

- ② また翻訳領域の異常の中で本邦症例にはI群に属するものがなく、II群の割合も相対的に低かった。(本邦18.6%、欧米36.5%)それとは反対に、III群の割合は本邦でやや高かった。(本邦37.2%、欧米33.3%)
- ③ L1タンパクの表現を考えれば、スプライス異常もIII群と同様であり、III群とスプライシング異常を加えた値は、本邦では高かった。(本邦74.7%、欧米54.4%)

D. 考察及び結語

1) 本邦XLH症例におけるL1CAM異常の分子遺伝学的特徴

今回欧米以外の国では初めてのnation-wideなL1遺伝子解析を行った意義は大きい。本邦でも、これまでの諸外国からの報告と同様、L1CAM遺伝子異常部位はすべて別部位で、hot pointは存在しなかった。このことは人種差を越えたCRASH症候群におけるL1CAM遺伝子異常の1つの大きな特徴と考えられる⁴⁾。しかし遺伝子異常のパターンにおいては、欧米症例と日本の症例での相違点が明らかになった。本邦では、III群とIII群と同様のL1タンパクの発現をおこす可能性のあるスプライス部位異常の割合が高い傾向があった。III群はI群、II群と比較して臨床的に重症であることはすでに報告されている¹⁷⁾。これら遺伝子異常の特徴から、本邦XLH症例は臨床的には重症例が多いと推測される。日本ではいわゆるMASA症候群の報告例がないことから、軽症のCRASH症候群が、人種的に少ないことが推測される。しかし、海外からの報告例の多くは小児神経内科や臨床遺伝学からの報告が多いのに比べ^{4,16,18)}、日本の報告例は脳神経外科的領域からが比較的多いという違いも考慮する必要がある。この点を明確にするためには今後、特に小児神経内科医との連携により、本邦における水頭症を伴わないL1CAM遺伝子異常症の解析が必要である。

2) 本邦XLH症例におけるL1CAM遺伝子異常の発見率

今回、私達のグループで新たに行ったL1CAM遺伝子解析における遺伝子異常発見率は先天性水頭症患者発生の家族歴のない場合は33.3%であった。一方、男児のみの水頭症患者発生の家族歴を有する場合は66.7%で、全体で52.4%であった。ドイツで行なったnation-wideな大規模なL1遺伝子解析では、153家系の解析で、全体では30.1%、家族歴がない症例では15.7%、家系内水頭症

発症が1例ある家系では35%、2例以上の家系では74.2%であった¹⁸⁾。今回の私たちの行った解析はこれより高率であった。この原因の1つは最近XLHの臨床所見や神経放射線学的診断への関心が高く、孤発例でもかなり正確に診断できるようになったことが原因していると考えられる。しかしまた一方では、遺伝子解析方法の相違に起因する可能性も考えられる。XLH症例におけるL1CAM遺伝子異常は、前述のごとく明らかなhot pointが存在しない事と、L1遺伝子は翻訳領域だけでも全長3771bp 28エクソンにおよぶ¹⁹⁾。処理時間と労力の関係から海外解析グループの多くはSSCP法(single-strand conformation polymorphisms)をスクリーニング方法の主体にしている場合が多い^{16,18,19)}。SSCP法は異なる塩基配列を有する1本鎖DNAが変性アクリルアミドゲル上で異なる泳動距離を取ることを利用して、DNAの塩基置換を検出する方法である。SSCP法は条件検討を十分に行えば原理的には1塩基置換の検出が簡便に可能となり、しかも多検体を短時間に処理できるため遺伝子異常のスクリーニング法としては優れた方法である¹⁹⁾。しかし初期の条件設定は必ずしも容易ではなく、また実験の再現性に苦慮する場合もある。私たちが当初はSSCP法をスクリーニングの主体にした解析を行ったが、明らかなL1CAM遺伝子異常を同定することができなかった¹⁴⁾。その後、今回用いたダイレクトシーケンス法に変更し、SSCP法では正常と判断されたエクソン内に遺伝子異常を同定することができ、それ以降、全症例をダイレクトシーケンス法で解析するように変更して今回の解析結果を得た。海外報告例との発見率の差は、SSCP法に伴う偽陰性が無視できない程度存在することを意味していると思われる¹⁸⁾。私達が今回用いた、PCRダイレクトシーケンス法とキャピラリーシーケンサーの併用によるL1CAM遺伝子の全シーケンスは従来のシーケンス法と比較し、簡便にかつ高い再現性をもって行うことが可能であった。また現在市販されているマルチキャピラリーシーケンサーのような検体処理能力が高い機器を使用すれば、従来のシーケンス法と比較し、より短時間に大量の検体が殆ど自動的に解析することが可能となり、L1CAM遺伝子解析におけるSSCP法の優位性はなくなると思われる。SSCP法による偽陰性を避けるためにも今後シーケンス法を主体とした解析を考慮する必要があると思われた。

また男児水頭症の家族歴がある症例の約3分の2に

*LICAM*遺伝子異常が見つかったという事実より、男児水頭症の家族歴がある場合は必ず*LICAM*遺伝子検索を行なうべきであると考えられた。

3) 今後の課題

臨床的あるいは神経放射線学的にXLHが強く疑われるにもかかわらず、*LI*遺伝子に異常の認められなかった家系の原因遺伝子は依然不明であり、これら症例の原因遺伝子の探求が今後の大きな課題である。その方向性として1つは、*LICAM*遺伝子の翻訳領域には異常が存在しないが、5'非翻訳領域およびプロモータ領域の塩基配列異常(塩基置換、欠失)やメチル化の異常により、結果的に*LICAM*遺伝子の発現が阻害されている症例がないかどうかの検索が必要と考えられる。

次に*LICAM*遺伝子以外の先天性水頭症原因遺伝子の同定が必要と思われる。その1つの候補遺伝子が、ノックアウトマウスが水頭症を発症し²⁰⁾、*L1*ノックアウトマウス^{21,22)}と似た症状を呈するneural RNA-binding proteinの1つである*Musashi*^{23,24)}のヒトホモログ、*Msi1*遺伝子²⁵⁾の解析である。現在、*LICAM*遺伝子異常の同定されなかった先天性水頭症例、女児先天性水頭症例、及び男女の同胞例で水頭症を発症する家族性先天性水頭症例を中心に*Msi1*遺伝子の解析を行っている。現在まで小数例の解析では*Msi1*遺伝子に明らかな異常は同定されていないが、今後*LICAM*遺伝子解析と並行して*Msi1*遺伝子解析を進行させていく予定である。また今回*LI*遺伝子異常が明らかになった家系では、遺伝型と表現型の相関についてより詳しく今後解析する予定である。

E. 謝 辞

貴重な症例の提供を頂いた千葉県こども病院遺伝科・石切山敏先生、山梨県立中央病院小児科・佐藤俊彦先生、東京都立北療育センター小児科・川日裕先生、藤枝市立総合病院小児科・八尾徳明先生、愛知県心身障害者コロニー中央病院脳神経外科・長坂昌登先生、香川医科大学周産期学・秦利之先生、鳥取大学医学部脳神経小児科・難波由喜子先生、広島市民病院未熟児センター・林谷道子先生、に感謝いたします。また遺伝子解析にご尽力いただいた西川伊津子様、伊藤かおる様、吉岡絵馬様、桃川由香子様、秀石剛夫様に感謝いたします。

文 献

- 1) Rosenthal A, Jouet M, Kenwrick S: Aberrant splicing of neural cell adhesion molecule L1 mRNA in a family with X-linked hydrocephalus. *Nature Genet* 2:107-112, 1992
- 2) Van Camp G, Franssen E, Vits L, Raes G, Willems PJ: A locus-specific mutation database for the neural cell adhesion molecule L1CAM(Xq28). *Hum Mutation* 8:391, 1996h
- 3) Kamiguchi H, Hlavín ML, Yamasaki M, Lemmon V: Adhesion molecules and inherited disease of the human nervous system. *Annu Rev Neurosci* 21:97-125, 1998
- 4) Franssen E, Camp GV, Vits L, Willems PJ: L1-associated disease: clinical geneticists divide, molecular geneticist unite. *Hum Mol Genet* 6: 1625-1632, 1997
- 5) Yamasaki M, Arita N, Hiraga S, Izumoto S, Morimoto K, Nakatani S, Fujitani K, Sato N and Hayakawa T: A clinical and neuroradiological study of X-linked hydrocephalus in Japan. *J Neurosurg* 83: 50-55, 1995
- 6) 山崎麻美、金村米博、平賀章壽、有田憲生: X連鎖性劣性遺伝性水頭症。生体の科学50, 389-390, 1999
- 7) 山崎麻美: 神経接着因子L1と水頭症。脳機能の解明—21世紀に向けて— 419-427, 1999
- 8) 岡本伸彦: L1CAM異常によるX-linked hydrocephalusの遺伝子解析。厚生省特定疾患難治性水頭症調査研究班 平成11年度研究報告書、2000、pp39-42
- 9) 水岸貴代美、柳沢雅弘、山中恵子 他: X連鎖性水頭症における神経細胞接着因子L1遺伝子解析。日本小児科学会雑誌 101:1383-1387, 1997
- 10) Takechi T, Tohyama J, Kurashige T, Maruta K, Uemura K, Ohi T, Matsukura S, Sakuragawa N: A deletion of five nucleotides in the L1CAM gene in a Japanese family with X-linked hydrocephalus. *Hum Genet* 97: 353-356, 1996
- 11) Izumoto S, Yamasaki M, Arita N, Hiraga S, Ohnishi T, Fujitani K, Sakoda S, Hayakawa T: A new mutation of the L1CAM gene in an X-linked hydrocephalus family. *Child's Nerv Syst* 12:742-747, 1996
- 12) Okamoto N, Wada Y, Goto M: Hydrocephalus and Hirschprung's disease in a patient with a mutation of L1CAM. *J Med Genet* 43: 670-671, 1997
- 13) Okamoto N, Wada Y, Kawabata H, Ishikiriyama S, Takahashi S: A clinical and molecular study on X-linked hydrocephalus. *Jpn J Hum Genet* 41: 431-437, 1996

