

厚生労働科学研究研究費補助金

こころの健康科学研究事業

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 14 年度 総括研究報告書

主任研究者 飯沼 一字

平成 15 年（2003 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. West 症候群における強直スパズムの機序－発作時 SPECT による検討－ 飯沼 一字	17
2. グリシン脳症モデルマウスの樹立と解析 呉 繁夫	24
3. 大脳皮質形成異常モデルにおける神経伝達物質受容体の変化 田中 達也	33
4. 幼若脳の興奮性を規定する分子群の解析 佐藤 康二	41

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	53
---------------------	----

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（東北大学大学院医学系研究科小児病態学分野教授）

分担研究者 呉 繁夫（東北大学大学院医学系研究科遺伝病学分野助教授）、

田中 達也（旭川医科大学脳神経外科教授）、

佐藤 康二（浜松医科大学解剖学第一講座教授）

研究要旨 乳幼児期に生じるけいれんの病態、特に興奮系と抑制系のバランスの欠如の存在を想定し、幼若期動物モデルを用いて以下の研究を行った。

1、新生児期から激裂なけいれんや呼吸障害を呈し、国際てんかん症候群分類の特殊症候群に位置付けられているグリシン脳症のモデルマウスの開発とその解析。

2、新生仔ラットにけいれん物質であるカイニン酸を大脳皮質に微量注入することによって作成した皮質形成異常の形態学的解析。

3、脳興奮～抑制系に強く関与する3種のクロライドコトランスポーターの発達期脳での解析と興奮系、抑制系の生理学的解析である。

さらに、臨床的研究として乳児期発症の特異的てんかんである West 症候群症例について、発作時 SPECT を用いた脳の興奮性の解析を行った。

グリシン脳症のモデルマウスの作成は前年度の報告書で述べた通りであるが、今年度は新生児型のモデルマウスを作成し、詳細に検討した。新生児型グリシン脳症モデルマウスを樹立し、詳細に検討した。モデルマウスは生後2日以内、多くは生後12時間後にけいれん重積状態となり、けいれんが始まってから1～3時間で死亡した。また、このマウスの脳全体の大きさは野生型の約半分で小頭症や小脳低形成など脳形成異常を伴っていた。大脳皮質グリシン含量は野生型の約2.5～3倍に達し、中枢神経系へのグリシンの蓄積が確認された。これらの所見は新生児発症型グリシン脳症患者の所見と酷似していた。組織学的検索の結果、大脳皮質、小脳、嗅球における神経細胞の密度が低く、脳室周囲の神経細胞層が被薄化していた。昨年度の本研究で、胎生期において GCS は神経幹細胞や幼弱な神経芽細胞に存在することを明らかにした。この結果を考え合わせると、GCS は神経幹細胞の増殖能に重要な働きを演じている事が示唆された。

新生児ラットの大脳皮質に微量のカイニン酸を注入すると、注入部位近傍に皮質神経細胞の配列の乱れが認められ、皮質形成異常が確認された。今年度はこの形成異常部について、3ヵ月飼育した後に GABA_A および GABA_B の免疫染色を行った。その結果、形成異常部で対側に比して、GABA_A の染色性の低下が認められた。また GABA_B の染色性は著明に増加していた。このことは皮質形成異常近傍で興奮性が増強していることを示唆した。

昨年度までに発達期脳の各段階における神経細胞でのクロライドコトランスポーターの発現状況を詳細に検討した。今年度は幼若期のラット神経細胞で GABA に対する応答性を検討したところ、幼若期では GABA が興奮性に作動していることが明らかになった。これは幼若期では細胞内クロライド濃度が高く保たれているため（クロライド汲み出しの KCC2 が未発

達)と考えられた。

これらを総合的に考えると、幼若期動物では興奮系のみが発達し、GABA系が興奮として作動し、NMDAシステムが活性化することにより Ca^{2+} が細胞内に流入し、細胞増殖へと向かう必然性があると考えられた。

