuka A, Nakai H. Influence of basal ganglia upon seizure propagation of the kainic acid-induced focal epilepsy
Epilepsia, 41(Suppl 7): 26-27, 2000

Tanaka T, Hashizume K, Kunimoto M, Maeda T, Hodozuka A, Nakai H.
Multiple subpial transection versus callosal section in the treatment of experimentally induced cortical focal seizures
In: *Epilepsy Surgery, 2nd Edition*, (Eds) H O Luders and Y Comair, Bermedica Production, Maryland, 2000, pp 801-806

Hashizume K, Kiriyama K, Kunimoto M, Maeda T, Tanaka T, Miyamoto A, Miyokawa N, Fukuhara M: Correlation of EEG, neuroimaging and histopathology in an epilepsy patient with diffuse cortical dysplasia
Child's Nervous System 16(2): 75-79, 2000.

Hashizume, K, Tanaka T: Antiepileptic

effect of nefiracetam on kainic acid-induced limbic seizure in rats. *Epilepsy Research* 39(3): 221-228, 2000.

Hashizume, K, Tanaka T, T. Fujita, S. Tanaka
Generalized seizures induced by an epileptic focus in the mesencephalic reticular formation: Impact on the understanding of the generalizing mechanism
Stereotact Funct Neurosurg 74:153-160, 2000

Masahiro K, Koji O, Kanna K, Takeshi K, and Kohji S. Developmental changes in GABA transporter (GAT1, GAT3) mRNA expressions in the rat olfactory bulb. *Dev. Brain Res.* 126 (2001) 137-145.
Differential expression patterns of three glutamate transporters (GLAST, GLT1 and EAAC1) in the rat main olfactory bulb

Makio U, Koji O, Hiroyuki O, Kohji S. and Masaya T. *Mol. Brain Res.* in press

Kanaka, K. Ohno, A. Okabe, K. Kuriyama, T. Itoh, A. Fukuda, and Sato K.
The differential expression patterns of messenger RNAs encoding K-Cl cotransporters (KCC1,2) and Na-K-2Cl cotransporter (NKCC1) in the rat nervous system.
Neuroscience, in press

2. 学会発表

横山浩之、呉 繁夫、甲田三恵子、成澤邦明、飯沼一字

「Non-ketotic hyperglycemia(NKH)を

デルマウスの易けいれん性」

第 42 回日本小児神経学会 大阪 2000 年
6 月 8 - 10 日

呉 繁夫、横山浩之、甲田三恵子、

飯沼一字、成澤邦明

「Non-ketotic hyperglycemia(NKH)モ
デルマウスの作成」

第 42 回日本小児神経学会 大阪 2000 年
6 月 8 - 10 日

北村太郎、宗形光敏、萩野谷和裕、

飯沼一字

「幼弱ラット大脳皮質神経細胞における
Phenylethylamine の作用」

第 42 回日本小児神経学会 大阪 2000 年
6 月 8 - 10 日

石飛真美子、宗形光敏、中里信和、

飯沼一字

「Band heterotopia における正常および
異常機能の局在について」

第 42 回日本小児神経学会 大阪 2000 年
6 月 8 - 10 日

富樫紀子、萩野谷和裕、宗形光敏、

加藤里恵、横山浩之、飯沼一字

「小児難治てんかんの画像解析—¹⁸F-FDG
PET による大脳皮質形成異常の検討—」

第 42 回日本小児神経学会 大阪 2000 年
6 月 8 - 10 日

ZY Li, K Iinuma, T Watanabe, K Yanai.