- 14) 山崎麻美、金村米博、森鑑二、有田憲生：水頭症バンク設立の経過と遺伝子解析。厚生省特定疾患難治性水頭症調査研究班 平成11年度研究報告書、2000、pp43-56
- 15) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular Cloning: A Laboratory manual*, second edition Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989
- 16) Jouet M, Rosenthal A, Armstrong G, MacFarlane J, Stevenson R, Paterson J, Metzzenberg A, Ionasescu V, Temple K, Kenwrick S: X-linked spastic paraplegia (SPG1), MASA syndrome and X-linked hydrocephalus result from mutations in the L1 gene. *Nature Genet* 7: 402-407, 1994
- 17) Yamasaki M, Thompson P, Lemmon V: CRASH Syndrome: mutations in L1CAM correlate with severity of the disease. *Neuropediatrics* 28 175-178, 1997
- 18) Finckh U, Schroder J, Ressler B, Veske A, Gal A: Spectrum and detection rate of L1CAM mutations in isolated and familial cases with clinically suspected L1-disease. *Am J Med Genet* 92: 40-46, 2000
- 19) Hlavín ML, Lemmon VL: Molecular structure and functional testing of human L1CAM: an interspecies comparison. *Genomics* 11: 416-423, 1991
- 20) Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T: Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2766-2770, 1989
- 21) 榑原伸一、中村由紀、小池正人、高野洋志、佐藤均、内山安男、野田哲生、岡野栄之。ノックアウトマウスを用いたMusashi1(Msi1)の機能および水頭症発生機序の解析。厚生省特定疾患難治性水頭症調査研究班 平成11年度研究報告書、2000、pp16-25
- 22) Fransén E, D'Hooge R, Van Camp G, Verhoye M, Sijbers J, Reyniers E, Soriano P, Kamiguchi H, Willemsen R, Koekkoek SKE, De Zeeuw CI, De Deyn PP, Van der Linden A, Lemmon V, Kooy RF, Willems PJ: L1 knockout mice show dilated ventricles, vermis hypoplasia and impaired exploration patterns. *Hum Mol Genet* 7:999-1009, 1998
- 23) Kamiguchi H, Hlavín ML, Lemmon V: Role of L1 in neural development: what the knockouts tell us. *Mol Cell Neurosci* 12: 48-55, 1998
- 24) Nakamura M, Okano H, Blendy JA, Montell C: Musashi, a neural RNA-binding protein required for *Drosophila* adult external sensory organ development. *Neuron* 13: 67-81, 1994.
- 25) Sakakiraba S, Imai T, Hamaguchi K, Okabe M, Aruga J, Nakajima K, Yasutomi D, Nagata T, Kurihara Y, Uesugi S, Miyata T, Ogawa M, Mikoshiba K, Okano H: Mouse-Musashi-1, a neural RNA-binding protein highly enriched in the mammalian CNS stem cell. *Dev Biol* 176: 230-242, 1996.
- 26) Good P, Yoda A, Sakakibara S, Yamamoto A, Imai T, Sawa H, Ikeuchi T, Tsuji S, Satoh H, Okano H: The human Musashi homolog 1 (MSI1) gene encoding the homologue of Musashi/Nrp-1, a neural RNA-binding protein putatively expressed in CNS stem cells and neural progenitor cells. *Genomics* 52: 382-384, 1998.

葉酸代謝酵素5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 遺伝子 C677T の解析

大阪市立総合医療センター 小児脳神経外科、脳神経外科¹ 国立大阪病院 脳神経外科² 同 臨床研究部³
大阪府立母子保健総合医療センター 企画調査部⁴ 兵庫医科大学 脳神経外科⁵

坂本 博昭¹ 山崎 麻美² 金村 米博³ 岡本 伸彦⁴ 森 鑑二⁵
北野 昌平¹ 西川 節¹

研究要旨

二分脊椎、二分頭蓋などの疾患は神経管癒合不全により発生し、これらに合併する水頭症は先天性水頭症の範疇で最も頻度の高いものである。最近、葉酸代謝酵素 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 遺伝子の677番目のcytosine塩基からthymine塩基への置換 (C677T) が発生すれば、この酵素活性が低下することや、神経管癒合不全の症例ではこの塩基置換を来したMTHFR遺伝子を持った例が有意に高率であることが報告された。そのためこの遺伝子の塩基置換は神経管癒合不全の発生の遺伝的な危険因子として注目されるようになったが、本邦ではまだこのような遺伝子レベルでの危険因子の検討はなされていない。そこで、先天性水頭症を来す疾患の中で最も症例数の多い二分脊椎（脊髄髄膜瘤）を対象に、MTHFR遺伝子の塩基置換C677Tの頻度を検討した。先天性水頭症遺伝子バンクに登録された例で、脊髄髄膜瘤の患者とその家系を疾患群とし、神経管癒合不全を合併しない水頭症患者とその家系を対照群とした。polymerase chain reaction (PCR) direct sequencing法を用いてgenomic DNAの解析を行った。alleleの塩基がいずれもthymineに置換したhomozygoteを持つ頻度はそれぞれ対照群12%、患者15%、患者の母親31%、父親10%で、対照群に対し患者の母親のodds ratioは3.2と有意 (p=0.027) に高かった。thymineのallele frequencyは対照群の0.37に較べ母親では0.59と高く、その差は有意 (p=0.027) であった。以上の結果から、本邦の女性でこのようなMTHFR遺伝子の塩基置換C677Tは、脊髄髄膜瘤児を出生する遺伝的な危険因子の1つと思われた。今後、症例数を増やし、さらに検討すべきと思われる。

A. 研究目的

神経管癒合不全により発生する顕在性二分脊椎（脊髄髄膜瘤）や顕在性二分頭蓋（脳瘤）にはほとんどの例に水頭症を伴う。これらの疾患は先天性水頭症の中で最も頻度が高いものであり、欧米と較べて本邦の発生頻度は決して低いとは言えない²⁾。この発生には遺伝因子や環境因子などが関与すると言われている。遺伝的な危険因子として、神経管癒合不全症の児を出生すれば、同胞が

この疾患に罹患する率は5倍に上昇することが指摘されている²⁾。一方、発生の地域差や栄養面の違いからは環境的要因が重視されている。葉酸投与による神経管癒合不全症の発生を予防する試みは1970年代後半に施行され¹⁸⁾、1990年代になり欧米ならびに東アジアで葉酸の予防的投与により神経管癒合不全症の発生率を約70%減少できることが明らかとなった^{1,4,13)}。最近、葉酸の代謝酵素として重要な5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 遺伝子が同定され⁷⁾、この遺伝子

の677番目の塩基がcytosineからthymineに置換すると、構造アミノ酸がalanineからvalineに変化してMTHFRの酵素活性が低下すると報告された²⁰⁾。また、神経管癒合不全症の例ではMTHFR遺伝子の塩基置換C677Tを呈している例が明らかに多いことから、この遺伝子の塩基置換は神経管癒合不全症の発生の遺伝的な危険因子として初めて位置づけられた⁶⁾。その後、他の複数の地域から同様の結果が報告されている^{15,17,20,21)}。

本邦ではこのような遺伝子レベルでの神経管癒合不全症発生の危険因子の検討はなされていない。そこで、水頭症遺伝子バンクのプロトコールに則り、神経管癒合不全の症例およびその母親、父親についてMTHFR遺伝子C677Tの塩基置換を解析し、この塩基置換が日本人でも神経管癒合不全の危険因子となるかどうかを検討した。

B. 研究方法

本研究班によって設立した先天性水頭症遺伝子バンクのプロトコールに従って、書面によりインフォームドコンセントを得た例を対象とした²²⁾。疾患群として、脊髄髄膜瘤患者26人とその母親16人、父親10人とした。対照群として、神経管癒合不全に合併しない先天性水頭症の家系、家族54人(X連鎖性劣性水頭症12人、Dandy-Walker症候群6人、全前脳胞症5人、その他の先天性水頭症20人、患者の母親9人、父親3人、親戚3人)、特発性正常圧水頭症6人、健常者3人、計65人を対象とした。

末梢血リンパ球よりgenomic DNAを抽出した。100ngのgenomic DNAをテンプレートにして、以下の条件でpolymerase chain reaction (PCR)法を用いてMTHFR遺伝子677の領域を含む198bpの断片を増幅し、PCR-direct sequencing法で塩基配列の解析を行った。PCR primerはForward(23塩基対):TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA、Reverse (20塩基対):AGGACGGTGCGGTGAGAGTGとした。PCRの条件は、I denature 94° 3分、II denature 94°、annealing 62° 30秒、extension 72° 1分 30サイクル、III extension 72° 5分とした。PCR反応物を2%アガロースゲルで電気泳動し、その後198bpの断片をゲルから回収した。シークエンスはゲルから回収されたPCR産物をテンプレートにして、キャピラリー型シークエンス(ABI genetic analyzer 310)を用いて、ダイターミネーター法による蛍光シークエンス法にて行った。

得られた結果は、患者-対照関連解析の手法を用いて

Table 1 Genotype frequencies of MTHFR C677T among patients, their parents and controls

Group	N	Genotype frequency (%)			Odds ratio (95% CI)	Allele frequency(T)
		CC	CT	TT		
Patients	26	35	50	15	1.3(0.35-4.7)	0.40
Mothers	16	13	56	31	3.2(1.0-10.3)*	0.59**
Fathers	10	60	30	10	0.79(0.095-1.6)	0.40
Controls	54	39	49	12	1	0.37

