

層で不規則なトレーサーの集積低下が観察され、ベンゾジアゼピン受容体の分布の乱れと受容体結合能の低下が認められた (Fig.1)。左右の脳梁の OD 値平均に対する皮質の OD 値の比は、皮質形成異常部では反対側の正常皮質より有意に低値であった (Table 1)。

D. 考察

¹²⁵I-iomazenil は、中枢性ベンゾジアゼピン受容体の agonist である。ベンゾジアゼピン受容体は、GABA 受容体とカップリングしており、ベンゾジアゼピンが結合することによって GABA 結合部位への GABA 結合が増加し、GABA_A 受容体機能が亢進し、神経細胞の機能を抑制する。人の大脳皮質形成異常における ¹²³I-iomazenil SPECT では、異常皮質が低集積像を示し、てんかん焦点とよく一致することが報告されている。本研究結果でも、我々の大脳皮質形成異常のモデルでは、大脳皮質の第 3,4 層に強く集積するレセプターバンドに断裂が観察され、ベンゾジアゼピン受容体の減少が認められた。このことから、皮質形成異常の病変部では神経抑制系の機能破綻が存在することが示唆された。本動物モデルでは、異常皮質から spike burst が頻発していることが確認されているが、今回の研究結果でベンゾジアゼピン受容体が局所的な減少を示していることから、このような局所的な spike burst の出現に抑制系の破綻が関与していることが推測された。今後は、さらにこのモデルでの脳糖代謝や神経興奮性の変化を検討していく予定である。

E. 結論

新生仔ラットにカイニン酸を注入することで作成した大脳皮質形成異常のモデルを用いて、中枢性ベンゾジアゼピン受容体結合能の変化を調べた。異常皮質ではベンゾ

ジアゼピン受容体の減少を認め、神経抑制系の低下が局所的なてんかん性放電に関与していることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Tsuda H, Hashizume K, Sawamura A, Yoshida K, **Tanaka T**

An experimental model of focal cortical dysplasia
Epilepsia, 42(Suppl 7): 223, 2001

Sawamura A, Hashizume K, Yoshida K, **Tanaka T**

Kainic acid-induced substantia nigra seizure in rats: behavior, EEG and metabolism.
Brain Research, 911:89-95, 2001

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, Lippincott Williams & Wilkins, New York, 2001, pp 801-806

Tanaka T, Hashizume K, Yoshida K, Tsuda H, Hodozuka A, Nakai H.

Surgical treatment of intractable epilepsy: Experimental approach

In: The proceeding of the 2nd International Mt. Bandai Symposium for Neuroscience 2001, (Ed.) K. Watanabe,

Ishii Densan Printing Co., Koriyama,
2001, pp 344-346

Tanaka T, Hashizume K, Sawamura A,
Yoshida K, Tsuda H, Hodozuka A, Nakai
H.

Nefiracetam: a potent antiepileptic effect
on kainic acid-induced focal cortical
seizure status in rats.

Epilepsia, 42(Suppl 7): 83, 2001

Sawamura A, Hashizume K, **Tanaka T**
Electrophysiological, behavioral and
metabolical features of globus pallidus
seizures induced by a microinjection of
kainic acid.

Brain Research, 935: 1-8, 2002

Tanaka T, Hashizume K, Sawamura A,
Yoshida K, Tsuda H, Hodozuka A, Nakai
H.

Basic science and epilepsy: experimental
epilepsy surgery.

Stereotact Funct Neurosurg, 2002, in
press

田中達也、橋詰清隆、中井啓文、程塚 明
実験てんかんのてんかん外科への寄与
高倉高朋、菊地晴彦著、先端医療シリーズ
16・脳神経外科「機能的脳神経外科の最先
端」、

先端医療技術研究所、東京、pp4-11、2002

田中達也、橋詰清隆、津田宏重、加藤宏一、
松尾厚子、山本和秀、程塚 明、中井啓文
21世紀の小児てんかん外科---基礎からの
アプローチ

小児の脳神経、27(1): 1-6, 2002

2. 学会発表

日本てんかん学会(2001年)、アメリカてん
かん学会(2001年)、日本小児神経外科
(2002年)に発表した。

H.知的財産の出願、登録状況

なし

図表の説明

Fig.1 : カイニン酸を $0.5\mu\text{g}$ 注入したラットの ^{125}I -iomazenil オートラジオグラフィー
大脳皮質形成異常側の大脳皮質において、核種の集積の低下を認めた。大脳皮質の第 3,4
層に、オートラジオグラム画像上でレセプターバンドの断裂があり、ベンゾジアゼピン受
容体が減少している(↓印)。

Fig.2 : コントロールラットの ^{125}I -iomazenil オートラジオグラフィー
皮質の核種の取り込みに左右差はない。

Table1 :

大脳皮質形成異常部と反対側の正常皮質の、脳梁に対する optical density の比

	大脳皮質形成異常／脳 梁	正常皮質／脳梁
Optical density の比	6.79 ± 0.58 *	7.39 ± 0.67

图 1





幼若脳の興奮性を規定する分子群に対する形態学的解析

分担研究者 佐藤康二 浜松医科大学教授

研究要旨 クロライドコトランスポーターの発達期に於ける発現を全脳で詳細に調べ、クロライド汲み出し機構の未発達で幼若な神経細胞が GABA によって興奮することを生理学的に証明した。また、更に、シナプス形成、神経回路形成に重要である受容体 clustering に関する分子群についても発達期に多様性を持って発現していることを明かした。このような分子群の未熟性が幼若脳の興奮性を促進していることが示唆された。

A. 研究目的

本研究では、乳幼児におけるけいれんの特殊性を考える上で重要となる諸因子の発達に伴う発現変化を具体的に解明することを目的とする。成熟脳に比し、幼若脳に関する基礎的研究はかなり遅れているのが現状であり、それらの情報の欠如が臨床研究を著しく困難にしている。本研究を推進することによって乳幼児期の脳の特異性が明らかになっていくことが期待され、それらの新知見を共同研究者に還元することにより、より有効な共同研究が推進できると考える。さて、成熟した神経細胞の細胞内クロライド濃度は、他の細胞よりもかなり低く保たれており、そのことが GABA-A 受容体を介した細胞内へのクロライド流入を可能にし、ひいては細胞内電位を過分極側に導き、結果的に神経細胞の抑制を可能ならし