A,研究目的

乳幼児は年長児あるいは成人に比してはるかにけいれんを起こし易く容易に全身性に波及する。しかも発症時期が早いほど難治になり易く、頻回の発作や、けいれん頻発による二次障害や、基盤の脳障害による後遺症など、その後の生活の質に重大な影響を及ぼす。

乳幼児のけいれんに対しては、発作の抑制が最も重要であるが、けいれん発作を引き起こし、容易に全般化するメカニズムが十分には解明されていない、これらの解明が難治性てんかんの乳児期にけいれんを生じる疾患の制圧に道を拓くことになると考えられる。

本研究では、乳幼児期にけいれんを生じるモデルとして、グリシン脳症モデルマウス(樹立については昨年の報告書に記載)、新生仔ラット大脳皮質にカイニン酸を微量注入して作成した皮質形成異常モデル(作成法は昨年の報告書に記載)、および幼若ラットの3種のクロライドコトランスポーターの動態と興奮-抑制系の検討を課題とした。さらに、臨床データの集積として、乳児期に発症する難治てんかんの代表ともいえる West 症候群の発作時 SPECT による解析を行い、本疾患での発作発現のメカニズムを検討した。

B,研究方法

1、幼若ラットの GCS 発現とグリシン脳症モデルマウスの解析

1) in situ hybridization 法

過去に、一次構造を決定した(Sakata et al, 2001)ラットの GCS 構成蛋白質である、glycine decarboxylase (GLDC)、aminomethyltransferase (AMT)、hydrogen carrier protein (GCSH)の各 cDNA の配列を基に 45 塩基対からなるオリゴヌクレオチド・プローブを作成した。 ^{35}S にて標識した後、胎生 15 日と 18 日、生後 1、7、14 日と成獣の Wistar ラット脳標本を調整し、各 mRNA の検出を行った。

2) 免疫組織化学

抗 GLDC 抗体、抗 GCSH 抗体、抗 nestin 抗体、抗 GLAST 抗体、抗 GFAP 抗体、抗 MAP 2 抗体を用い、免疫組織化学検索を行った。更に、蛍光抗体による 2 重染色法を用い発現細胞種の同定を行なった。

3) 脳グリシン濃度が低いマウスの作成

正常型 GLDC cDNA を CAG プロモーターの下流に結合し、この DNA 断片を受精卵に導入し、トランスジェニック・マウスを作成した。

2、カイニン酸微妙注入ラットの解析

GABA 染色法

GABA 免疫反応は LSAB2 キット(ラット組織細胞染色用 (DAKO 社))により行った。パラフィン包埋標本を厚さ $4\mu m$ で薄切し、スライドに貼付し、蛋白分解処理を行った後、1 次抗体(抗 GABA_A 受容体)をスライド上に滴下し $4^{\circ}C$ で 20 時間反応させ、その後 P.B.S にて洗浄し、2 次抗体を滴下し 10 分間反応させた。酵素抗体を滴下し 10 分間反応させ、P.B.S にて洗浄後 DAB 水溶液(ニチレイ)を滴下し反応させた。洗浄後マイヤーヘマトキシリンでカウ

ンター染色した。1次抗体は抗 GABA_A 受容体(希釈率 1:20~1:40)および抗 GABA_B 受容体(希釈率 1:500~1:1,500)を使用し、2次抗体は GABA_A 受容体については、酵素抗体:LSAB2 キットーラット組織細胞染色用抗体希釈緩衝液を、GABA_B 受容体については、Biotinylated Anti-Guinea Pig IgG (H+L) を用いた。

3、幼若ラットのクロライドコトランスポーターの発現

1) in situ hybridization 法

KCC1, KCC2, NKCC1 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 ³⁵S-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、クライオスタットで 20 μ m の切片を作成し、上記のプローブをハイブリタライズし、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、脳内に於ける遺伝子発現を 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、クロライドイオン感受性色素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色素からの発色を検出し、細胞内クロライド濃度を推定した。