「Role of histamine H1 receptor in the
development of pentylenetetrazole-
kindling: A study of H1 receptor knockout
mice」

第 42 回日本小児神経学会 大阪 2000 年
6 月 8 - 10 日

飯沼一字

【特】「中枢ヒスタミン神経系と小児痙攣」
第 17 回奈良エPILEプシークラブ 奈良
2001 年 1 月 20 日

飯沼一字

【特】「機能的画像解析と小児神経学」
第 21 回山口県小児神経研究会 小郡
2001 年 3 月 3 日

佐藤康二

KCC1, KCC2, NKCC1 の遺伝子のラット脳
内における発現

平成 12 年度 日本解剖学会中部地方会

Ishitobi, M., Munakata, M., Nakasato, N.,
Inoue, T. & Iinuma, K. Localization
of normal and abnormal function in
patients with band heterotopia. 12th
International Conference on
Biomagnetism. Espoo, Finland, Aug.
13-17, 2000.

Iinuma, K. Central histaminergic
system and childhood convulsion. 50th
Korean Pediatric Society. Seoul, Korea,
October 20, 2000.

Ishitobi, M., Munakata, M., Nakasato, N.,
Inoue, T. & Iinuma, K.

Localization of normal and abnormal
function in patients with band
heterotopia.

12th International Conference on
Biomagnetism.
Espoo, Finland, Aug. 13-17, 2000.

Iinuma, K.

Central histaminergic system and
childhood convulsion.

50th Korean Pediatric Society.

Seoul, Korea, Oct. 20, 2000

Tanaka T, Hashizume K, Maeda T, Sawamura
A, Hodozuka A, Nakai H.

Generalized seizure status induced by an
epileptic focus in the mesencephalic
reticular formation: Impact to
understand the generalizing mechanism.

American Epilepsy Society, Annual
Meeting, Orlando, December 1999

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

皮質形成異常症の新技术を用いた機能解析

主任研究者 飯沼 一字（東北大学大学院医学系研究科小児病態学分野教授）

研究協力者 萩野谷 和裕、横山 浩之、北村 太郎、

石飛 真美子、広瀬 三恵子（東北大学医学部）

研究要旨 Band heterotopia は胎児期の神経芽細胞の移動障害のため、一部の神経細胞が表層の皮質まで到達せずに途中で停まってしまうことによって、最終的に到達した皮質と、その皮質下白質の下に更にもう一層の帯状の厚い灰白質が構築されるものである。これは圧倒的に女性に多く、運動障害はあまりなく、軽度の精神遅滞と難治てんかんを持つものが多い。表層の皮質と内層灰白質に関心領域を設定して MRS を検討した結果、表層も内層も NAA/Cr 比および Cho/Cr 比は同程度であり、細胞構築の点からは同等の成分を持っていると考えられた。fMRI での検討では、右手あるいは左手の把握運動によって、健常者では運動野と想定される対側の中心前回付近での血液量の増加が認められた。正中神経を電気刺激して得られた SEFs は左刺激、右刺激とも健常者で一次感覚野と想定される表層の皮質（中心後回）にその電流源が推定された。自発てんかん性放電である spikes の電流源推定を MEG で行った。Spikes の電流源は内層の灰白質に推定された。これは band heterotopia 2 例とも同様の結果であった。浅層も深層も灰白質では同様の細胞成分が存在すると考えられるが、正常機能は浅層で、異常機能は深層で営まれていると考えられた。

A. 研究目的

皮質形成異常では細胞構築の異常に伴って中程度ないし重度のてんかんを伴うことが多い。皮質形成異常でてんかん源性を有する機序については現在ほとんど解明されていない。皮質形成異常におけるてんかん源性のメカニズムの解明は、現在のてんかん学の重要な課題である。われわれは本年度この解明の一步として、皮質形成異常症の一型である band heterotopia におけるてんかん病態の解析、すなわちてんかん源性活動の部位の同定、皮質形成異常部の細胞構築、正常機能部との位置関係などの解析を行った。そのために機能的磁気共鳴画像 (fMRI)、磁気スペクトロスコピー (MRS)、脳磁図 (MEG) の新しい脳機能解析技術を駆使した。

これらは非侵襲的に脳機能を局所毎に解析可能であるので、皮質形成異常と健常

部での脳機能の相違を可視的に可能とする利点がある。

このような病例とそのてんかん病態の解析結果を集積することによって、動物実験によるけいれん発現メカニズムの解析で得られた成果とを複合的に解釈し、診断や治療などの臨床応用に活用することを目的とする。