める生理学的基盤となっている。近年、クロライドの細胞内濃度、ひいては神経細胞の興奮性を規定すると考えられる三種のクロライド・コトランスポーター（KCC1, KCC2, NKCC1）の遺伝子が発見され注目を集めている。生理的条件下では、KCC1, NKCC1 は細胞外からのクロライド流入を司り、KCC2 は細胞内から外へのクロライドの汲み出しを司ることが報告されており、この三者のバランスにより各々の神経細胞の興奮性が決定されることが推定されている。また、最近の知見では、幼若な神経細胞では従来抑制系神経伝達物質と考えられていた GABA やグリシン等によって脱分極が引き起こされること、更に神経細胞の発達に伴って KCC2 の発現が増強され、GABA やグリシン等の伝達物質によって過分極を起こす成熟型に転換されることが明らかとなってきた。

よって、乳幼児に生じるけいれん発作の病態と治療に関する研究を進めていく上で、三種のクロライド・コトランスポーターの発現動向を調べておくことが不可欠である。従って、本年度も前年度に引き続き、三者の遺伝子発現の発達変化の検討を詳細に行った。また、実際にそのような生理現象が観察されるかどうかを明かすために生理学的な検討も行った。

また、近年、効果的なシナプス伝達を行うためには、シナプス後膜に、十分な量の受容体蛋白が、集合している (clustering) ことが必要で、それに関与する蛋白群が明らかになりつつある。例えば、GABA 受容体やグリシン受容体の clustering に関与するとされるのが gephyrin や collybistin であり、また、NMDA 受容体の clustering には、PSD-95、AMPA 受容体の clustering には Narp という蛋白が関与していることが明かとなってきている。故に、我々は、上記の分子は、それぞれの神経伝達系の発達のマーカーと考え、それらの発達に於ける遺伝子発現変化についても検討を加えることとした。

B. 研究方法

1. in situ hybridization 法

KCC1, KCC2, NKCC1 mRNA 並びに, gephyrin, collybistin, Narp, PSD-95 mRNA にそれぞれ特異的な oligo cDNA プローブを作成した。それぞれの cDNA の 3'端に酵素を用いて ^{35}S -dATP を結合した。発達の様々なステージのラット脳を取りだし、クライオスタック

トで 20 μm の切片を作成し、上記のプローブをハイブリダイズし、洗浄後、乳剤を塗布し暗箱中にて数週間保存後、現像した。その切片を暗視野顕微鏡下で観察し、脳内における遺伝子発現を in situ hybridization 法にて調べた。

2. GABA に対する神経細胞応答性を検出するための生理実験

発達の様々なステージのラット脳を取りだし、更に嗅球を単離し、スライスを作成した。チャンバー内に固定し、 Ca^{2+} 感受性色素の Fura-2 を神経細胞に取り込ませた後、GABA あるいは glycine を投与し、励起光を与えたときの Fura-2 からの発色を検出し、細胞内 Ca^{2+} 濃度を推定した。

(倫理面への配慮)

浜松医科大学の動物実験倫理指針に則って実験を行った。

C. 研究結果

1. 嗅球に於ける KCC1, KCC2, NKCC1 mRNA 発現の発達変化 (図 1 参照)

嗅球は中枢神経内でも、比較的層構造がはっきりしており、神経細胞種の同定が容易であり、その特徴から様々な研究に利用されている。我々もその利点を利用すべく、生直後から成熟にいた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、KCC1 と NKCC1 mRNA は全ての神経細胞で生後一日から弱く発現していることが明かとなった。更に、その発現は発

達に沿って増強した。細胞間の相違はあまり認めなかった。

それに対し、KCC2 の遺伝子発現は生後 1 日目では、嗅球の神経細胞の中で最も早く成熟する僧帽細胞にのみ見られた。顆粒細胞での KCC2 mRNA の発現は、漸く生後 14 日目で観察された。興味深いことには、この発現順は、これまでにトリチウムの取り込み実験によって調べられてきた神経細胞の最終分裂の順番と一致した。このことは、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している。

2. 嗅球顆粒細胞に於ける GABA 応答の生後変化 (図 2 参照)

上記の実験より明らかのように、嗅球顆粒細胞は、生直後は KCC2 mRNA を発現していないが、生後 14 日目には、豊富な KCC2 mRNA を発現している。このことは、理論上、嗅球顆粒細胞は生直後には、細胞内クロライド濃度が高く、GABA—A 受容体が開くと、クロライドが細胞外に流出する即ち、脱分極すること、また、生後 14 日目には全く逆の現象が観察されることが予測される。また、神経細胞が脱分極すると電位依存性の Ca²⁺チャンネルが開き、細胞内の Ca²⁺が上昇することが既に知られており、GABA を投与したときの細胞内 Ca²⁺の変動を見ることにより、GABA が興奮性に働いているか否かを検出することができる。

さて、図 2 に示すように、顆粒細胞に 100 μM の GABA を投与すると、生後 1 日と生

後 6 日では、細胞内 Ca²⁺は著明に上昇したが、生後 14 日目では、上昇は認められなかった。以上より、生後 6 日から生後 14 日目の間で、KCC2 の発現誘導が生じ、その結果、GABA に対する応答性が興奮から抑制へと変化したことを示している。このような変化は、嗅球だけではなく、脳全体で幅広く起こっていると容易に推測される。

3. その他の領域に於ける KCC1, KCC2, NKCC1 mRNA 発現の発達変化

上記の実験結果が非常に興味深かったので、更に大脳、小脳、間脳などにおける発現も検討した。その結果、脳全体にわたって、KCC2 の遺伝子発現と神経細胞の成熟度はよく相関した。図 3 に示すように、胎生 18 日目においては、視床、視床下部、扁桃体など比較的早く成熟する領域でのみ KCC2 mRNA の発現を認めたが、大脳皮質ではまだ発現していなかった。大脳皮質においては、図 4 に示すように、KCC2 mRNA の発現は生後 1 日目には殆ど認められなかったが、生後 15 日目には豊富に発現していた。このことはこの間に、急激な KCC2 mRNA の発現上昇が起こることを示している。