*P<0.027, **p<0.027

MTHFR遺伝子C677Tの1塩基置換を示す頻度を解析した。

C. 研究結果 (Table 1)

genotypeとして、MTHFR遺伝子の677番目の塩基がどちらのalleleもcytosineであるhomozygote (CC genotype)、cytosineとthymineからなるheterozygote (CT genotype)、そしてどちらのalleleもcytosineからthymineに変換したhomozygote (TT genotype)について、各群でそれぞれの頻度を調べた。CCがwild typeにあたる。対照群での頻度はそれぞれCC39%、CT49%、TT12%で、TTの例が最も頻度が少なかった。脊髄髄膜瘤の患者群での頻度はそれぞれCC35%、CT50%、TT15%と、対照群と比べて大きな相違は見られなかった。しかし、患者の母親での頻度はそれぞれCC13%、CT56%、TT31%であり、TTの頻度は対照群に対しodds ratio 3.2と有意に(カイ2乗検定、p=0.027)高かった。父親での頻度はそれぞれCC60%、CT30%、TT10%と対照群の値に類似していた。

CからTへの塩基の置換率、すなわちTのallele frequencyは対照群37%に比べ患者の母親は59%と高く、この差は統計学的に有意であった(カイ2乗検定、p=0.027)。Tのallele frequencyは患者で25%、父親で40%と対照群との間に有意な差はなかった。

D. 考察

今回の解析では、神経管癒合不全症の中でも脊髄髄膜瘤の症例とその家系を対象に、MTHFR遺伝子C677Tの1塩基置換の頻度を解析した結果、患者自身ではなく、患者の母親にこの塩基置換の頻度が有意に高かった。この結果から、本邦でもMTHFR遺伝子C677Tの塩基置換は脊髄髄膜瘤の発生の遺伝的な危険因子の1つであることを示唆している。

神経管癒合不全ではその程度や部位により二分脊椎、二分頭蓋、無脳症などの広い範囲の臨床的な疾患群が含

まれる。さらに二分脊椎は、水頭症など中枢神経系全体に病変をもたらす顕在性二分脊椎と、病変が脊髄や脊椎もしくはその周辺に限局する潜在性二分脊椎に分類できる。今回の検討では、解析対象として神経管閉鎖不全症の中でも水頭症を来しやすく、二分頭蓋よりも発生頻度が高い顕在性二分脊椎（脊髄髄膜瘤）を対象とし、解析対象となるphenotypeの均一性を高めた。

MTHFR 遺伝子C677Tの1つの塩基置換は健常人でも決してまれなものではなく、遺伝子多型の面からこの塩基置換はsingle nucleotide polymorphism (SNP) と考えられている⁶⁾。健常人や神経管癒合不全症の患者およびその家系におけるこのSNPを持つ割合が調べられ、患者-対照関連解析の手法を用いて神経管癒合不全症とこの塩基置換との関係を検討している。オランダからの報告では、TT genotypeの割合は神経管癒合不全症に関与しない対照群に比べ、神経管癒合不全症の患者のみならず患者の母親で高値を認めた²⁰⁾。アイルランドではTT genotypeの割合は対照群よりも神経管癒合不全症の患者で有意に高く、このSNPをhomozygoteに持つ例は神経管癒合不全の遺伝的な危険因子とみなせるが、母親のTT genotypeの頻度は対照群と有意な差はなかったとしている¹⁷⁾。イタリアからの報告では、TT genotypeの頻度は対照群よりも二分脊椎患者で高い値であった⁵⁾。メキシコのヒスパニックを対象とした報告では、健常な女性の対照群でもTT genotypeの頻度は34.8%と非常に高く、神経管癒合不全症の例とに有意な頻度の差は見いだせなかったとしている¹⁴⁾。南アフリカ共和国の黒人を対象とした報告では、TT genotypeを持つ頻度は健常人、神経管癒合不全症の例で共に極めて少なく、両群間に有意な差はなかったとしている¹⁹⁾。ヒスパニックでは神経管癒合不全症の発生頻度が高く、一方、黒人は神経管癒合不全症の発生頻度が少ないとされているので、それぞれの人種における癒合不全症の発生頻度とこのSNPを持つ頻度との間に関係があると推測される。大韓民国では、健常人でTT genotypeの割合が16%で、脊髄髄膜瘤の症例では12%、その母親では13%と健常人と比べてむしろ低値であったと報告している⁹⁾。中華人民共和国では、TT genotypeの頻度は対照とした健常な女性では13%で、神経管癒合不全症の患者の母親では33%と対照よりも高値であったとしている¹⁰⁾。このように、このSNPを呈する割合は地域や人種によって異なるため、結果の判定には地域や人種の違いを考慮する必要がある。

MTHFR 遺伝子C677TのSNPは神経管癒合不全に加え、動脈硬化などとの因果関係が示唆されているため、日本人でも健常人や疾患群での*MTHFR* 遺伝子C677TのSNPの頻度が報告されている。健常人でこのSNPをhomozygote TTとして持つ頻度は10%から14%であった^{11,23)}。今回の解析では、対照群を健常人ではなく先天性水頭症遺伝子バンクに登録された症例、すなわち神経管癒合不全に分類されない水頭症やその関連疾患の症例を対象とした。その結果、このSNPを持つ対照群の頻度は12%と、上記の値と類似した値であった。しかし、今後は症例数を増やし、健常人を対照として検討すべきである。

MTHFR 遺伝子C677Tの塩基置換が神経管癒合不全の危険因子とする報告と相反する結果を示す報告もある^{3, 8,12,16)}。しかし、このような報告でもhomocystineや葉酸の血中濃度に異常があるため、神経管癒合不全の発生には葉酸の代謝異常が強く示唆されている³⁾。そのため、葉酸投与による神経管癒合不全の発生防止は葉酸代謝異常が改善されるためと考えられている。今回の検討で、本邦では*MTHFR* 遺伝子の塩基置換は脊髄髄膜瘤患者ではなく、その母親で対照群より有意に高かったことから、母体への葉酸投与などによる母体環境の改善がこの疾患の発生予防に大きく関与していると思われる。

E. 結 論

葉酸代謝酵素*MTHFR* 遺伝子C677TのSNPは、本邦において二分脊椎（脊髄髄膜瘤）の遺伝的な危険因子の1つと考えられた。今回の結果から、このようなSNPを持つ女性に対し、葉酸投与を行えば二分脊椎発症のリスクの低減することができるという考えの理論的な裏付けとなりうると思われる。

文 献

- 1) Berry RJ, Li Z, Erickson JD, Li S, Moore CA, Wang H, Mulinare J, Zhao P, Wong L-YC, Gindler J, Hong S-X, Correa A: Prevention of neural-tube defects with folic acid in China. *New Engl J Med* 341; 1485-1490, 1999.
- 2) Botto LD, Moore CA, Khoury MJ, Erickson JD: Neural tube defects. *New Engl J Med* 341; 1509-1519, 1999.
- 3) Christensen B, Arbour L, Tran P, Leclerc D, Sabbaghian N, Platt R, Gilfix BM, Rosenblatt DS, Gravel RA, Forbes P, Rosen R: Genetic polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase, folate levels in

- red blood cells, and risk of neural tube defects. *Am J Hum Genet* 84; 151-157, 1999.
- 4) Czeizel AE, Dudas I: Prevention of the first occurrence of neural-tube defect by periconceptional vitamin supplementation. *New Engl J Med* 327; 1832-1835, 1992.
 - 5) de Franchis R, Buoninconti A, Mandato C, Pepe A, Sperandio MP, Del Gado R, Capra V, Salvaggio E, Andria G, Mastroiacovo P: The C677T mutation of the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene is a moderate risk for spina bifida in Italy. *J Med Genet* 35; 1009-1013, 1998.
 - 6) Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJH, den Heijer M, Kluijtmans LAJ, van den Heuvel LP, Rosen R: A candidate genetic risk-factor for vascular disease: a common mutation in methylene tetrahydrofolate reductase. *Nature Genet* 10: 111-113, 1995.
 - 7) Goyette P, Sumner JS, Milos R, Duncan AMV, Rosenblatt DS, Matthews RG, Rosen R: Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nature Genet* 7; 195-200, 1994.
 - 8) Koch MC, Stegmann K, Ziegler A, Schroter B, Ermert A: Evaluation of the MTHFR C677T allele and MTHFR gene locus in a German spina bifida population. *Eur J Pediatr* 157; 487-492, 1998.
 - 9) Lee BH, Cheong HI, Shin YS, Cho BK, Wang KC: The effect of C677T mutation of methylene tetrahydrofolate reductase gene and plasma folate level on hyperhomocysteinemia in patients with meningomyelocele. *Child's Nerv Syst* 16; 559-563, 2000.
 - 10) Li K, Zheng D, Xue Y, Sun Y, Chen L, Guo J, Zhang G, Li P: The common C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with neural tube defects and preeclampsia. (in Chinese) *Chung Hua I Hsueh I Chuan Hsueh Tsa Chih* 17; 76-78, 2000.
 - 11) Morita H, Taguchi J, Kurihara H, Kitaoka M, Kaneda H, Kurihara Y, Maemura K, Shindo T, Minamino T, Ohno M, Yamaoki K, Ogasawara K, Aizawa T, Suzuki S, Yazaki Y: Genetic polymorphism of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase(MTHFR) as a risk factor for coronary artery disease. *Circulation* 95; 2023-2036, 1997.
 - 12) Mornet E, Muller F, Lenvoise-Furet A, Delezoide AL, Col JY, Simon-Bouy B, Serre JL: Screening of the C677T mutation on the methylenetetrahydrofolate reductase gene in French patients with neural tube defects. *Hum Genet* 100; 512-514, 1997.
 - 13) MRC Vitamin Study Research Group. Prevention of neural tube defects. results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet* 338; 131-137, 1991.
 - 14) Mutchinick OM, Lopez MA, Luna L, Waxman J, Babinsky VE, FYVEMCE collaborative group; High prevalence of the thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase variant in Mexico, a country with a very high prevalence of neural tube defects. *Mol Genet Metab* 68: 461-467, 1999.
 - 15) Ou CY, Stevenson RE, Brown VK, Schwartz CE, Khoury MJ, Rosen R, Oakley GP Jr, Adams MJ Jr: 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphism as a risk factor for neural tube defects. *Am J Med Genet* 63; 610-613, 1996.
 - 16) Papapetrou C, Lynch SA, Burn J, Edwards YH: Methylenetetrahydrofolate reductase and neural tube defects. *Lancet* 348; 58, 1996.
 - 17) Shields DC, Kirke PN, Mills JL, Ramsbottom D, Molly AM, Burke H, Weir DG, Scott JM, Whitehead AS: The thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase and neural tube defects. an evaluation of genetic risk and the relative importance of the genotypes of the embryo and the mother. *Am J Hum Genet* 64: 1045-1055, 1999.
 - 18) Smithells RW, Sheppard S, Schorah CJ: Vitamin deficiencies and neural tube defects. *Arch Dis Child* 51; 944-950, 1976.
 - 19) Ubbink JB, Christianson A, Bester MJ, Van Allen MI, Venter PA, Delport R, Blom HJ, van der Merwe A, Potgieter H, Vermaak WJH: Folate status, homocysteine metabolism, and methylene tetrahydrofolate reductase genotype in rural south africa blacks with a history of pregnancy complicated by neural tube defects. *Metabolism* 48; 269-274, 1999.
 - 20) van der Put NMJ, Steegers-Theunissen RPM, Frosst P, Trijbels FJM, Eskes TKAB, van den Heuvel LP, Mariman ECM, den Heyer M, Rozen R, Blom HJ: Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor of spina bifida. *Lancet* 346; 1070-1071, 1995.
 - 21) Whitehead AS, Gallagher P, Mills JL, Kirke PN, Burke H, Molloy AM, Weir DG, Shields DC, Scott JM: A genetic defect in 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase in neural tube defects. *Q J Med* 88; 763-766, 1995.