B. 研究方法

対象は 2 例 (17 歳と 23 歳の女性) の band heterotopia である。症例 1 は大脳全周に亘る band heterotopia があり (図 1)、症例 2 は後頭部に限局した band heterotopia を認める。

MRS は 1.5 T の Magnetom Vision (Siemens) を用いて、くり返し時間 1500ms、エコー時間 135ms で測定した。表層の灰白質と深層の灰白質に boxell $1.0 \times 1.5 \times$

1.5cm の関心領域を定め、N - acetylaspartate (NAA)、Choline (Cho) および Creatine (Cr) の相対値を測定し、NAA/ Cr 比、cho/ Cr 比 を算出した。

fMRI は Signa Horizon (GE Medical systems) を用い、右あるいは左手の把握動作 30 秒間、休憩 30 秒間の動作を 6 回施行するように命じ、その際の酸化ヘモグロビンの変化率を MRI 画像上に表示させた。

MEG はヘルメット型 122 チャンネル脳磁計 Neuromag 122 (Neuromag) を用いて記録した。SEF の記録には右あるいは左手関節部で、正中神経を電気刺激し、200 回の加算を行った。刺激強度は拇指球筋の収縮閾値 +50% とした。得られた SEF 波型の刺激後数 20msec に出現する N20m について、その推定された電流源の方向と電流強度を検討した。

(倫理面への配慮)

倫理面については、これらの検査が非侵襲的であること、その目的、得られた結果の患者への利点 (てんかん病態の解明が治療にも寄与することなど)、予期せぬ不都合な点、苦痛などについて詳しい説明を行い、文書で同意を得た。

C. 研究結果

表層の皮質と内層灰白質に関心領域を設定して MRS を検討した結果、2 例とも NAA / Cr 比は皮質で 1.52、深層灰白質で 1.77 で表層と深層とで有意差はなく、Cho / Cr 比も皮質で 0.74、深層灰白質で 0.90 で有意差は認められなかった。(図 2)

fMRI での検討では、右手あるいは左手の把握運動によって、健常者では運動野と想定される対側の中心前回付近での血液量の増加が認められた。(図 3)

正中神経を電気刺激して得られた SEFs は左刺激、右刺激とも健常者で一次感覚野と想定される刺激対側の表層の皮質 (中心

後回) に健常人と同様に前上方に向く電流源が推定された。(図 4)

自発てんかん性放電である spikes の電流源推定を MEG で行った。Spikes の電流源は内層の灰白質に推定された。これは band heterotopia 2 例とも同様の結果であった。(図 5)

D. 考察

大脳皮質は、胎性期に脳室壁の胚芽層で作られた神経芽細胞が脳表へ伸びたグリア細胞の radial fiber を伝って脳表へ移動していくことにより、6 層の構造として形成される。この細胞移動に (migration) に何らかの障害が起こると、異所性神経細胞が出来たり、層構造の異常が生じたりする。このようにして生じたものを皮質形成異常 (cortical dysplasia) あるいは神経細胞移動障害 (migration disorder) と呼ぶ。

皮質形成異常症では、小児の難治性てんかんの多くを占め、その背景にある異常を解明することはきわめて重要である。基礎的研究と平行して、難治てんかん症例の新技术を用いた病態の解明を行い、これらのデータを集積しておくことは、基礎研究の臨床応用を考える上で重要である。

本研究では、MRS による神経細胞構築を検討したところ、band heterotopia の 2 例とも表層皮質と、深層灰白質とで代謝動態はほぼ同一であった。NAA は神経細胞に多く存在し、Cr との比は神経細胞のマーカーとされている。また Cho は膜成分の回転のマーカーとされている。band heterotopia では神経細胞成分構成も膜成分の回転も表層にまで到達した神経細胞と深層の白灰質とで相違がないと考えられた。