大脳皮質にける発現は脳の中ではかなり遅いほうであった。このことは、大脳皮質においては生後しばらく GABA は興奮性として働いていることを示しており、GABA 抑制系はかなり遅れて発達してくることを示唆している。この GABA によって惹起される興奮性あるいは、GABA 抑制系の未熟が乳幼児に生じるけいれん発作の病態に密接に関

与していることが、強く示唆される。

また、小脳においても同様の傾向が認められた。この結果を纏めた論文は *Developmental Brain Research* 誌に受理された。

4. シナプス関連蛋白の発達期ラット嗅球に於ける発現変化

まず、GABA 受容体や glycine 受容体など抑制系の受容体の clustering に関与する gephyrin や collybistin mRNA の発現について、発達期のラット嗅球で検討を加えた。その結果、これらの分子は各々の神経細胞が遊走を終え、最終目的地に着いた後に有る程度の分化段階で発現することが分かった。また、その発現時期は、各々の神経細胞の成熟度と良く相関することも明かとなった。このことは、受容体蛋白がきっちりシナプス後膜に cluster を作る時期は、脳内の部位や細胞種によって多様性を有することを示しており；これら GABA や glycine 等主要な抑制系の発達が生後にも生後に起こると仮定すれば、乳幼児に生じるけいれん発作の病態を考える上で避けては通れないポイントになるであろう。

また、興奮性である NMDA 受容体の clustering には、PSD-95、AMPA 受容体の clustering には Narp という蛋白が関与していることが明かとなってきている。そこで両者について、発達期嗅球においてその発現変化を調べてみた。図 5 に示すように、嗅球内では、両者の発現は、各神経細胞の成熟度と正の相関を示した。また、興味深

いことに、いずれの細胞でも、PSD-95 の発現が常に Narp の発現に先行していた。このことは興奮性伝達はず、NMDA 受容体を介して行われ、その後遅れて AMPA 受容体が興奮性伝達の中心となっていくものと考えられる。一見、興奮系の未成熟は興奮性を下げる因子とも考えられるが、抑制ニューロンを興奮させるということも考えなくてはならず、やはり、今後とも十分検討される必要が有る。以上の結果は、二編の論文に纏めて、*Developmental Brain Research* 誌に受理されている。

D. 考察

本年度の研究により、明かとなったことは、脳内の様々な部位で、成熟度の差異により、成熟脳では抑制系の神経伝達物質である GABA やグリシンが興奮性の神経伝達物質として働くと言うことであり、今回の研究ではその現象を生理学的に実際に確認することができた。このことは、特に小児期のけいれん病態を考える上で、避けては通れない観点である。例えば、GABA の受容体への結合を促進して抗けいれん作用を有する benzodiazepine は、臨床でよく用いられるが、本研究から容易に推測されることは、未熟な脳に投与した場合、逆に興奮に働く可能性を有するということであり、慎重に研究されるべき点で有ろう。また、今後、ヒトにおけるクロライドコトランスポーター発現の発達変化の知見が必要となってくると考えられる。

もう一つ、今回注目したのは、シナプス

の成熟という問題で、受容体の clustering 蛋白の遺伝子発現を調べたところ。これに関しても脳内では、領域によって、また、細胞によってかなりの差異が有ることが明らかとなった。この問題を更に解明するためには、生理学的な詳細な検討が必要であることは言うまでもないが、この視点も小児脳の興奮性を考える上で重要であろう。

以上本年度の研究では、形態学的 approach として、クロライドコトランスポーターと受容体の clustering 蛋白に注目して研究を行った。今後、皮質形成異常症、グリシン脳症モデル動物、カイニン酸注入モデルに取り組み、乳幼児に生じるけいれん発作の病態と治療に関する研究を進展させていく所存である。

E. 結論

本研究では、クロライド・コトランスポーター (KCC1, KCC2, NKCC1) の発達脳における遺伝子発現を詳細に検討し、脳の発達につれて KCC2 mRNA の発現が上昇していくことをいくつかの部位で確認した。また、実際に KCC2 mRNA を発現していない神経細胞で、GABA が興奮性に働くことを生理学的に証明した。このことから、幼若脳における易興奮性の一因は KCC2 の働きが弱く細胞内クロライド濃度が高く保たれ、GABA やグリシンの抑制作用が十分に働かないことであると考えられた。

また、シナプスの成熟性の指標として受容体の clustering 蛋白の遺伝子発現を調べたところ、脳内のシナプスの成熟時期に

多様性が存在することが明らかとなった。このような神経伝達物質間の発達のアンバランスも幼若脳の特異性として今後検討を加えていく必要があるだろう。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Differential expression patterns of three glutamate transporters (GLAST, GLT1 and EAAC1) in the rat main olfactory bulb Utsumi M., Ohno K., Onchi H., Sato K. and Tohyama M. Mol. Brain Res. 92 (2001) 1-11.

The differential expression patterns of messenger RNAs encoding K-Cl cotransporters (KCC1,2) and Na-K-2Cl cotransporter (NKCC1) in the rat nervous system.

Kanaka C., Ohno K., Okabe A., Kuriyama K., Itoh T., Fukuda A., and Sato K. Neuroscience 104 (2001) 933-946.

The expression of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in prostatic adenocarcinoma: correlation with neovascularization.