- 22) 山崎麻美、金村米博、森 鑑三、有田憲生：水頭症バンク設立の経過と遺伝解析. 厚生省科学研究補助金 特定疾患対策研究事業、難治性水頭症調査研究班、平成11年度研究報告書, 43-56pp, 2000.
- 23) Zuo M, Nishio H, Lee MJ, Maejima K, Mimura S, Sumino K: The C677T mutation in the methylene tetrahydrofolate reductase gene increases serum uric acid in elderly men. *J Hum Genet* 45: 257-262, 2000.

水頭症遺伝子バンクに登録された 全前脳胞症患者5例における遺伝子変異の解析

京都府立医科大学附属脳・血管系老化研究センター病態病理学部門¹ 国立大阪病院 脳神経外科²
国立大阪病院 臨床研究部³

伏木 信次¹ 矢追 毅¹ 金村 米博³ 山崎 麻美²

研究要旨

国立大阪病院水頭症遺伝子バンクに登録された全前脳胞症患者5例を対象に、分子遺伝学的解析から原因遺伝子としてすでに報告されている二つの遺伝子*SHH*、*ZIC2*に着目し、それらにおける変異を解析した。*SHH*、*ZIC2*各遺伝子のイントロン部分の配列を元にしたPCRプライマーにより、各エクソンを増幅し、得られた産物を鋳型とするPCR直接シーケンス法を行い、蛍光DNAシーケンサーにより配列を決定した。その結果これまでのところ、両遺伝子中に、疾患原因とみなしうる変異は見出されていない。それぞれの遺伝子に関して未だ解析していない部分が残っているため、当該領域について変異の有無を調べる一方、今後の検体数増加に備えて、プライマー等の設定見直しに取り組んでいる。

A. 研究目的

全前脳胞症（以下、HPE）は前脳胞が左右の大脳半球へと分化する過程の分割障害であり、顔面正中部の奇形を高率に合併する重症の中樞神経系先天異常の一つである。本症は、これまでの遺伝疫学的研究から少なくとも5つのサブタイプ（HPE1～HPE5）に分類されるが、近年の分子生物学的研究により、HPE2からHPE5までの4つについては、原因もしくは責任遺伝子とその変異が同定されている。

本年度、私たちは、それら遺伝子のうち、HPE3及びHPE5それぞれの原因遺伝子である*SHH*及び*ZIC2*遺伝子に注目し、本研究班によって設立された国立大阪病院水頭症遺伝子バンクに登録された全前脳胞症患者5例における遺伝子変異の解析を行った。

B. 研究方法

全前脳胞症原因遺伝子としてこれまでに同定されている5つの遺伝子のうち、*Sonic Hedgehog* (*SHH*) および

*ZIC2*の2つの遺伝子に着目し、現在までに水頭症遺伝子バンクに登録された全前脳胞症患者5例（1-E7,1-F7,1-G5,1-J4,2-A3）のゲノムDNAを用いて、変異の有無を検索した。

SHH、*ZIC2*各遺伝子はともに3つのエクソンからなり、その塩基配列も明らかにされていることから、基本的には、イントロン部分の配列を元にしたPCRプライマーにより、各エクソンを増幅し、得られた産物を鋳型とするPCR直接シーケンス法を行い、蛍光DNAシーケンサーにより配列を決定した。ただし、500bpを超える鎖長のエクソンについては、幾つかの領域に分断して増幅したのち、同様に配列を決定した。

以下に各遺伝子断片のPCR増幅に用いたプライマー配列を示す。

(*SHH* exon1)

SHHPCR1s, 5'-AGGAAGAGAAAGAGCGAGGCAGC-3';

SHHPCR1as, 5'-TAAGTCTGGAAGTGTTCGGCTT-3'

(*SHH* exon2)

SHHPCR2s, 5'-ATGGCCCTCGCGCCTTGAGACTG-3';

SHHPCR2as, 5'-TTCCACCGCGGAAACGCAGTCATC-3'
(*SHH* exon3)

SHHPCR3s, 5'-GCACCAAGCGTGCGCCCTCCTC-3',
SHHPCR3as, 5'-TCGGCCACCACGTACACGCGCT-3'
(*SHH* exon3)

SHHPCR4s, 5'-AGCGCGGTGTACGTGGTGGCCGA-3',
SHHPCR4as, 5'-ATTATAACTCAGTCTGGTTTCGT-3'
(*ZIC2* exon1)

ZIC2-G1, 5'-AGAGCGGCTCCCAGGGCTGAAGTG-3';
ZIC2-G4, 5'-CGTTGAGCACATTCTGCGAGCCGTG-3'
(*ZIC2* exon2)

ZIC2-G7, 5'-CAGTGCATCAAGCAGGAGCTAATC-3';
ZIC2-G8, 5'-AAAAACACCTCCCATCCCAGGTCC-3'
(*ZIC2* exon3)

ZIC2-G9, 5'-TGAGTGGGGGCTCTGCAGGCTCTGG-3';
ZIC2-G10, 5'-TCCCAGGCCGCGGTGAGGTGGTCCGG-3'
ZIC2-G11, 5'-CTGCACTCCACCCAGTCCCCTCTG-3';
ZIC2-G12, 5'-CATGATCACAAGGTGCCCTCGCTGC-3'

以下に各遺伝子断片のPCR増幅条件を示す。反応はすべてLA *Taq* Polymerase (宝酒造) を用いてPE-2400サーマルサイクラーにて行った。

(*SHH*)

96°C, 1min (96°C, 15sec; 60°C, 30sec; 72°C, 1min) x 30 cycles 72°C, 5min

(*ZIC2*)

96°C, 3min (96°C, 30sec; 65°C, 30sec; 72°C, 1min) x 30 cycles 72°C, 5min

反応後に、1.5%アガロースゲル電気泳動を行い、大きな欠失もしくは挿入変異の有無を確認した。次に増幅産物をQiaquick Gel Extraction kit (キアゲン社) にて精製後、Big Dye Terminator DNA Sequencing kit (アプライドバイオシステムズジャパン社) によりシーケンシング反応を行い、PRISM310 Genetic Analyzerにより、配列決定を行った。

シーケンシング反応用プライマーは鋳型増幅用プライマーを用いた。ただし、*ZIC2* 遺伝子エクソン1は、その他に断片の内側に位置する

ZIC2-G2, 5'-TGAGCTTGAAGGCTCCCATGTGCG-3',

ZIC2-G3, 5'-GCAGGACCGTGAAGTGAAGCCTGG-3'

の両プライマーもシーケンシング反応に使用した。決定された配列は、BLAST 2 Sequences ソフトウェア (NCBI) を用いて、各野生型遺伝子配列と比較し、変異・多型の有無を検索した。

(倫理面への配慮)

患者からの末梢血採取およびゲノムDNA抽出は本研究分担者からは独立して実施された。本遺伝子解析を行うにあたっては、水頭症遺伝子バンクにおいて匿名化された患者ゲノムDNAをバンクから受け取り、変異の検索を行った。したがって、遺伝子解析担当者は、患者の個人情報と解析結果を結びつけることのできる立場にはない。

C. 研究結果

SHH、*ZIC2* 両遺伝子の全アミノ酸コーディング領域およびエクソン-イントロン接合部の配列について変異の検索を行ったが、現在までのところ、疾患原因に相当するような変異は患者5例において見出されていない。

SHH 遺伝子については、第3エクソンの後半(約500bp)をのぞく全領域(全462アミノ酸中の1番から293番)について、5例の検索を終了した。まず、既に報告されている欠失変異はPCR産物の鎖長から判定されうるが、検索した領域において欠失は見出されなかった。