ちなみに他の皮質形成異常症との比較をすると、図 6 にみるように、皮質形成異常症では NAA/Cr 比が対照より低下しており、また band heterotopia よりも低下して

いる。Cho/Cr 比については対照に比べて有意に高値を示しており、皮質形成異常症では髄鞘化の異常が示唆された。

運動機能の局在については、表層の皮質に fMRI でみる血液量の増加があり、また感覚機能については、MEG による SEF で、やはり表層皮質に機能局在を推定させる結果であった。これらの事実は band heterotopia における感覚・運動機能が、表層（最終目的地）まで到達した細胞で営まれていることを示唆している。

Positron emission tomography (PET) や fMRI による研究で、皮質下の異所性灰白質で指のタッピング負荷後に明らかな活動増加が認められたとの報告があるが、PET は解像力が MEG による SEF の電流源推定よりも劣るので、われわれの皮質に存在する神経細胞が機能しているとの考えの方が論理性が高いと思われる。しかし、症例によって異なるのかもしれない。今後さらに症例を増やして普遍性を確認しなくてはならない。

われわれは以前に局所性皮質形成異常症で、SEF の電流源が一次感覚野に同定されたが、その電流方向が正常にみられる前上方ではない例を経験している。異常性灰白質が皮質に及んでいない例であったが、異所灰白質が形成される機序、あるいはそれが存在することそれ自身が、正常皮質の細胞構築、特に細胞の電気軸に歪みを生じさせることがあると考えられた。band heterotopia ではこのような歪みは生じてない可能性がある。

皮質形成異常症におけるてんかん源性についてさまざまな方向から検討されている。Morrel らは部電極を用いて band heterotopia におけるてんかん発射について検討したところ、正常の移動によって形成された皮質に隣接する異所性細胞から明らかなたんかん発作が起こっていたと述べて

いる。

また、periventricular nodular heterotopia や皮質下 heterotopia では異所性細胞からのてんかん発射が認められている。大脳に存在する異所性細胞がてんかん性異常活動を示すことがあると言える。

われわれの経験した band heterotopia 2 例においても深層の皮質下灰白質に spikes の起源が想定された。MEG が spikes の局在を把握する上で有用であることを示している。

E. 結論

Band heterotopia においては皮質にまで到達した細胞の層では正常な運動と感覚機能を有し、てんかん発射の異常活動は内層に停った細胞層で営まれていると推定された。しかしながら細胞構築は内・外両層で同様の成分であることが推定された。

これらの研究結果を集積することは、小児難治性てんかんの原因として重要な位置を占める皮質形成異常症のてんかん発現の機序を解析してゆく上で極めて有用である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

飯沼一字. 痙攣の PET 「症候から診断へ・第 4 集」(編集:上島国利、鴨下重彦) 日本医師会, 東京, p16, 2001.

飯沼一字. 学会名改定検討委員会からのメッセージ「神経機能検査の進歩と小児への応用」. 臨床神経生理学 28: 405-406, 2000.

飯沼一字. 2. 成長・発達・加齢に伴う注意すべき徴候 7. 痙攣. 「症候から診

断へ・第4集」(編集:上島国利、鴨下重彦)
日本医師会, 東京, pp129-133, 2001.

Togashi N., Haginoya, K., Munakata, M.,
Kato, R., Yokoyama, H. & Iinuma, K. Image
analysis of intractable epilepsy: 18F-
FDG PET scan of the cortical dysplasia.
CYRIC Annual Report 1999, 151-154, 2000.

Haginoya, K., Kon, K., Yokoyama, H.,
Tanaka, S., Kato, R., Munakata, M., Yagi,
T., Takayanagi, M., Yoshihara, Y., Nagai,
M., Yamazaki, T., Maruoka, S. & Iinuma,
K. The perfusion defect seen with SPECT
in West syndrome is not correlated with
seizure prognosis or developmental
outcome. Brain Dev. 22, 16-23, 2000.