4、West 症候群の発作時 SPECT の解析

臨床例について、21 例(男 8、女 13; 2 ヵ月~15 ヶ月)の West 症候群を対象とした。それぞれの症例について発作時と発作間欠時に SPECT を施行した。担当医が発作を観察した時に 185MB q の [^{99m}Tc] ethyl cysteinyl dimer (ECD) を静注し、30 分後に SPECT 造影を行った。得られた SPECT 像について、局所性血流異常の有

無について発作時と非発作時の比較を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験については、「東北大学における動物実験に関する指針」、「旭川医科大学倫理委員会・動物実験倫理指針」および「浜松医科大学動物実験倫理指針」に則って行われた。

全ての West 症候群症例について、親権者から文書による SPECT の承諾書を得て行った。

C、研究結果

1) 胎生ラット脳における GCS の発現

胎生 15 日の in situ hybridization 解析の結果、3つの構成蛋白質の遺伝子は脳室周囲の神経上皮細胞層に強い発現を認めた。胎生 17 日では神経上皮細胞層に加え、皮質板にも強いシグナルを検出した。マーカー遺伝子との 2重染色による検索や初代培養神経幹細胞の GCS 活性測定の結果、神経幹細胞や放射状グリア細胞が GCS を強く発現している事が確認された。生後の観察では脳室周囲から嗅球へ向かう神経細胞の移動経路である RMS(rostral migration stream)、小脳外顆粒細胞層、側脳室周囲の脳室下層や海馬の歯状回など生後も細胞新生が持続している領域にも GCS の発現が認められた(図 1)。

2) 新生児型モデルマウスの樹立

nestin プロモーターの下流に Cre リコンビナーゼ cDNA を繋いだ DNA 断片を導入したマウスとの交配により、2系統のマウス(#15-1, #14-5)で自発けいれんを認めた。多くは生後 12 時間後にけいれん重積状態となり、その後 1-3 時間で死亡した。生後 37 時間以上生存する産仔は存在しなかった(図 2)。産仔数は、6-10 匹/産で特に減少は見られなかった。

3) 新生児型モデルマウスの大脳皮質グリシン含量は野生型の約 2.5-3 倍に達し、グリシンの蓄積が確認された。これらの所見は新生児発症型グリシン脳症の所見と酷似していた。組織学的検索の結果、著しい小頭症を認め、特に大脳、嗅球、小脳は低形成であった。脳全体に渡り細胞密度が低下しており、特に脳室周囲の神経上皮細胞層が被薄化していた (図 3)。

4) KA 微量注入モデルの解析

本モデルで病理組織学的に確認された大脳皮質形成異常の病変部に一致して、皮質の第 3,4 層に benzodiazepine 受容体の分布の乱れが認められた。Autoradiogram 上での benzodiazepine 受容体濃度を、脳梁の optical density (OD) に対する皮質の OD の比として定量すると、皮質形成異常部では反対側の正常な大脳皮質より有意に ($p < 0.04$) 低値であった (図 4)。

GABA-A の染色標本では、大脳皮質形成異常部および周囲組織中の GABA-A 神経細胞の染色性の低下と減少が認められ、 ^{125}I -iomazenil を用いた autoradiography の結果と一致した。GABA-B 染色では、大脳皮質形成異常の部分には、染色された細胞は認めなかったが、周囲の神経細胞には、GABA-B 細胞が明かに増加し、大脳皮質形成異常の周囲に、てんかん性の興奮域があることを示していた。反対側の対称部位には、GABA-B 細胞は、殆ど認められていない (図 5,6)。

5) amygdala kindling model における KCC1, KCC2, NKCC1 mRNA 発現の変化 (図 7)

amygdala kindling model は脳の興奮性が亢進した状態を解析する上で適したモデルと考えられる。本モデルにおける KCC1, KCC2, NKCC1 mRNA 発現を *in situ hybridization* 法を用いて検討を加えた。その結果、まず梨状葉において NKCC1

mRNA の著明な発現上昇が観察された。更に海馬歯状回において、NKCC1 mRNA の著明な発現上昇と KCC1 mRNA の発現低下が観察された。この変動の方向性は両者とも神経細胞内のクロライド濃度を上昇させる方向に働くことになる。