次に、アミノ酸変異を伴わないサイレントな変異としては、以下の2例が見出された。

患者1-F7 Gly201 (GGC→GGC/T)

患者1-G5 Asn189 (AAC→AAC/T)

アミノ酸置換を伴うミスセンス変異については当初、患者2例(1J1,2A1)の第2エクソン中において、新規の変異(Met115Ile)がヘテロ接合体の形で存在するのではないかと疑われ、本年度班会議において再確認中であることを報告した。しかしながら再度の検討の結果、これら5例においては検索した領域(アミノ酸1番から293番)におけるミスセンス変異をみとめなかった。

なお、Met115Ileの確認は次のようにして行った。2つの異なるロットの鋳型DNAをPCR法によりまず調製し、つぎに、最初のロットの鋳型DNAとともに、それぞれについてシーケンシング決定を2回行い、結果が再現されるかどうかを調べた。その結果、変異の存在は否定された。また、エクソン-イントロン接合部の配列にも、スプライシング異常を予想させるような変異は見出されなかった。

次に、*ZIC2* 遺伝子は3つのエクソンから成るが、現在までに変異の検索を終えた領域は、エクソン1の5'末端側約500bpおよび3'末端側350bp、エクソン2の全領

域、エクソン3のアミノ酸コーディング領域である。

本遺伝子においては、欠失・挿入やミスセンス変異、さらにはアミノ酸変異を伴わない点突然変異のいずれも見出さなかった。またSHH同様、エクソン-イントロン接合部の配列にも変異をみとめなかった。

D. 考 察

HPE3におけるSHHの変異はこれまで13タイプが見出されており、一方、HPE5におけるZIC2の変異は4タイプが報告されている（このうち一例は、同時にSHHでのヘテロ変異を有するHPE3の患者であった）。

水頭症遺伝子バンクに登録された患者5例におけるSHH、ZIC2遺伝子に関する現在までの解析では、疾患原因となるような変異は見つかっていない。しかしながら、未だ解析していない領域が各遺伝子について残っており、それらの領域における変異の存在もすでに報告されているため、現在引き続き解析中である。

また今回の解析過程で、アミノ酸変異を伴わない塩基置換をSHH遺伝子において見出したが、一般にこれらはSNPs（1塩基多型）としてあまり重要視されていない。しかし最近、X連鎖性水頭症において、LI遺伝子のサイレント変異の起こった部位において、スプライシングのシグナルが生じ、本来とは異なるスプライシングを受けたmRNAが合成され、疾患発症に至ったと考えられる事例が報告されている。しかしながら、今回のHPE患者2例では、サイレント変異周囲の配列がスプライシング・シグナル配列と相同性を示すことはなかった。

本バンクにおけるサンプル収集は末梢血由来ゲノムDNAに限定されているので、転写産物の配列解析を行うことができないことから、スプライシング異常が生じる可能性にも十分配慮して、サイレント変異とその周囲の配列の解析を行うことが今後も必要であると考えられる。

なお今回取り上げた両遺伝子のうちZIC2遺伝子は、特にGCに富む部分配列が多く含まれ、効率よく正確に配列を解析する上で妨げになっていることから、今後のHPE検体数の増加に対応するためにも、シーケンス反応に用いるプライマーの位置や反応条件の見直しをする必要があると考えられる。

E. 結 論

水頭症遺伝子バンクに登録されている5例の全前脳胞

症患者におけるSHH、ZIC2両遺伝子中に、疾患原因とみなし得る変異は現在までのところ見出されていない。未だ解析していない配列における変異の有無について、確定を急ぐとともに、今後増加する検体の解析に対応できるように、プライマーの設定等解析条件の見直しにやり組んでいきたい。

F. 謝 辞

貴重な症例の提供を頂いた北海道立小児総合保健センター脳神経外科高橋義男先生・国立療養所香川小児病院脳神経外科中川義信先生・名古屋市立東病院脳神経外科山下伸子先生に感謝致します。

参考文献

- 1) Du YZ, Dickerson C, Aylsworth AS, Schwartz CE. A silent mutation, C924T(G308G), in the LICAM gene results in X linked hydrocephalus(HSAS). J Med Genet 35:456-62, 1998

小脳形成異常症における *ZIC1*、*Engrailed-2* 遺伝子異常の検索

大阪府立母子保健総合医療センター 企画調査部¹ 国立大阪病院 臨床研究部² 国立大阪病院 脳神経外科³

岡本 伸彦¹ 金村 米博² 山崎 麻美³

研究要旨

小脳低形成を呈するヒトの疾病にはDandy-Walker奇形、Joubert症候群等が知られているが、責任遺伝子は同定されていない。小脳構造異常を呈する先天性疾患群において候補遺伝子 (*ZIC1*、*Engrailed-2*) の変異を検索した。両遺伝子はそのノックアウトマウスにおいて小脳低形成を生じ、候補遺伝子と考えられるが、現時点では変異は同定されていない。

A. 研究目的

小脳低形成を呈するヒトの疾病にはDandy-Walker奇形、Joubert症候群等が知られているが、責任遺伝子は同定されていない。

我々は、Dandy-Walker奇形、Joubert症候群、Cranio-Cerebello-Cardiac症候群等、小脳構造異常を呈する先天性疾患群において候補遺伝子の検討を行った。*ZIC1* 遺伝子は小脳顆粒細胞系列に強く限局し小脳のパターンを決定するZn finger型転写因子である¹⁾。*Drosophila*の*odd-paired*遺伝子と相同な遺伝子としてクローニングされた。小脳外顆粒層に発現する。そのノックアウトマウスは異常行動、小脳の低形成、小脳小葉構造の異常を呈することが報告されている²⁾。

Engrailed-2 (以下*EN2*) は胎児期に中脳、小脳領域に発現し、中枢神経の発生に重要な転写因子のひとつである³⁾。2個のエクソンからなり、第2エクソンにはホメオボックスを持つ。ノックアウトマウスは生存可能であるが小脳組織の欠損、葉構造の異常等がみられる⁴⁾。しかし、*ZIC1*ノックアウトマウス等と異なり、運動機能に大きな影響はない。

本研究ではスクリーニング的な目的で、マウスの小脳

異常との関係が証明されている*ZIC1*、*EN2*両遺伝子について、転写因子として重要なDNA結合領域、ホメオボックス領域について変異の有無を検討した。

B. 研究方法

水頭症バンクに登録された、Dandy-Walker症候群5例、Joubert症候群2例、Cranio-Cerebello-Cardiac症候群1例、原因不明の小脳形成不全2例の小脳の先天異常を呈する患者を対象にした。これらの疾病はいずれも現時点では責任遺伝子は不明で、Joubert症候群の一部で連鎖解析が行われている程度である。対象例に染色体検査施行例では異常なかった。

末梢血リンパ球からDNAを抽出し、PCR法によって*ZIC1*遺伝子、*EN2*遺伝子を増幅した。*ZIC1*遺伝子は図1の3個のエクソンからなり、Znフィンガー型のDNA結合領域を持つ転写因子である。DNA保存領域は種を越えて、アミノ酸配列がよく保存されている。今回の解析では、DNA結合領域を中心に解析を行った。

*ZIC1*遺伝子の第1エクソンのDNA結合領域増幅用のプライマーは、*ZIC1*-1F 5'-TTCCGCTACATGCGCCAACCCA-3'、*ZIC1*-1R 5'-CTGTGTGCGTCCTTTTGTG-3'を用いた。*ZIC1*遺伝子の第2、3エクソンのDNA結合領域増幅用の

図1 ZIC1遺伝子の構造とプライマー位置

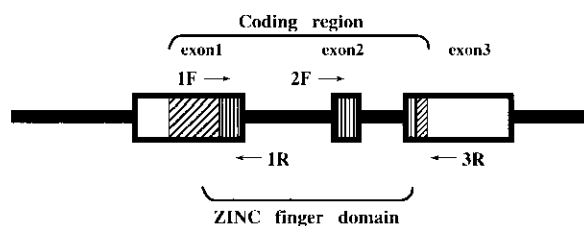
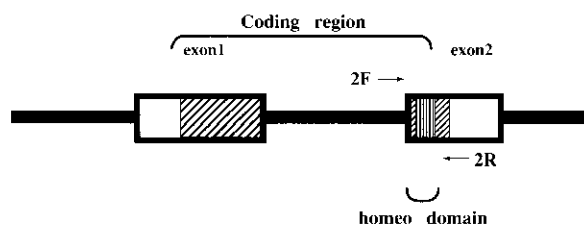


図2 EN2遺伝子の構造とプライマー位置



プライマーは、ZIC1-2F 5'-GGGAGAAGCCCTTCAAGTGCG-3'、ZIC1-3R 5'-AAATAGGGTTTTGTTCGATGT-3'を用いた。

EN2は図2に示すように2個のエクソンからなる。EH1～5という、種を越えてアミノ酸配列の保存された領域がある³⁾。エクソン2にはホメオドメイン (EH4) とEH5が存在する。この他にもEH1、EH2、EH3がエクソン1に存在するが、今回は解析しなかった。EN2遺伝子のexon2 (EH4とEH5) 増幅用のプライマーは、EN2-2F 5'-GTCCCAGGTCTCGAAAACCAA-3'、EN2-2R 5'TGTTTAGC GCGGACTGAGACC-3'を用いた。

PCR反応条件は、ZIC1もEN2もともに、94℃2分加熱後94℃1分、57℃1分、72℃2分のサイクルを30回繰り返し、最後に72℃で10分延長反応させた。

PCR反応液をアガロースゲルで電気泳動し、目的のサイズのPCR産物を切り出して回収した。直接シークエンスで塩基配列を決定した。ABI社のオートシークエンスを用いた。