2. 学会発表

横山浩之、呉 繁夫、甲田三恵子、
成澤邦明、飯沼一字

「Non-ketotic hyperglycemia(NKH)モ
デルマウスの易けいれん性」

第42回日本小児神経学会 大阪 2000年
6月8-10日

呉 繁夫、横山浩之、甲田三恵子、
飯沼一字、成澤邦明

「Non-ketotic hyperglycemia(NKH)モ
デルマウスの作成」

第42回日本小児神経学会 大阪 2000年
6月8-10日

北村太郎、宗形光敏、萩野谷和裕、
飯沼一字

「幼弱ラット大脳皮質神経細胞における
Phenylethylamine の作用」

第42回日本小児神経学会 大阪 2000年
6月8-10日

石飛真美子、宗形光敏、中里信和、
飯沼一字

「Band heterotopia における正常および
異常機能の局在について」

第42回日本小児神経学会 大阪 2000年
6月8-10日

富樫紀子、萩野谷和裕、宗形光敏、
加藤里恵、横山浩之、飯沼一字

「小児難治てんかんの画像解析—¹⁸F-FDG
PETによる大脳皮質形成異常の検討—」

第42回日本小児神経学会 大阪 2000年
6月8-10日

ZY Li, K Iinuma, T Watanabe, K Yanai.

「Role of histamine H1 receptor in the
development of pentylentetrazole-
kindling: A study of H1 receptor knockout
mice」

第42回日本小児神経学会 大阪 2000年
6月8-10日

飯沼一字

【特】「中枢ヒスタミン神経系と小児痙攣」
第17回奈良エPILEプシークラブ 奈良
2001年1月20日

飯沼一字

【特】「機能的画像解析と小児神経学」

第21回山口県小児神経研究会 小郡
2001年3月3日

Ishitobi, M., Munakata, M., Nakasato, N.,
Inoue, T. & Iinuma, K. Localization
of normal and abnormal function in
patients with band heterotopia. 12th
International Conference on
Biomagnetism. Espoo, Finland, Aug.
13-17, 2000.

Iinuma, K. Central histaminergic system and childhood convulsion. 50th Korean Pediatric Society. Seoul, Korea, October 20, 2000.

Ishitobi, M., Munakata, M., Nakasato, N., Inoue, T. & Iinuma, K.

Localization of normal and abnormal function in patients with band heterotopia.

12th International Conference on Biomagnetism.

Espoo, Finland, Aug. 13-17, 2000.

Iinuma, K.

Central histaminergic system and childhood convulsion.

50th Korean Pediatric Society.