- Sugamoto T., Tanji N., Sato K., Fujita H., Nishio S., Sakanaka M., Yokoyama M. *Anticancer Res.* 21 (2001) 77-88.
- Expressions of neuropilin-1, neuropilin-2 and semaphorin 3A mRNA in the rat brain after middle cerebral artery occlusion.
Fujita H., Zhang B., Sato K., Tanaka J., Sakanaka M. *Brain Res.* 914 (2001) 1-14.
- Structure and expression of the glycine cleavage system in rat central nervous system.
Sakata Y., Owada Y., Sato K., Kojima K., Hisanaga K., Shinka T., Suzuki Y., Aoki Y., Satoh J., Kondo H., Matsubara Y., and Kure S. *Mol Brain Res.* 94 (2001) 119-130.
- Protective effect of a prosaposin-derived 18-mer peptide on slowly progressive neuronal degeneration after brief ischemia.
Morita F., Wen T.-C., Tanaka J., Hata R., Desaki K., Sato K., Nakata K., Ma Y.-J., Sakanaka M. *J. Cereb Blood Flow and Metab.* 21 (2001) 1295-1302.
- Epidermal growth factor down-regulates connexin-43 expression in cultured rat cortical astrocytes.
Ueki T., Fujita M., Sato K., Asai K., Yamada K. and Kato T., *Neurosci. Lett.* 313 (2001) 53-56.
- Developmental changes in gephyrin and collybistin mRNA expressions in the rat olfactory bulb.
Kuriyama K., Ohno K., Shu F., Ueki T., and Sato K. *Dev. Brain Res.* 131 (2001) 67-72.
- Developmental changes in Narp and PSD-95 mRNAs in the rat Olfactory Bulb
Shu F., Ohno K., Kuriyama K., Wang T., Ueki T., Kanayama N., Sato K. *Dev. Brain Res.* 132 (2001) 91-95.
- Expression of mitochondrial tricarboxylate carrier TCC mRNA and protein in the rat brain.
Miyake S., Yamashita T., Taniguchi M., Tamatani M., Sato K., Mitsuda N., Hori O., Yamaguchi A., Tohyama M. *Mol. Brain Res.* in press.
- Developmental changes in KCC1, KCC2, and NKCC1 mRNAs in the rat cerebellum. Mikawa S., Shu F., Wang T., Fukuda A., Sato K. *Dev. Brain Res.* in press

2. 学会発表

KCC1, KCC2, NKCC1 遺伝子のラット脳

内における発現 佐藤康二

平成 13 年度 日本神経科学会

発達期嗅球における gephyrin,

collybistin 遺伝子の発現

栗山寛奈, 佐藤康二

平成 13 年度 日本神経科学会

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

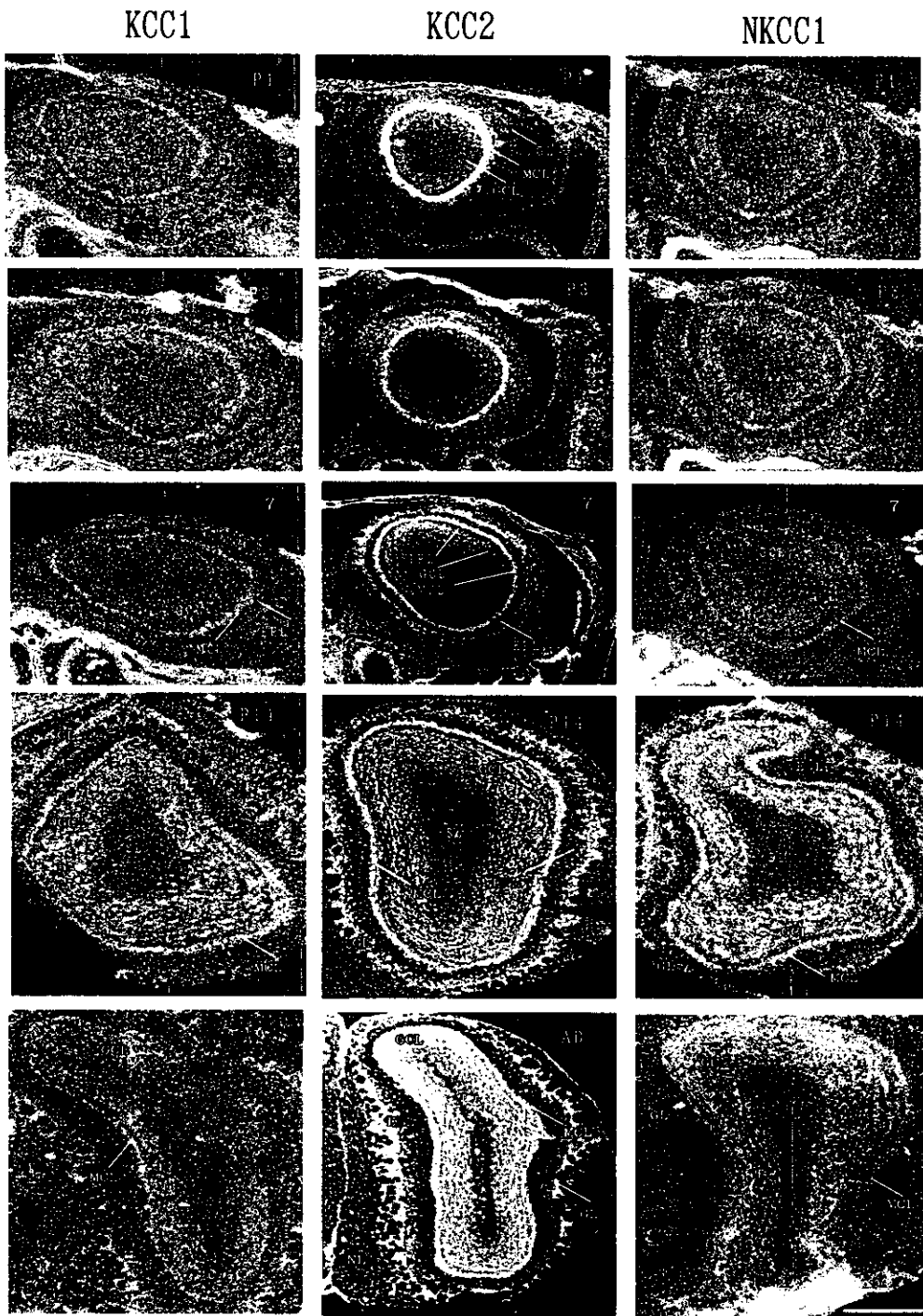


図1 発達期嗅球におけるKCC1,KCC2,NKCC1mRNAの発現 KCC2mRNAは生直後には僧帽細胞にのみ発現を認める。顆粒細胞では、生後14日になって始めてKCC2 mRNAが発現してくる。
 EPL: 外網状層 GCL: 顆粒細胞層 GL: 糸球体層 IPL: 内網状層
 MCL: 僧帽細胞層 ONL: 嗅神経層 SL: 上衣下層