6) West 症候群の発作時 SPECT

得られた 21 例の SPECT の発作時と非発作時を比較し、発作時の血流の変化を A 群 (局所性、皮質高灌流) と B 群 (全般性変化を示すか、あるいは明瞭な変化を示さない) に分類した。

21 例中 8 例が A 群に、13 例が B 群に分類された。A 群 8 例のうち 2 例のみが左右非対称の発作像を呈し、B 群 13 例のうち 2 例が非対象性発作を示した。局所性高灌流を示す症例でも、多くは発作像は左右対称であった。

D, 考察

1) 新生児型モデルマウスに伴う脳形成異常

新生児型モデルマウスには小頭症や小脳低形成などの脳形成障害を伴っている。大脳皮質や小脳の細胞数の減少が著明であり、神経上皮細胞層が被薄化を伴っていることから、胎生期の細胞増殖の異常が示唆された。ラット胎生脳において GCS は神経幹細胞に存在することから、GCS は細胞増殖に関与している可能性が強い。GCS は、グリシン分解の産物として methylene tetrahydroforate を生成する。この C1 炭素はプリン骨格の形成に用いられる事から、GCS の欠損は DNA 合成に障害を与える可能性があり、神経幹細胞における GCS の生理的役割は、この DNA 合成の材料の供給にある事を示唆している。

2) 新生児けいれんを伴うモデルマウスについて

生後間もなくけいれんを自然発症するモ

デルマウスは世界的に珍しく、新生児けいれんの発症機序の解析に有用である。乳児型と新生児型共に今後の治療実験を行い、けいれんや脳形成異常の予防や治療法の開発にも強力な研究対象になるものと期待される。

3) KA 微量注入ラット脳皮質の GABA 受容体の免疫組織化学

KA を新生仔ラットに微量注入すると、注入部周辺に皮質形成異常が生じることは前年度までの報告で述べた。

この部位での GABA_A 受容体のおよび GABA_B 受容体の免疫染色の結果は、GABA_A 受容体の染色性がわずかに低下し、これに対して、GABA_B 受容体の染色性が著明に増加していた。このことは興奮系作動と考えられる GABA_B の増強と、抑制性と考えられる GABA_A の低下が示唆され、新生仔ラットでは興奮系が勝っていると考えられた。

4) 神経細胞の成熟性の変化に伴って KCC1、KCC2、NKCC1 mRNA の発現が劇的に変化するということである。例えば脳室帯に存在する神経幹細胞は、NKCC1 を強発現しており、細胞内クロライド濃度が高値を示すが、ニューロンにコミットして遊走を開始して、皮質板まで到着した神経細胞では、NKCC1 の発現が低下し、さらに KCC2 の発現が増強してくるので、細胞内クロライド濃度は比較的低くなっている。このことは発生の各 stage において様々な程度の細胞内クロライド濃度を持った神経細胞が混在することを意味している。いずれにしても、幼若脳においては十分に細胞内クロライド濃度が低下していない神経細胞が多く存在することが予測され、このことは GABA が抑制性に働けないことを意味しており、幼若脳の興奮性が高いことの一因となっているものと考察できる。

5) West 症候群の発作時 SPECT では症候

性であっても発作パターンは左右対称であり、また発作時に局所皮質の血流の増加のある例でも発作は対称性であるので、皮質から視床を経由し、脳幹に興奮が伝わり、その結果発作としては対称性、全身性のパターンを示すのではないかと考えられた。すなわち、発作の発現において脳幹が重要な役割を果たしていることが示唆された。