Seoul, Korea, Oct. 20, 2000

H. 知的財産権の出願・登録状況

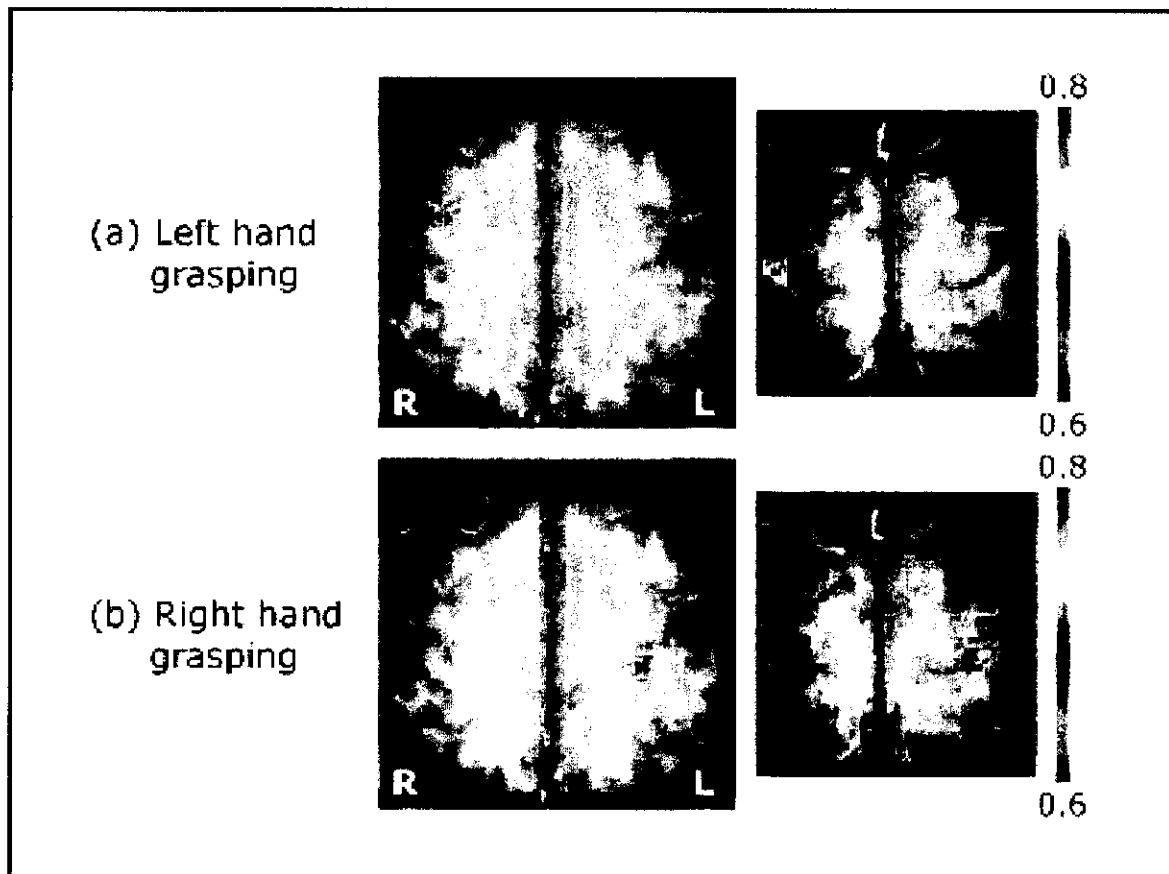
なし

図1 Band heterotopiaのMRI



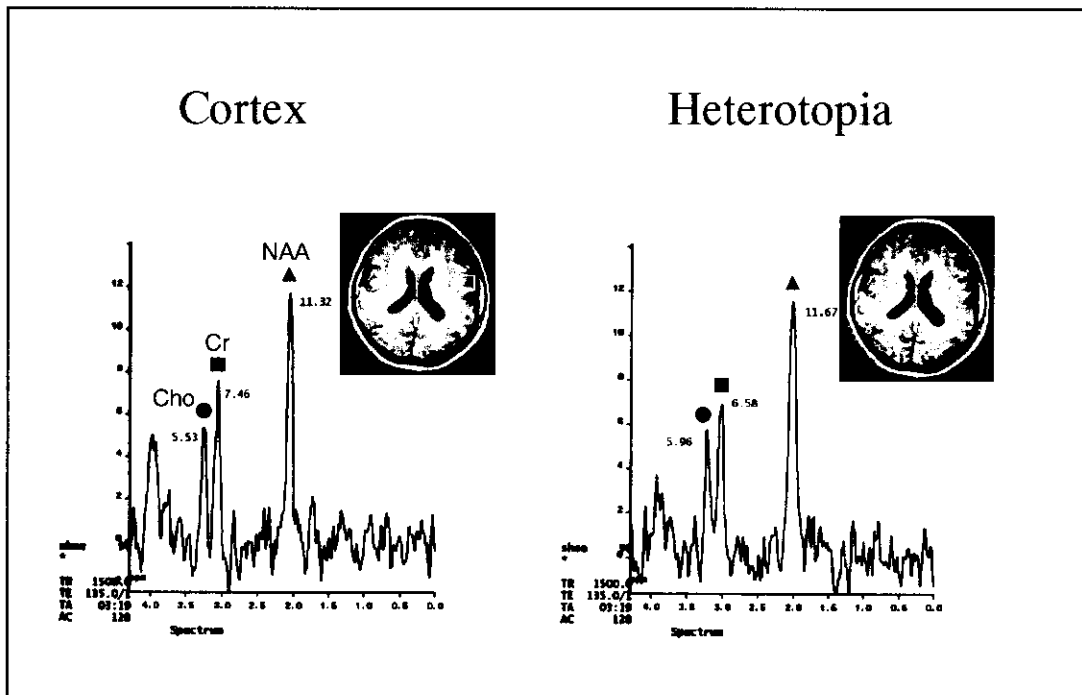
脳回直下の白質 (→) の下層にもう一層の帯状の灰白質 (⇨) がある。

図2 Band heterotopiaにおける左手および右手の把握運動のfMRI