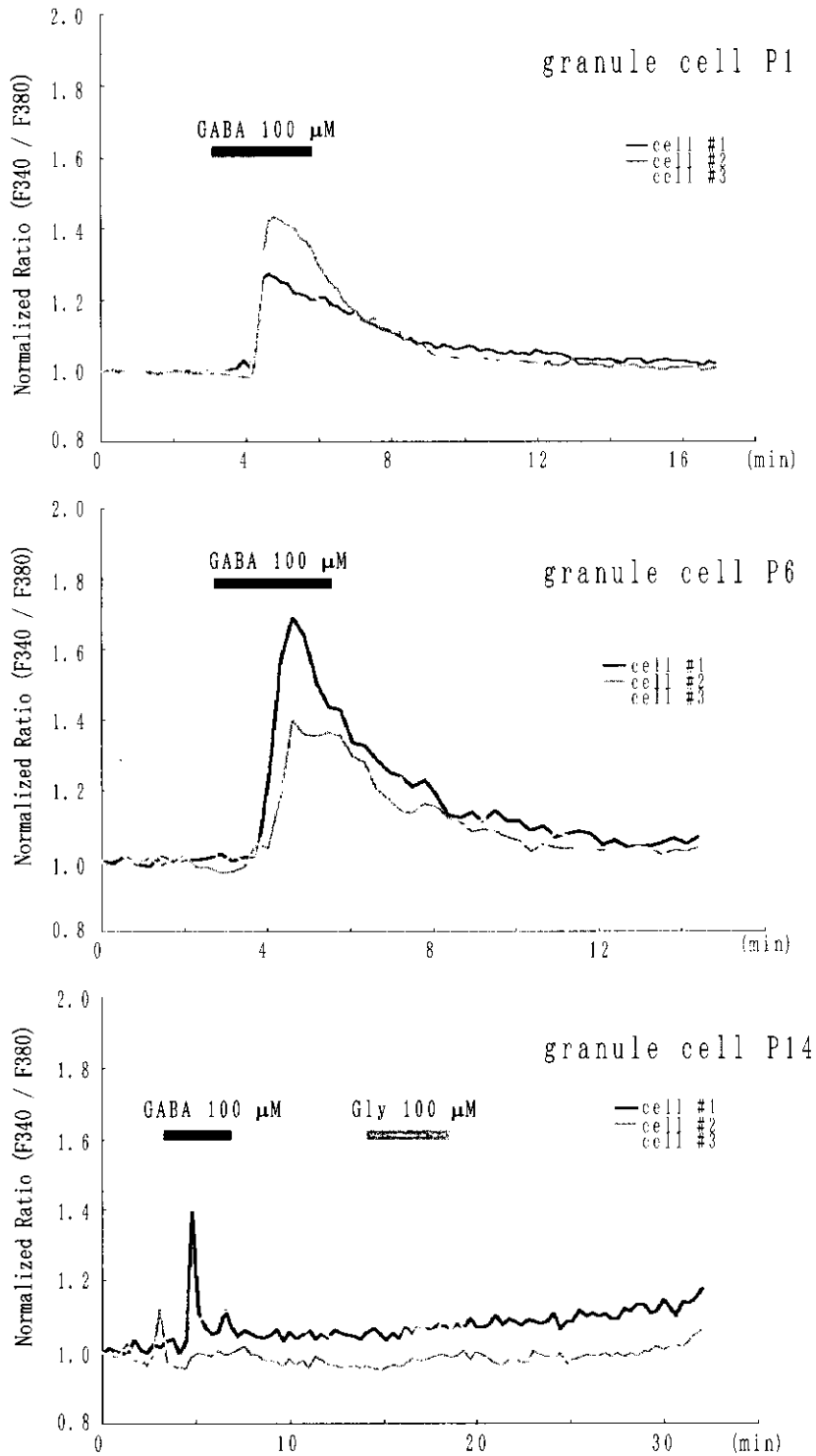


図2 嗅球顆粒細胞に対するGABAの効果の発達変化
 生後1日と6日目では、GABAに反応して細胞内Ca²⁺の上昇が観察されている。このことは、GABAが興奮性に働いていることを示している。生後14日目では、この上昇は観察されず、GABAに対する反応が抑制性であることを示す。

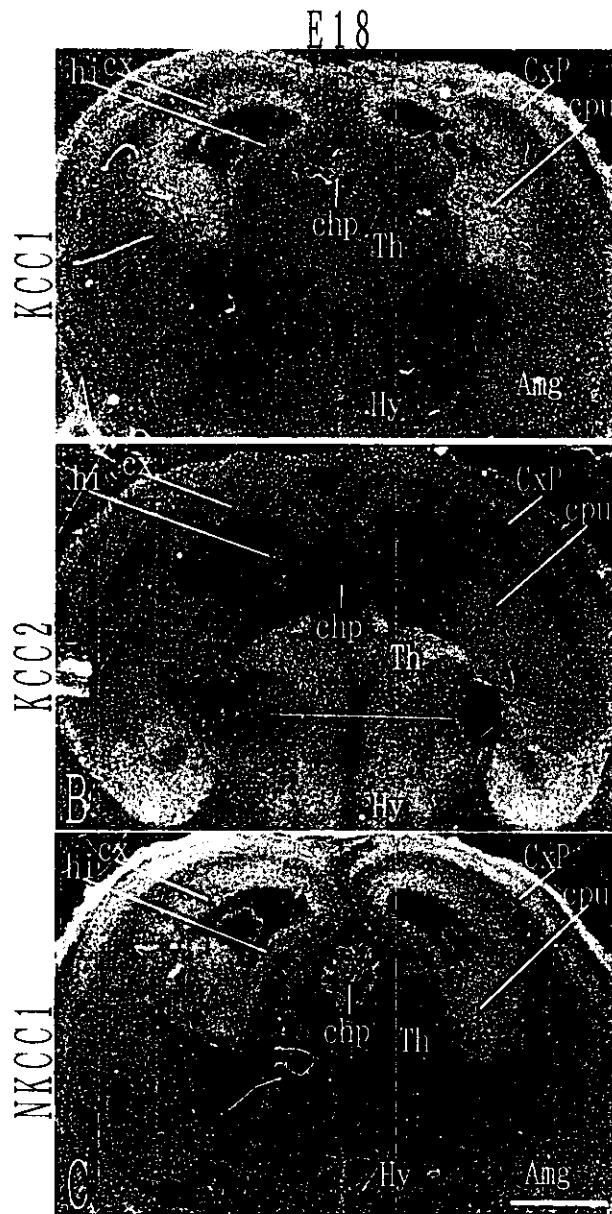


図3 KCC1, KCC2, NKCC1 mRNAの胎生18日による発現 この時期には、視床、視床下部、扁桃体など、比較的早く成熟する領域にのみKCC2 mRNAの発現を認め、海馬や大脳皮質などでは、KCC2 mRNAはまだ発現していない。Amg:扁桃体 chp:脈絡叢 CxP:大脳皮質板 cx:大脳皮質神経上皮 hi:海馬神経上皮 Hy: 視床下部 Th:視床