E, 結論

今年度においては、幼若脳の示す特徴について種々の実験を通して考察したが、幼若脳においては、興奮系が抑制系に比して勝っており、というよりも抑制系が十分に発達しておらず、興奮系が前面に出ることで、細胞内に Ca²⁺ を取り込み、細胞増殖を促進し、神経系の発達に寄与していると考えられた。このことは興奮系を基盤とする幼若脳において、損傷を受けることにより、容易に細胞は興奮に傾き、けいれんに陥り易いことを物語っていると思われた。

F, 健康危険情報

今年度の研究において、健康の危険を示唆する結果は得られなかった。

G, 研究発表

1, 論文発表

Takayanagi M, Yamamoto K, Nakagawa H, Munakata M, Kato R, Yokoyama H, Haginoya K, Iinuma K.

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

Brain Dev. 24: 194-196, 2002.

Haginoya K, Munakata M, Kato R,

- Yokoyama H, Ishizuka M, Iinuma, K.
Ictal cerebral haemodynamics of childhood epilepsy measured with near-infrared spectrophotometry.
Brain 125: 1960-1971, 2002.
- Munakata M, Haginoya K, Soga T, Yokoyama H, Noguchi R, Nagasaka T, Murata T, Higano S, Takahashi S, Iinuma K.
Metabolic properties of band heterotopia differ from those of other cortical dysplasias: A proton magnetic resonance spectroscopy study.
Epilepsia 44: 366-371, 2003.
- Kure S, Kojima K, Ichinohe A, Maeda T, Kalmanchev R, Fekete G, Berg SZ, Filiano J, Aoki Y, Suzuki Y, Izumi T, Matsubara Y.
Heterozygous *GLDC* and *GCSH* gene mutations in transient neonatal hyperglycinemia.
Ann Neurol 2002;52:643-6
- Toone JR, Applegarth DA, Kure S, Coulter-Mackie MB, Sazegar P, Kojima K, Ichinohe A.
Novel mutations in the P-protein (glycine decarboxylase) gene in patients with glycine encephalopathy (non-ketotic hyperglycinemia).
Mol Genet Metab 76:243-9,2002
- Kanno K, Suzuki Y, Yang A, Yamada Y, Aoki Y, Kure S, Matsubara Y.
Lack of evidence for a significant association between nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate and the retinoic acid receptor alpha gene in the Japanese population.
J Hum Genet 47:269-274,2002
- Katsuoka, F., Motohashi, H., Tamagawa, Y., Kure, S., Igarashi, K., Engel, J.D., and Yamamoto, M.
Small Maf compound mutants display CNS neuronal degeneration, aberrant transcription and Bach protein mislocalization coincident with myoclonus and abnormal startle response.
Mol. Cell. Biol 23:1163-1174,2003
- Kudo T, Kure S, Ikeda K, Xia AP, Katori Y, Suzuki M, Kojima K, Ichinohe A, Suzuki Y, Aoki Y, Kobayashi T, Matsubara Y.
Transgenic expression of a dominant-negative connexin26 causes degeneration of the organ of Corti and non-syndromic deafness.
Hum Mol Genet (in press)
- Matsubara Y, Kure S.
Detection of single nucleotide substitution by competitive allele-specific short oligonucleotide hybridization (CASSOH) with immunochromatographic strip. Human Mutation (in press)
- Sawamura A, Hashizume K, Tanaka T
Electrophysiological, behavioral and metabolic features of globus pallidus seizures induced by a microinjection of kainic acid.
Brain Research, 935: 1-8, 2002
- Hasegawa D, Orima H, Fujita M,