それぞれ左手では右半球の、右手では左半球の運動野と想定される部位での血液量の増加を認める。

図3 Band heterotopia の¹H-MRS 所見

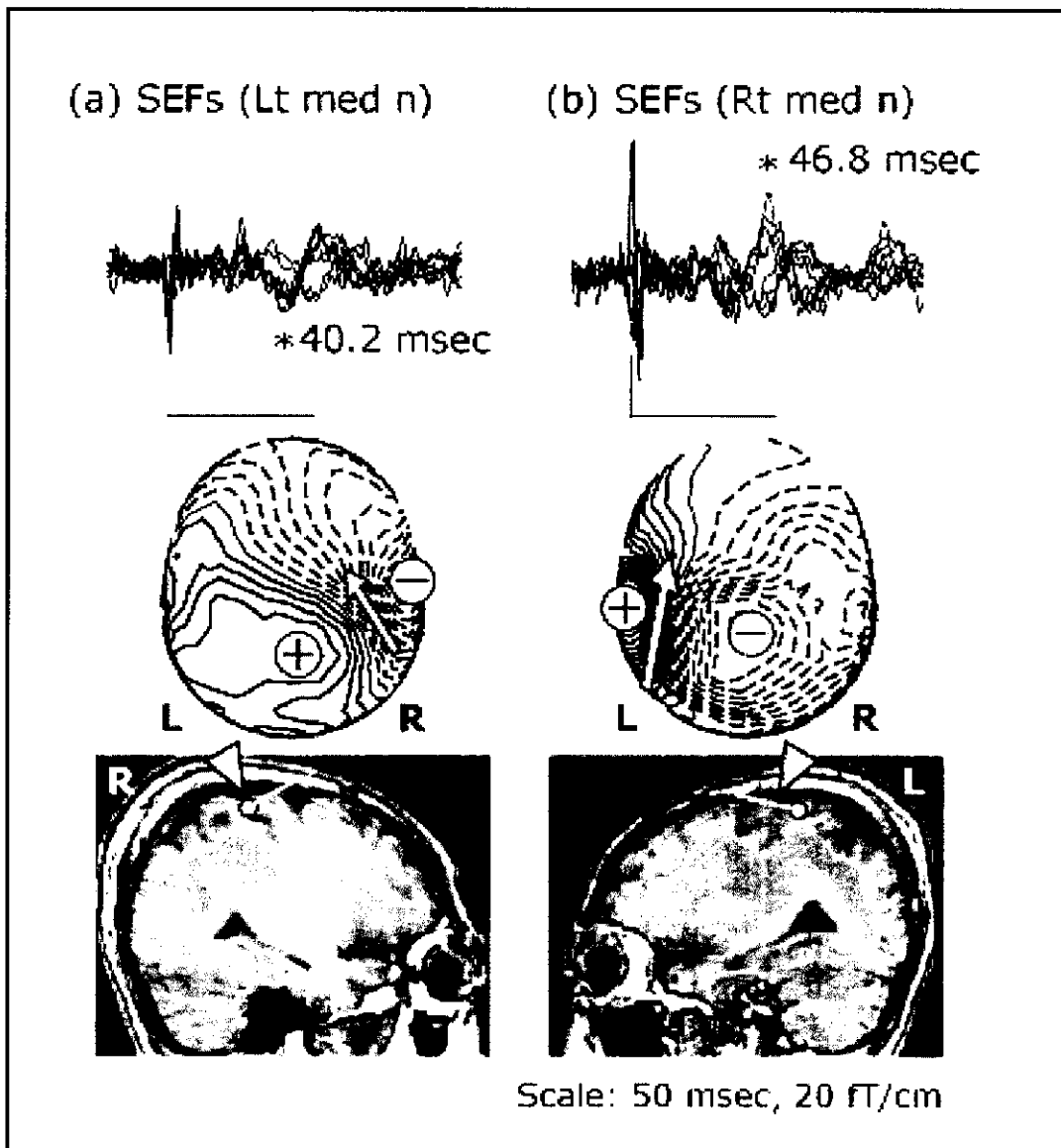


Heterotopia領域のNAA/Cr, Cho/Cr比は皮質と同程度である。

正中神経を電気刺激して得られたSEFsは左刺激、右刺激とも健常者で一次感覚野と想定される表層の皮質（中心後回）にその電流源が推定された（図6）。

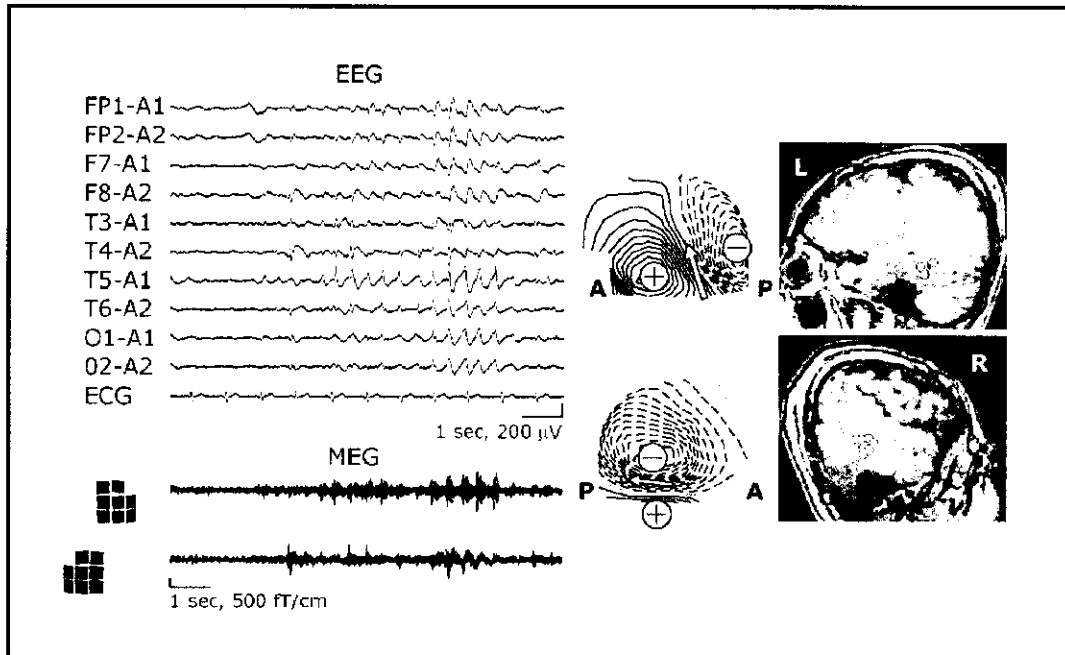
次に自発てんかん性放電であるspikesの電流源推定をMEGで行った。Spikesの電流源は内層の灰白質に推定された（図7）。これはband heterotopia 2例とも同様の結果であった。

図4 Band heterotopiaにおけるSEF



左・右正中神経刺激とも右・左半球一次感覚野中心後回に電流信号源が推定された。方向も前上方である。

図5 band heterotopiaにおける自発spike放電の電流信号源



多数のspikesが下層の灰白質から群発している。