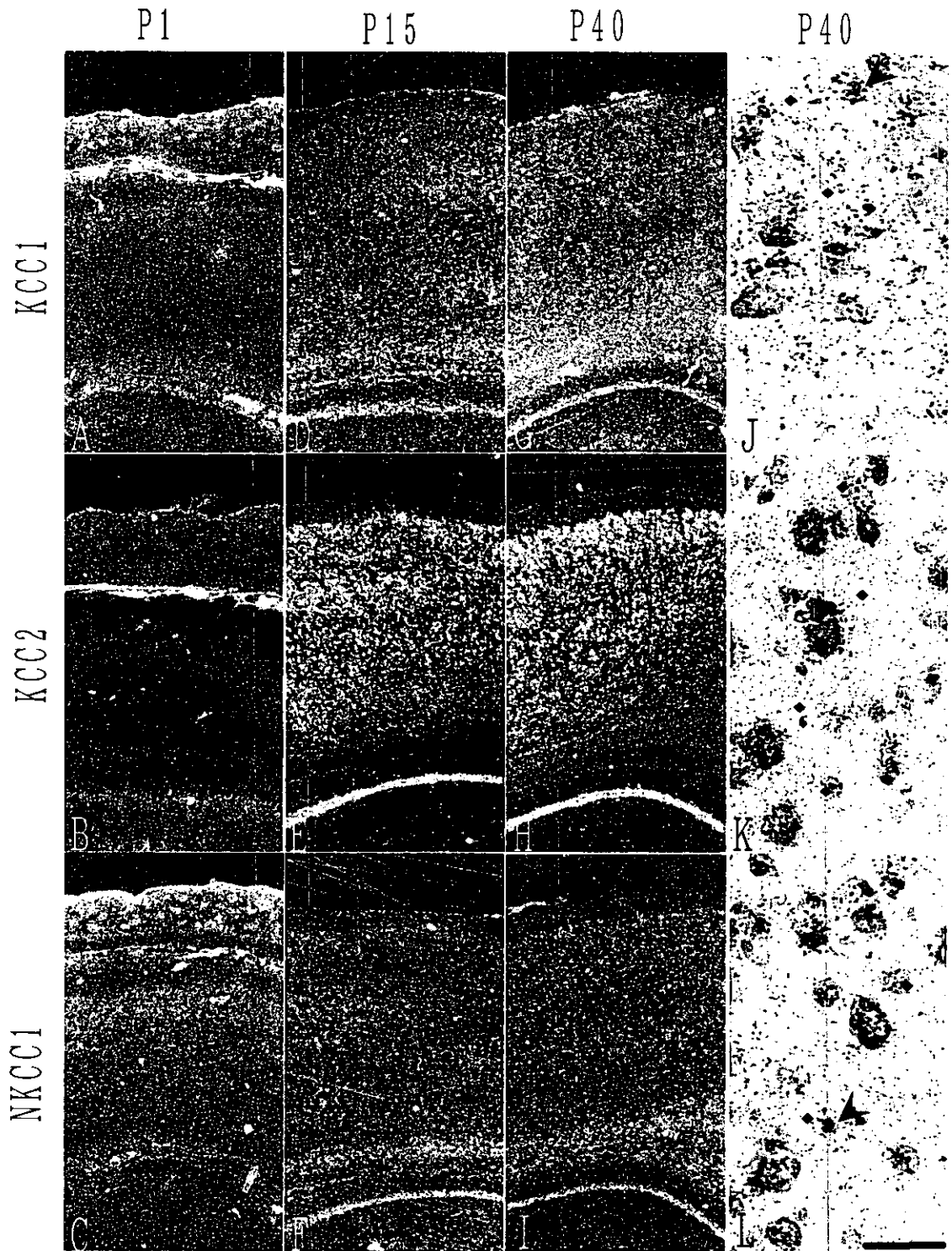


図4. 発達期大脳皮質におけるKCC1, KCC2, NKCC1 mRNAの発現
 KCC2 mRNAの発現は、生後1日では殆ど検出されていないが、生後15日では豊富に見られる。それに比しKCC1, NKCC1 mRNAは発達に伴ってそれほど変化していない。このことはラット大脳皮質において、生後二週間の間にGABAに対する応答が興奮から抑制に変化することを示唆する。