- Hashizume K, Tanaka T
Complex partial status epilepticus induced by a microinjection of kainic acid into unilateral amygdala in dogs and its brain damage.
Brain Research, 955: 174-182, 2002
- Sawamura A, Hashizume K, Tsuda H, Tanaka T
Regional calcium accumulation and kainic acid-induced substantia nigra seizures in rats.
Epilepsia, 43(Suppl 7): 13, 2002
- Hashizume K, Matsuo A, Tsuda H, Tanaka T
Antiepileptic effect of electrical stimulation of unilateral subthalamic nucleus on experimental neocortical seizures(1): Electrophysiological study.
Epilepsia, 43(Suppl 7): 139-140, 2002
- Matsuo A, Hashizume K, Tsuda H, Tanaka T
Antiepileptic effect of electrical stimulation of unilateral subthalamic nucleus on experimental neocortical seizures(1): Metabolic study.
Epilepsia, 43(Suppl 7): 140-141, 2002
- Miyake S., Yamashita T., Taniguchi M., Tamatani M., Sato K., Mitsuda N., Hori O., Yamaguchi A., Tohyama M.
Expression of mitochondrial tricarboxylate carrier TCC mRNA and protein in the rat brain.
Mol. Brain Res. 100:67-73,2002
- Mikawa S., Wang C., Shu F., Wang T., Fukuda A., Sato K.
Developmental changes in KCC1, KCC2, and NKCC1 mRNAs in the rat cerebellum. Dev. Brain Res 136 93-100,2002
- Miyake S., Yamashita T., Taniguchi M., Tamatani M., Sato K., Tohyama, M.
Identification and characterization of a novel mitochondrial tricarboxylate carrier. Biochem. Biophys. Res. Commun. 295: 463-468,2002
- Wang C., Shimizu-Okabe C., Watanabe K., Okabe A., Matsuzakia H., Ogawa T., Mori N., Fukuda A., Sato K.
Developmental Changes in KCC1, KCC2, and NKCC1 mRNA expressions in the Rat Brain.
Dev. Brain Res. 139 :59-66,2002
- Okabe A., Ohno K., Toyoda H., Yokokura M., Sato K., Fukuda A.
Amygdala kindling induces upregulation of mRNA for NKCC1, a Na⁺, K⁺-2Cl⁻ cotransporter, in the rat piriform cortex. Neurosci. Res. 44: 223-227,2002
- Shimizu-Okabe C., Yokokura M., Okabe A., Ikeda M., Sato K., Kilb W., Luhmann H. J., Fukuda A.
Layer-specific expression of Cl⁻ transporters and differential [Cl⁻] in newborn rat cortex.
Neuroreport 13:2433-2437,2002
- Toyoda H., Ohno K., Yamada J., Ikeda M., Okabe A., Sato K., Hashimoto K., and Fukuda A.
Induction of NMDA and GABA-A receptors-mediated Ca²⁺ oscillations

with KCC2 mRNA downregulation in injured motoneurons.

J. Neurophysiology. (in press)

飯沼一字.

特集：てんかん1ー診断治療の進歩 てんかんの機能的画像診断. 小児内科, 34: 719-724, 2002.

飯沼一字.

非侵襲的脳機能検査法の進歩と小児神経. 脳と発達, 35: 907-104, 2003.

2,学会発表

Ishitobi M, Nakasato N, Yamamoto K, Iinuma K.

Rolandic discharges: comparison between EEG and MEG findings.

The 4th Asian and Oceanian Epilepsy Congress. Karuizawa, Japan, Sep. 11-14, 2002.

Iinuma K.

Introduction: focused on functional neuroimaging. In symposium of "Neuroimaging" Joint Congress of 9th International Child Neurology Association and 7th Asian Oseanian Child Neurology Association. Beijin, China, Sep. 20-25, 2002.

Haginoya K, Yokoyama H, Munakata M, Ishitobi M, Kitamura T, Koda M, Togashi N, Nara C, Iinuma K.

Anticardiolipin antibody and childhood epilepsy.

Joint Congress of 9th International Child Neurology Association and 7th Asian Oseanian Child Neurology Association. Beijin, China, Sep. 20-25,

2002.

Iinuma K, Ishitobi M, Nakasato N. Role of magnetoencephalography on analysis of childhood epilepsy.

China-Japan Medical Conference 2002. Beijin, China, Nov. 3-6, 2002.