なお、検体採取の段階で患者家族にインフォームドコンセントを得、倫理面に十分配慮した。

C. 研究結果

今回の検索では、アミノ酸置換を伴う変異は検出されなかった。Cranio-Cerebello-Cardiac症候群症例では、ホメオボックス内にTTG→CTGの塩基置換を認めたが、Leuをコードすることに変わりなく、病因ではないと考えられた。小脳形成不全を呈する疾患群は遺伝的異質性

を持つと考えられ、さらに検討を続けている。

D. 考察

Dandy-Walker奇形は後頭蓋窩嚢胞、第IV脳室拡大、小脳虫部形成不全を呈する中枢神経奇形の1種である。Dandy-Walker奇形は小脳虫部の低形成、第4脳室の拡大を特徴とするが、水頭症を伴う例もある。小脳失調症状や精神運動発達遅滞、他の奇形を合併する例や、小脳失調がめだたず発達も良好な例等、臨床的にはかなり幅広いものを含んでいる。ZIC1ノックアウトマウスは神経症状が強く出現しており、Dandy-Walker奇形の予後良好例とは関連が少ないように思われる。Dandy-Walker奇形には病的には多様なものを含んでいると考えられ、一部にはZIC1やEN2遺伝子異常によるものも存在するとの仮説を立て、さらに検討を続ける予定である。

Joubert症候群は小脳虫部低形成、眼底コロボーマ、生下時からの低緊張、新生児期の呼吸異常 (多呼吸)、異常眼球運動を呈する疾患である。常染色体劣性遺伝性であるが、責任遺伝子は不明である。Wnt1遺伝子のノックアウトマウスは小脳の低形成を生じる。Pellegrinoらは、この点に着目してJoubert症候群におけるWnt1遺伝子変異を検索したが、異常は同定できなかった⁵⁾。Joubert症候群の一部は9q34.3に連鎖することが報告されているが、やはり遺伝的異質性が存在する⁶⁾。一部の例では腎臓異常を合併するが、そのような症例では腎臓と神経系の発生に共通に関与する遺伝子を検討する必要がある。ZIC1異常マウスでは多呼吸は観察されていないが、各種の神経学的異常はJoubert症候群と通ずる面があると考えられる。今回は2例のみの解析であったが、さらに症例を増やして解析を行う方針である。

Cranio-Cerebello-Cardiac症候群 (3C症候群) はDandy-Walker奇形に前頭部突出等の特徴的顔貌、先天性心疾患を合併する症候群である⁷⁾。常染色体劣性遺伝性であるが、やはり責任遺伝子は同定されていない。本邦では確実な症例は報告されていない。ZIC1遺伝子は心臓の発生に関与するというデータはなく、ノックアウトマウスにみられたような神経学的異常も認めなかったが、この症例においてもZIC1異常は認めなかった。EN2遺伝子についてはアミノ酸置換を伴わない塩基変異を認めたが、今後、他の領域も検索予定である。3C症候群については、中枢神経と心臓の発生に共通に関与する遺伝子の関与も考えられる。

E. 結 論

小脳形成不全を伴う先天性疾患群において、*ZIC1*、*EN2*両遺伝子の重要な領域の変異をシーケンスによってスクリーニングしたが、病因となりそうな変異は同定できなかった。今後、さらに症例と対象遺伝子を増やして検討する方針である。

F. 謝 辞

貴重な症例の提供を頂いた大阪市立総合医療センター坂本博昭先生、国立療養所香川小児病院脳神経外科中川義信先生、静岡県立こども病院佐藤博美先生、沖縄県立那覇病院下地武義先生に感謝致します。

文 献

- 1) Aruga J, Yokota N, Hashimoto M, Furuichi T, Fukuda M, Mikoshiba K. A novel zinc finger protein, *Zic*, is involved in neurogenesis, especially in the cell lineage of cerebellar granule cells. *J Neurochem* 63:1880-1890, 1994.
- 2) Aruga J, Minowa O, Yaginuma H, Kuno J, Nagai T, Noda T, Mikoshiba K. Mouse *Zic1* is involved in cerebellar development. *J Neurosci* 18:284-93, 1998.
- 3) Logan C, Hanks MC, Noble-Topham S, Nallainathan D, Provart NJ, Joyner AL. Cloning and sequence comparison of the mouse, human, and chicken engrailed genes reveal potential functional domains and regulatory regions. *Dev Genet* 13: 345-358, 1992.
- 4) Joyner AL, Herrup K, Auerbach BA, Davis CA, Rossant J. Subtle cerebellar phenotype in mice homozygous for a targeted deletion of the *En-2* homeobox. *Science* 251: 1239-1243, 1991.
- 5) Pellegrino JE, Lensch MW, Muenke M, Chance PF. Clinical and molecular analysis in Joubert syndrome. *Am J Med Genet* 72: 59-62, 1997.
- 6) Saar K, Al-Gazali L, Sztriha L, Rueschendorf F, Nur-E-Kamal M, Reis A, Bayoumi R. Homozygosity mapping in families with Joubert syndrome identifies a locus on chromosome 9q34.3 and evidence for genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet* 65:1666-71, 1999.
- 7) Ritscher D, Schinzel A, Boltshauser E, Briner J, Arbenz U, Sigg P. Dandy-Walker (like) malformation, atrio-ventricular septal defect and a similar pattern of minor anomalies in 2 sisters: a new syndrome? *Am J Med Genet* 26:481-491, 1987.

神経管閉鎖不全症における癌抑制遺伝子p53の変異検索

兵庫医科大学脳神経外科¹、国立大阪病院臨床研究部²、国立大阪病院脳神経外科³

森 鑑二¹ 金村 米博² 山崎 麻美³ 有田 憲生¹

はじめに

ヒト悪性腫瘍の約50%で変異が見いだされている癌抑制遺伝子p53は放射線、紫外線、薬剤になどによってDNAが損傷を受けた際発現が誘導され、細胞周期を停止して修復を誘導したり、アポトーシスによる細胞死を誘導する。これらの機序により、p53蛋白は遺伝子レベルでの変異が娘細胞に伝えられることを予防し、結果的に悪性腫瘍の発生を抑制していると考えられている^{1,2)}。p53遺伝子ノックアウトマウスの解析より、p53蛋白は正常発生に必須ではないと考えられているが、一部に脳腫が発生する^{3,4)}。その他、正常マウスに比べて胎児期の放射線被曝による死亡率が減少し、奇形発生率が増加することやDNA障害性を有する薬剤であるベンゾピレンの暴露によっても奇形発生率が増加することも報告されている^{5,6)}。以上のことから、p53遺伝子は胎児期に生じた遺伝子異常やストレスによる奇形の発生に対しても予防的に機能していることが推測され、p53の機能を喪失させるような遺伝子変異が中枢神経系奇形、なかでも神経管閉鎖不全症の発生に促進的に働いている可能性があると考えられる。

A. 研究目的

神経管閉鎖不全症におけるp53遺伝子の変異を検索し、ヒトでも本症の発症にp53遺伝子変異が関与しているか否かを検討する。

B. 研究対象と方法

本研究班の指針に従い遺伝子解析に対して同意の得られた神経管閉鎖不全症患者を対象とした。p53遺伝子のDNA結合ドメインを構成しており、悪性腫瘍で変異が最も高頻度に認められているエクソン5、6、7、8について特異的なprimerを作成、末梢血リンパ球より抽出したgenomic DNAを鋳型としてこれらのエクソンをPCR法にて増幅し、塩基配列を解析した。

C. 研究結果

現在までに解析を行った8例（脳腫1例、二分脊椎7例）ではp53遺伝子の塩基変異は認められなかった。

D. 考察

現在までの解析では神経管閉鎖不全の患者中にp53遺伝子異常は見出せなかった。先天的にp53遺伝子変異をもち、若年時より様々な悪性新生物に罹患するLi Fraumeni症候群でも、中枢神経系奇形の発症率が有意に高いとする報告は見受けられない（OMIM 151623）こと、p53遺伝子ノックアウトマウスにおける脳腫の発生も高頻度ではないことなどから、ヒトの神経管閉鎖不全症でもp53遺伝子変異の頻度は低いことが予測され、多数の症例を解析する必要があると考える。また、p53蛋白の機能解析において、p53蛋白によるアポトーシス誘導にはSer46のリン酸化が必須であることが明らかにされたり⁷⁾、p53遺伝子と相同性を有する遺伝子として

単離された*p73*遺伝子と*p63*遺伝子のスプライスヴァリエントがともに*p53*蛋白の機能制御に関与している可能性が指摘されている。また、*p73*遺伝子ノックアウトマウスで水頭症や海馬の形成異常が認められることから、*p53*遺伝子ファミリーが共同して中枢神経系の正常発生に関与している可能性も推測される^{8,9,10)}。これらの知見から、今後*p53*遺伝子の解析対象を、現在のエクソン5、6、7、8から全エクソンに拡げる他、*p73*遺伝子についても解析をおこなう予定である。