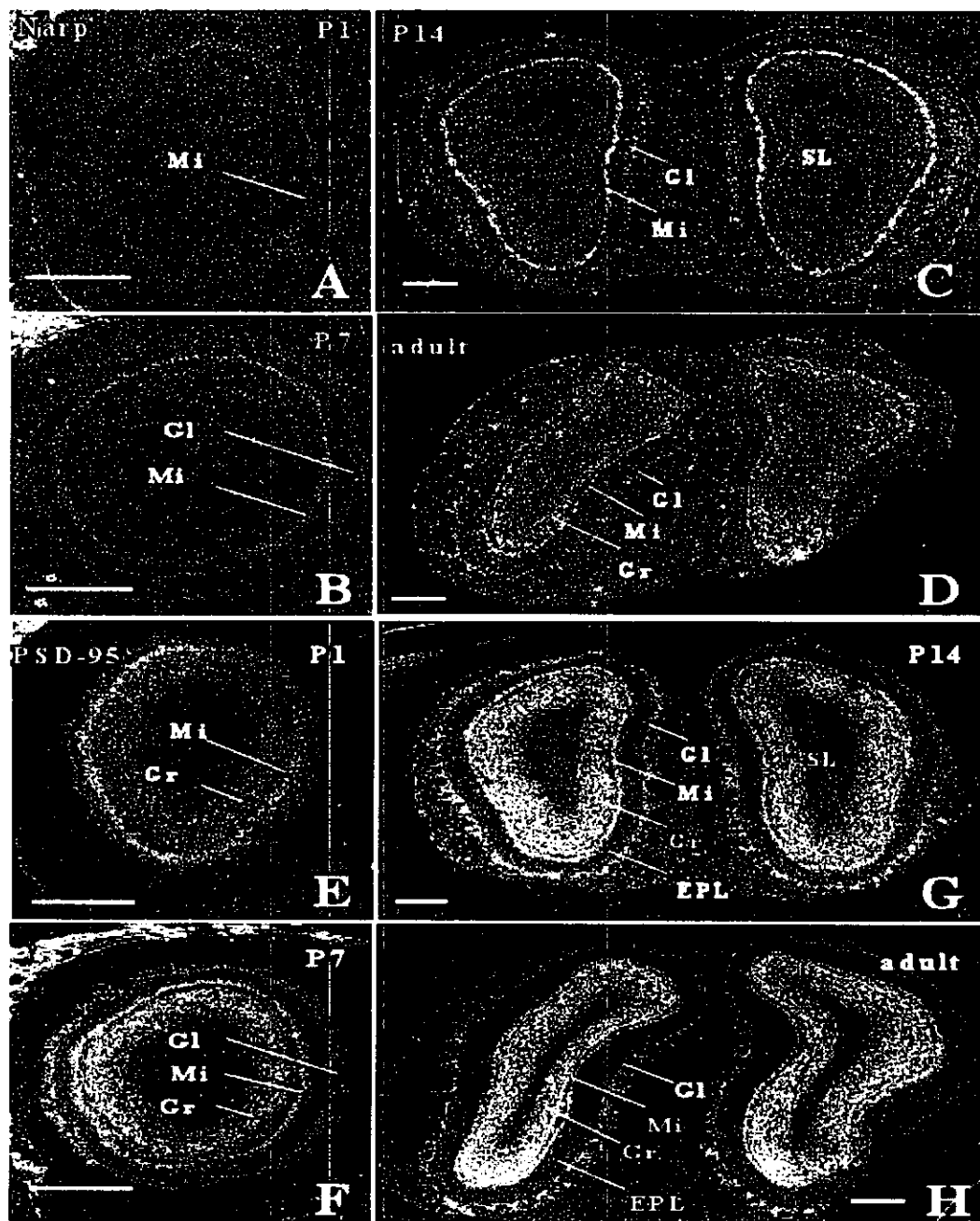


図5. 発達期ラット嗅球に於けるNarp(AMPA受容体clustering蛋白)とPSD-95(NMDA受容体clustering蛋白)mRNAの発現。PSD-95の発現がNarpの発現より先行して見られることから、NMDA受容体系がAMPA受容体系より先行して成熟することが示唆される。
 EPL: 外網状層 GL:系球体層 Gr: 顆粒細胞層 IPL:内網状層
 Mi: 僧帽細胞層 SL:上衣下層

皮質形成異常症のプロトン核磁気スペクトロスコピーによる検討

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 宗形光敏、萩野谷和裕、横山浩之、石飛真美子、北村太郎

（東北大学医学部小児科）

研究要旨 皮質形成異常症（CD）は胎生期の脳皮質形成の諸過程のいずれかで障害を受けることによってさまざまな脳組織構築の異常を生じる疾患であり、近年 MRI の発達により、比較的容易に発見されるようになった。しかもこれらのほとんどは小児期の難治性てんかんとしての病像を有し、治療戦略上重要な位置を占めている。

一方プロトン核磁気共鳴スペクトロスコピー（¹H-MRI）は種々の物質から得られる磁界と電磁波への反応としての信号（スペクトル）を表示するもので、物質の性状を反映すると考えられている。

われわれは 8 例の CD について、MRS による形成異常部と健常部の信号の比較を行い、細胞性状を推定した。比較のために、脳皮質全周に亘る形成異常を持つ band heterotopia 5 例についても検討した。

CD 群では NAA/Cr 比が対側正常皮質に比べ有意に低値を示し、逆に Cho/Cr 比は有意に高値を示した。これは細胞の未熟性を示唆し、神経細胞の発達過程で起こるべき神経伝達物質受容体スイッチング現象の遅延を想定させた。

A. 研究目的

皮質形成異常は胎生期の脳皮質形成の諸過程のいずれかが障害された結果、様々な脳組織構築の異常を生じたものである。この異常組織はしばしば難治性のてんかんを生じるため、その理解は臨床的にも重要な課題となっている。

皮質形成異常組織では未分化かつ未熟な細胞を有しており、その部位あるいは周辺がてんかん焦点となっている例も多い。

一方、近年臨床応用が可能となったプロトン核磁気共鳴スペクトロスコピー（¹H-MRS）は組織内の代謝物質を chemical shift を利用して in vivo で計測する手法である。今回われわれはこの手法を用いて皮質形成異常組織の代謝環境を対側健常組織と比較検討してみることにした。

また皮質形成異常でありながら band heterotopia は神経細胞が脳表に向かって移動する過程の障害でおこり、脳皮質直

下にさらに一層の異所性灰白質層が形成され、異常灰白質が皮質下にあり脳全周に亘っているなど、他の皮質形成異常とは趣を異にしている。比較の対象として band heterotopia についても検討を加えた。

B. 研究方法

8例のCD(2例の限局性CD、2例の片側性CD、1例のbilateral perisylvian dysplasia、3例の片側巨脳症)と5例のband heterotopiaについて検討した。CD群は7例が女性、1例が男性で、年齢は1歳~27歳(平均12.6歳)である。Band heterotopiaは全例女性で年齢は9歳~34歳(平均20.4歳)である。症例の概要を表1に示す。