Hashizume K, Matsuo A, Tsuda H, Tanaka T

Antiepileptic effect of unilateral suppression of the subthalamic nucleus for focal neocortical seizures

The 4th Asian and Oceanian Epilepsy Congress Karuizawa, Sep. 11, 2001

Tsuda H, Hashizume K, Matsuo A, Tanaka T

Imaging analysis of benzodiazepine receptors in the experimental model of focal cortical dysplasia

The 4th Asian and Oceanian Epilepsy Congress Karuizawa, Sep. 13, 2002

Hashizume K, Matsuo A, Tsuda H, Tanaka T

Antiepileptic effect of electrical stimulation of unilateral subthalamic nucleus on experimental neocortical seizures(1)

electrophysiological study Seattle, Dec. 6, 2002

飯沼一字.

「小児神経(学)における非侵襲的脳検査法ー今、脳はここまでわかるー」第72回日本小児科学会山形地方会、2002年6月2日、山形

一戸明子、呉 繁夫、松原洋一、飯沼一字

「グリシン脳症の発症機序解析—グリシン開裂酵素の神経幹細胞における発現」
第44回日本小児神経学会総会、2002年6月27-29日 仙台

呉 繁夫、一戸明子、小島加奈子、青木洋子、鈴木洋一、松原洋一

「非ケトーシス型高グリシン血症の各病型の遺伝学的背景」
第45回日本先天代謝異常学会総会、2002年11月7-9日 神戸

一戸明子、呉 繁夫、小島加奈子、青木洋子、鈴木洋一、松原洋一

「非ケトーシス型高グリシン血症における脳形成異常の発症機序解析—グリシン開裂酵素の神経幹細胞における発現」
第45回日本先天代謝異常学会総会、2002年11月7-9日 神戸

小島加奈子、呉 繁夫、一戸明子、新家利一、横山浩之、廣瀬三恵子、飯沼一字、青木洋子、鈴木洋一、松原洋一

「高グリシン血症モデルマウスの作成と解析：行動実験とマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析」
日本人類遺伝学会第47回大会、2002年11月13-15日、名古屋

橋詰清隆、松尾厚子、津田宏重、田中達也
「一側視床下核の電氣的、科学的抑制による焦点てんかん発作の抑制効果」 第32回日本臨床神経生理学会学術大会 2002-11-14 福島

津田宏重、橋詰清隆、澤村 淳、松尾厚子、加藤宏一、吉田克成、田中達也

「大脳皮質形成異常の動物モデルとそのてんかん原性」 第30回日本小児神経外科学会 2002-06-06 旭川

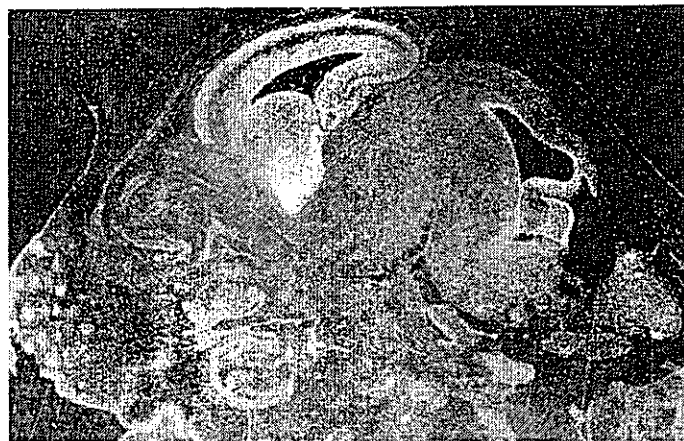
佐藤 康二

「Kohjirin, アストロサイト由来の新規骨形成因子阻害蛋白」

平成14年度 日本解剖学会中部地方会

H.知的財産権の出願・登録状況
なし

a. P蛋白遺伝子



b. T蛋白遺伝子



c. H蛋白遺伝子



<図1> 胎生15日におけるグリシン開裂酵素系の発現

胎生15日ラット脳におけるGCSの発現をin situ hybridization法で解析した。T蛋白遺伝子とH蛋白遺伝子の発現は、P蛋白質遺伝子より比較的広範に認められる。脳室周囲など神経幹細胞の豊富な領域では3遺伝子が共通して強い発現が認められる