文 献

- 1) Levine AJ: p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88: 323-331, 1997
- 2) Steele RJ, Thompson AM, Hall PA, Lane DP: The p53 tumor suppressor gene. *Br. J. Surg.* 85: 1460-1467, 1998
- 3) Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA Jr, Butel JS, Bradley A: Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356: 215-221, 1992
- 4) Sah VP, Attardi LD, Mulligan GJ, Williams BO, Bronson RT, Jacks T: A subset of p53-deficient embryos exhibit exencephaly. *Nat Genet* 10: 175-180, 1995
- 5) Norimura T, Nomoto S, Katsuki M, Gondo Y, Kondo S: p53-dependent apoptosis suppresses radiation-induced teratogenesis. *Nat Med* 2: 577-580, 1996
- 6) Nicol CJ, Harrison ML, Laposa RR, Gimelshtein IL, Wells PG A: teratologic suppressor role for p53 in benzo[a]pyrene-treated transgenic p53-deficient mice. *Nat Genet* 10: 181-187, 1995
- 7) Oda K, Arakawa H, Tanaka T, Matsuda K, Tanikawa C, Mori T, Nishimori H, Tamai K, Tokino T, Nakamura Y, Taya Y: p53AIP, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell* 102: 849-862, 2000
- 8) Yang A, Walker N, Bronson R, Kaghad M, Oosterwegel M, Bonnin J, Vagner C, Bonnet H, Dikkes P, Sharpe A, McKeon F, Caput DA: p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature* 402: 99-103, 2000
- 9) Pozniak CD, Radinovic S, Yang A, McKeon F, Kaplan DR, Miller FD: An anti-apoptotic role for the p53 family member, p73, during developmental neuron death. *Science*

289: 304-306, 2000

- 10) Liefer KM, Koster MI, Wang XJ, Yang A, McKeon F, Roop DR: Down-regulation of p63 is required for epidermal UV-B-induced apoptosis. *Cancer Res.* 60: 4016-4020, 2000

胎児頭蓋内動脈血流速度波形計測

香川医科大学母子科学講座周産（生）期学

金 西 賢 治 秦 利 之

研究要旨

近年、超音波ドプラ法を用いた胎児頭蓋内血流計測が盛んに行われ、カラードプラ法を併用することで、より正確な頭蓋内血管の同定が可能となり、その結果、頭蓋内血流動態の胎児発育に伴う変化や胎児仮死における特徴的な血流動態が報告されるようになってきた。一方、胎児先天性水頭症においては、その発症機序は複雑な因子が多様に組み合わさり、いまだ不明な部分が多いのが現状であるが、胎生の比較的早い時期より、頭蓋内の形態的な異常に血流動態の変化も伴う場合もあり、胎児頭蓋内の血流動態を観察することは、先天性中枢神経奇形の発症を考えるうえで非常に重要であると考えられる。また、先天性中枢神経奇形の出生前診断においても、従来の超音波画像診断にカラードプラ法を組み合わせることで、形態、および血流動態の双方から病態を把握する事ができ、治療、予後について検討するのに非常に有用であると考えられる。

A. 研究目的

正常胎児における頭蓋内動脈血流を観察し、主要な動脈の血流速度波形計測を行い、妊娠週数の進行に伴う胎児頭蓋内の正常な血流動態を把握し、頭蓋内血行動態異常を認める胎児中枢神経異常例と比較した。

B. 研究方法

1. 正常胎児における頭蓋内動脈血流速度波形計測

妊娠28週から40週までの合併症のない正常胎児を対象に超音波検査を施行し、Willis動脈輪を正確に同定した後、前大脳動脈（ACA）、中大脳動脈（MCA）、後大脳動脈（PCA）のresistance index（RI）を計測した。次に、同様の手技を用い、妊娠21週から40週までの正常胎児を対象に胎児眼動脈（OA）、MCAのpulsatility index（PI）を計測した。さらに、妊娠15週から40週までの正常妊娠の単体児におけるMCAのPIと、子宮内胎児発育遅延のない双胎、品胎のMCAのPIを計測した。

2. 胎児中枢神経奇形における頭蓋内動脈血流速度波形計測

ガレン動静脈奇形の流入動脈のPI、Dandy-Walker症候群、小脳低形成、全前脳胞症、水頭症4例のMCAのPIを計測した。

C. 研究結果

1. 正常胎児における頭蓋内動脈血流速度波形計測

ACA, MCA, PCAのRI値をTable 1 に示す。正常胎児のACA, MCA, PCAともRIは妊娠週数の進行に伴い、有意

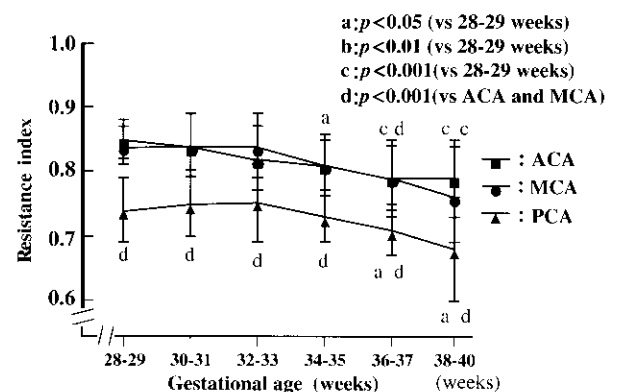


Fig. 1 胎児頭蓋内動脈における RI の変化
(秦ら, Neurosonology, 3: 74-77, 1990²⁾ より引用)

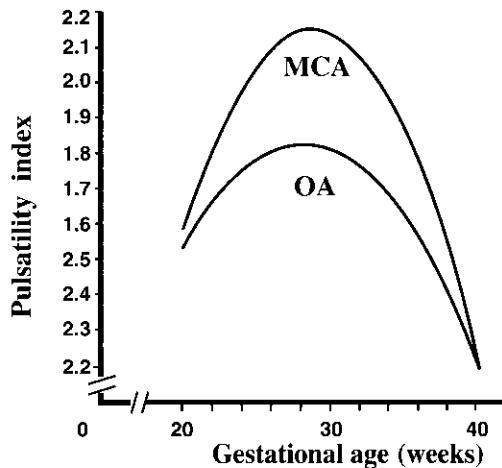


Fig. 2 胎児眼動脈(OA)と中大脳動脈(MCA)のPIの変化 (Aoki S, et. al. Gynecol Obstet Invest, 41: 232-236, 1996³⁾より引用)

に変化し、妊娠末期では妊娠28~29週に比べて有意に低下することを確認した (Fig. 1)。また、ACA, MCAのRIに比較してPCAのRIは妊娠期間を通じて低い値であることが判明した。

胎児OAとMCAのPI値をTable 2に示す。OAのPIは、妊娠週数の進行に伴いMCAのPIと同様な27~28週をピークにした放物線を描き、その値は、MCAのPIに比較しつねに低値であった (Fig. 2)。

正常妊娠の単胎児、双胎児、品胎児のMCAのPI値をTable 3に示す。正常妊娠の単胎児、双胎児のMCAのPIは27~28週をピークにした緩やかな放物線を描いたが、品胎児のMCAのPIは直線状となった (Fig. 3)。しかしながら、これらの値に有意差は認められなかった。

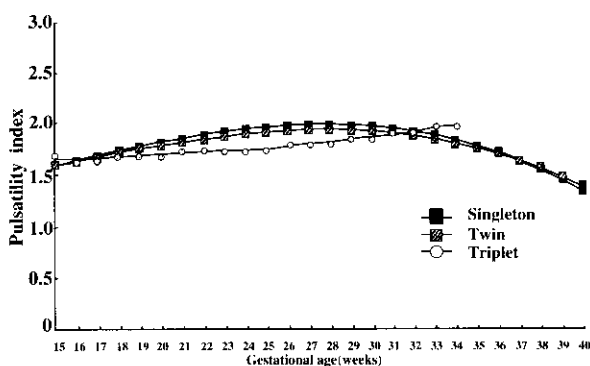


Fig. 3 単胎児、双胎児、品胎児における中大脳動脈 (MCA) のPIの変化 (Akiyama M, et. al. Hum Reprod, 14: 2635-2643, 1999⁴⁾より引用)

2. 胎児中枢神経奇形における頭蓋内動脈血流速度波形計測

ガレン動静脈奇形の流入動脈のPIは0.58であった。Dandy-Walker症候群、小脳低形成、前全脳胞症、水頭

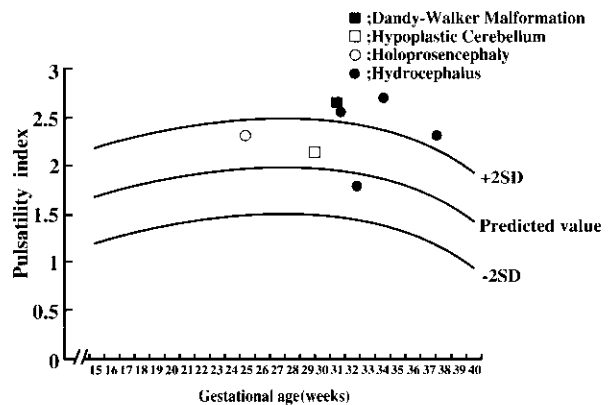


Fig. 4 胎児中枢神経異常例における中大脳動脈 (MCA) のPI値

Table 1. Resistance index (RI) values from intracranial arteries.

Gestational age (week) (N)	ACA	MCA	PCA
28~29(11)	0.85±0.03	0.85±0.03	0.74±0.05
30~31(14)	0.84±0.05	0.84±0.05	0.75±0.05
32~33(17)	0.82±0.05	0.84±0.05	0.75±0.06
34~35(27)	0.81±0.05	0.81±0.05	0.73±0.04
36~37(40)	0.79±0.06	0.79±0.05	0.71±0.04
38~40(25)	0.76±0.06	0.76±0.08	0.68±0.08

Results are mean ± SD.