成人以上の症例は本人の、未成年者には親のインフォームドコンセントを得た上で行った。診断はMRIにて行い、Whitingらの提案に基づいて分類し、さらに、cortical dysplasia(CD)群とband heterotopia(BD)群とに分け各々検討することとした。検討に際してはMRSで検出される代謝産物は年齢に依存して変化することが知られており、CD群では病変と反対側の正常皮質を対照とし、paired nonparametric test(Wilcoxon signed-rank test)により検討することにした。一方、BH群では、外層の脳皮質とpaired nonparametric testにより比較するとともに、BH患者とほぼ同一年齢の健常ボランティアの脳皮質ともnon paired nonparametric test(Mann-Whitney U test)によって検討した。¹H-MRSの計測は1.5TのMRI臨床機(Magnetom Vision, Siemens)により行った。まず、ルーチンの撮像を行った後、1.5x1.5x1.5cmの関心領域を病変と対照に設定しsingle voxel¹H-MRSの計測を行った。Repetition time(TR)及びecho time(TE)はそれぞれ1500ms、135msであり、全体、局所のシミング、水抑制パルスに続いて128回計測し加算平均を行った。

今回の¹H-MRS測定条件では、2.0、3.0、

3.2ppm(parts per million)の位置に強い信号が認められた。2.0ppmの信号は主としてN-acetyl aspartate(NAA)に、3.2ppmの信号はcholineを含有する物質に由来する。また、3.0ppmの信号はcreatineおよびphosphocreatineからの信号の和となっている。この3.0ppmの信号(Cr)は脳内の部位によらず安定しているためしばしば内部標準として用いられる。そこで今回NAAおよびChoの信号をCrに対する比(NAA/Cr、Cho/Cr)をとって検討することにした。

(倫理面への配慮)

臨床症例については、今回研究を行った各種の検査は、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

図1は片側性CDの¹H-MRS測定結果(症例3)である。対側の正常皮質も対照として測定し比較検討した。ここで病変部では正常皮質と比較して、NAA/Cr比は小さく、Cho/Cr比は大きくなっている。図2はCD群8例の測定結果を纏めたものであるが、この傾向はすべての症例でみとめられた。すなわち、NAA/Cr比は正常皮質に比し優位に低く(図2A; Wilcoxon signed-rank test, $p=0.012$)、Cho/Cr比は有意に高い(図2B; $p=0.012$)。なお、症例1、6は共に1歳で今回検討した中では最も低年齢であったが(図2中○印で示す)、これらの症例の正常皮質部ではNAA/Cr比は他の症例より低い位置を占め、Cho/Cr比では高い位置を占めている。これはNAA、Choの年齢変化に関する既報と一致するものである。これら症例においても病変部のNAA、Choの変化は同様であった。CD群病変部、正常皮質各々の平均、標準偏差値は表2に示した。

一方、図3はBH群5例、及び健常ボランティアの測定結果を示している。まず、

正常ボランティアの脳皮質とBH群の外層の脳皮質を比較したが NAA/Cr 比、Cho/Cr 比は同等であり有意差を認めなかった。次に、脳皮質下の層状の異所性灰白質と外層の脳皮質の比較では、NAA/Cr 比については図に示されたように一定の傾向を示さず有意差を認めなかった (Wilcoxon signed-rank test, $p=0.50$)。また、Cho/Cr 比では正常ボランティア ($p=0.03$)、及び外層の脳皮質 ($p=0.04$) に対して有意に高値を示した。BH 群病変部、外層の脳皮質、健常ボランティアの測定値の平均、標準偏差値は表 2 にまとめた。

D. 考察

今回の検討では、CD 群では病変部の NAA/Cr 比は対側に比べ有意に低下していた。この結果は皮質形成異常に関するこれまでの報告に一致する。CD 組織は、細胞密度自体は正常皮質と同等であるが、異常な形態を示す未分化な神経細胞を含んでいる。電気生理学的検討からこの神経細胞は異常な興奮性を示すことが明らかとなった。また Des Portessa らの免疫組織科学的検討では、神経細胞の発達過程で起こるべき神経伝達物質受容体スイッチング現象の遅延が明らかにされた。すなわち発達過程で起こる GABA_A 受容体 $\alpha 2$ サブユニット、NMDA 受容体 NR2A の発現が見られないと報告され、神経細胞の未熟性が示唆されている。NAA は成熟神経細胞に特異的に存在する物質であり、このような神経細胞の未熟性が NAA/Cr 比の減少の理由と推察される。

Cho は主に細胞膜のリン脂質の構成成分であり細胞膜の代謝を反映する物質であり、そのため、腫瘍細胞や未熟な神経細胞において信号が強い。今回の検討では CD 群では Cho の信号が強く、これは、NAA と同様、この領域の細胞の未熟性を示していると考えられる。しかしながらこの結果は、Cho 信号が低値であるとする他の文献の結果と異なっている。その理由は不明だが、

可能性として考えられるのは、症例の年齢である。今回 1 歳を含む低年齢の症例が多く、他の報告よりも若い症例で構成されている。上述のように正常脳皮質の Cho は年齢依存性を示し、成長と共に減少する。CD 中の Cho も加齢とともに変化を遂げる可能性がある。この点については今後の検討が必要である。

E. 結論

CD では NAA/Cr 比は正常側対照より有意に低値を示した。これは細胞の未熟性を反映し、発達過程で起こるべき神経細胞の神経伝達物質受容体スイッチングの遅延があるものと推測された。

Cho/Cr 比は高値を示したが、これは幼若時期に Cho が高いこと、対象症例が若年であったことなどを考慮すると、神経の未熟性を反映していると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Aoki, Y., Haginoya, K., Munakata, M., Yokoyama, H., Nishio, T., Togashi, N., Ito, T., Suzuki, Y., Kure, S., Iinuma, K., Brenner, M. & Matsubara, Y.

A novel mutation in glial fibrillary acidic protein gene in a patient with Alexander disease. *Neurosci. Lett.* 312: 71-74, 2001.

Haginoya, K., Munakata, M., Yokoyama, H., Kato, R., Tanaka, S., Hirose, M., Ishitobi, M., Kon, K., Yoshihara, Y., Takayanagi, M., Yamazaki, T. & Iinuma, K.

Two successful cases of bromide therapy for refractory symptomatic localization-related epilepsy.

Brain Dev. 24:194-196, 2002.