ACA:anterior cerebral artery, F(5,128)=7.16, p<0.01

MCA:middle cerebral artery, F(5,128)=7.15, p<0.01

PCA:posterior cerebral artery, F(5,128)=5.89, p<0.001

(秦ら, Neurosonology, 3:74-77, 1990²⁾より引用)

Table 2. Normal range for pulsatility index (PI) values for ophthalmic artery(OA) and middle cerebral artery (MCA)

Gestational age Weeks	OA			MCA		
	-2SD	PD*	+2SD	-2SD	PD**	+2SD
21	1.27	1.63	1.99	1.17	1.72	2.27
22	1.33	1.69	2.04	1.27	1.82	2.37
23	1.38	1.74	2.09	1.37	1.92	2.47
24	1.42	1.78	2.13	1.45	2.00	2.55
25	1.45	1.81	2.17	1.51	2.06	2.61
26	1.49	1.83	2.19	1.56	2.11	2.66
27	1.49	1.85	2.21	1.60	2.15	2.70
28	1.50	1.86	2.21	1.62	2.17	2.72
29	1.50	1.85	2.21	1.63	2.18	2.73
30	1.49	1.84	2.20	1.62	2.17	2.72
31	1.47	1.82	2.18	1.59	2.14	2.69
32	1.44	1.79	2.15	1.55	2.10	2.65
33	1.40	1.76	2.11	1.50	2.05	2.60
34	1.36	1.71	2.07	1.43	1.98	2.53
35	1.30	1.66	2.01	1.34	1.89	2.44
36	1.24	1.60	1.95	1.25	1.80	2.35
37	1.17	1.52	1.88	1.13	1.68	2.23
38	1.10	1.44	1.80	1.00	1.55	2.10
39	1.00	1.36	1.71	0.86	1.41	1.96
40	0.90	1.26	1.61	0.70	1.25	1.80

*PI=-1.56+0.244 (MA)-0.00432 (MA)²;SD_R=0.454.

**PI=-4.03+0.43 (MA)-0.00745 (MA)²;SD_R=0.439.

PV=predicted value.

(Aoki S, et. al. Gynecol Obstet Invest, 41:232-236, 1996³⁾より引用)

Table 3. Normal range for pulsatility index (PI) values for middle cerebral artery (MCA)

Menstrual age(Week)	M C A P I								
	Singleton			Twin			Triplet		
	-2SD	PD*	+2SD	-2SD	PD**	+2SD	-2SD	PD***	+2SD
15	1.024	1.604	2.184	0.976	1.600	2.224	1.073	1.657	2.241
16	1.069	1.649	2.229	1.015	1.639	2.263	1.079	1.663	2.247
17	1.114	1.694	2.274	1.054	1.678	2.302	1.085	1.669	2.253
18	1.157	1.737	2.317	1.091	1.715	2.339	1.093	1.677	2.261
19	1.198	1.778	2.358	1.127	1.751	2.375	1.101	1.685	2.269
20	1.236	1.816	2.396	1.160	1.784	2.408	1.110	1.694	2.278
21	1.271	1.851	2.431	1.191	1.815	2.439	1.120	1.704	2.288
22	1.303	1.883	2.463	1.218	1.842	2.466	1.131	1.715	2.299
23	1.330	1.910	2.490	1.242	1.866	2.490	1.143	1.727	2.311
24	1.353	1.933	2.513	1.262	1.886	2.510	1.157	1.741	2.325
25	1.371	1.951	2.531	1.278	1.902	2.526	1.171	1.755	2.339
26	1.384	1.964	2.544	1.289	1.913	2.537	1.187	1.771	2.355
27	1.390	1.970	2.550	1.294	1.918	2.542	1.203	1.787	2.371
28	1.390	1.970	2.550	1.295	1.919	2.543	1.222	1.806	2.390
29	1.383	1.963	2.543	1.289	1.913	2.537	1.241	1.825	2.409
30	1.368	1.948	2.528	1.276	1.900	2.524	1.262	1.846	2.430
31	1.345	1.925	2.505	1.257	1.881	2.505	1.284	1.868	2.452
32	1.314	1.894	2.474	1.230	1.854	2.478	1.308	1.892	2.476
33	1.274	1.854	2.434	1.195	1.819	2.443	1.334	1.918	2.502
34	1.224	1.804	2.384	1.153	1.777	2.401	1.360	1.944	2.528
35	1.165	1.745	2.325	1.101	1.725	2.349	-	-	-
36	1.095	1.675	2.255	1.041	1.665	2.289	-	-	-
37	1.014	1.594	2.174	0.971	1.595	2.219	-	-	-
38	0.921	1.501	2.081	0.891	1.515	2.139	-	-	-
39	0.817	1.397	1.977	0.801	1.425	2.049	-	-	-
40	0.700	1.280	1.860	0.700	1.324	1.948	-	-	-

*PI=1.12+0.00338 (MA)²-0.000082 (MA)³;SD_R=0.290.

**PI=1.18+0.00293 (MA)²-0.000071 (MA)³;SD_R=0.312.

***PI=1.63+0.000008 (MA)³;SD_R=0.292.

PV=predicted value.

(Akiyama M, et. al. Hum Reprod, 14:2635-2643, 1999⁴⁾より引用)

症4例のMCAのPIはそれぞれ2.60, 2.09, 2.19, 2.67, 2.36, 2.57, 1.64であり、水頭症例4例中3例、およびDandy-Walker症候群例では正常胎児と比較しPIの上昇が認められた (Fig. 4)。

D. 考察

解剖学的にみて、中脳前方にあるWillis動脈輪はACA, MCA, PCA,および内頸動脈 (ICA) の末梢部分が非常に接近して存在しており、従来のBモード・パルスドプラ複合装置のみでのこれらの血管の識別は不可能であると考えられる。また、MCAとACAおよびICAのPIの間には有意な差が認められたとの報告や¹⁾、これらの動脈の頭蓋内での屈曲の違いや左右差などを考慮しても、カラードプラ法を用いて胎児頭蓋内血管を個別に同定し、サンプリングポイントの設定を同一し、胎児頭蓋内血流動態に関する詳細な検討をすることは重要であると考えられる。

今回の我々の計測で、正常妊娠における胎児の発育に伴うACA, MCA, PCAのRI、および正常妊娠の単胎児のMCA, OA、子宮内胎児発育遅延のない双胎、品胎児のMCAのPIの正常値を得ることが出来た^{2,3,4)}。いずれにお

いても妊娠末期では妊娠28~29週に比べてこれら頭蓋内動脈のPI,RI値の低下を認めた。妊娠週数の進行とともに胎生初期から大脳は絶えず成長していくが、特に妊娠末期には、大脳半球はきわめて急速な発達を遂げる⁵⁾。こういった大脳半球の成長に伴う胎児頭蓋内血管床の増加により、胎児頭蓋内動脈のRI, PI値が低下を示すものと考えられる。また、OAのPIも頭蓋内動脈のPIと同様の28週頃をピークにした放物線を示すが、妊娠20週から28週にかけてのPIの上昇は、主に発生の過程でのOAの末梢である硝子体動脈の生理的狭窄によるものが考えられる。妊娠30週以降にPIが低下する理由については、妊娠末期にかけての脈絡膜の血管床の増加や、OAの分枝である網膜中心動脈、涙腺動脈、眼窩上動脈および毛様体動脈などの発達によるのが考えられるが、この時期に胎児の動脈酸素分圧が低下するとの報告も有り⁶⁾、PIの変化に動脈の酸素分圧も影響している可能性も示唆されており、今後も詳細な検討が必要であるといえる。

胎児中枢神経奇形例において、頭蓋内血管走行異常を伴う場合でも、カラードプラ法を併用することで正確にMCAを同定することは可能であった。新生児における水頭症の多くは、先天性か頭蓋内出血後水頭症であるが、

いずれも新生児期からの超音波により、ACA, MCA, 脳底動脈のRI, PIが上昇することが報告されている⁷⁾。また、こういった新生児水頭症において、VPシャントなどの治療によりこれらのPIが改善し、水頭症の治療効果の評価に頭蓋内動脈の血流測定は有効であるとの報告もある⁸⁾。今回の我々の検討でも、水頭症4例中3例、およびDandy-Walker症候群1例でPIの上昇が認められ、前述の血流動態の特徴は胎生期から生じている可能性が示唆され、今後、従来の超音波画像診断に胎児頭蓋内動脈血流計測を加えることで、胎児中枢神経異常の出生前診断における、病態の把握、分娩・治療時期の決定ならびに、予後の予測に有用となる可能性が考えられた。

文 献

- 1) Mari G, Moise KJ Jr, Deter RL, Kirshon B, Carpenter RJ, Huhta JC. Doppler assessment of the pulsatility index in the cerebral circulation of the human fetus. *Am J Obstet Gynecol*, 160: 698-703, 1989
- 2) 秦 幸吉、楨原 研、秦 利之、北尾 学. カラードプラ法を用いた胎児前大脳動脈、中大脳動脈および後大脳動脈の血流動態に関する研究. *Neurosonology*, 3: 74-77, 1990
- 3) Aoki S, Hata T, Ariyuki Y, Senoh D, Makihara K, Hata K, Kitao M. Fetal ophthalmic artery blood flow velocity waveforms. *Gynecol Obstet Invest*, 41: 232-236, 1996
- 4) Akiyama M, Kuno A, Tanaka Y, Tanaka H, Hayashi K, Yanagihara T, Hata T. Comparison of alterations in fetal regional arterial vascular resistance in appropriate-for-gestational-age singleton, twin and triplet pregnancies. *Hum Reprod*, 14: 2635-2643, 1999
- 5) Moor KL. *The developing human* (3rd ed). New York: George Thieme Verlag Stuttgart, pp479, 1982
- 6) Soothill PW, Nicolaides KH, Rodeck CH, Campbell S. Effect of gestational age on fetal and intervillous blood gas and acid-base values in human pregnancy. *Fetal Ther*, 1: 168-175, 1986
- 7) Hill A, Volpe JJ. Decrease in pulsatile flow in the anterior cerebral arteries in infantile hydrocephalus. *Pediatrics*, 69: 4-7, 1982
- 8) Nishimaki S, Yoda H, Seki K, Kawakami T, Akamatsu H, Iwasaki Y. Cerebral blood flow velocities in the anterior cerebral arteries and basilar artery in hydrocephalus before and after treatment. *Surg Neurol*, 34: 373-377, 1990