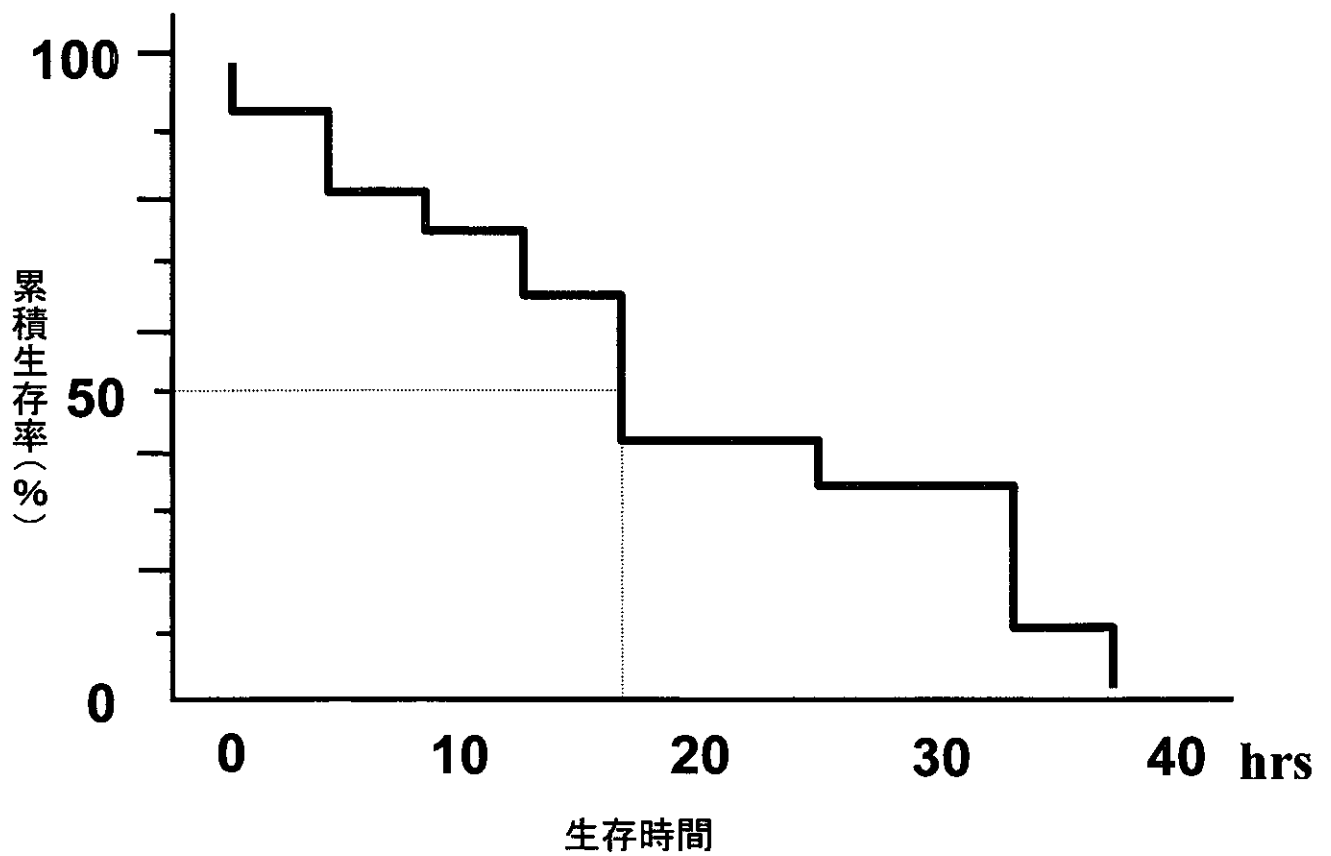
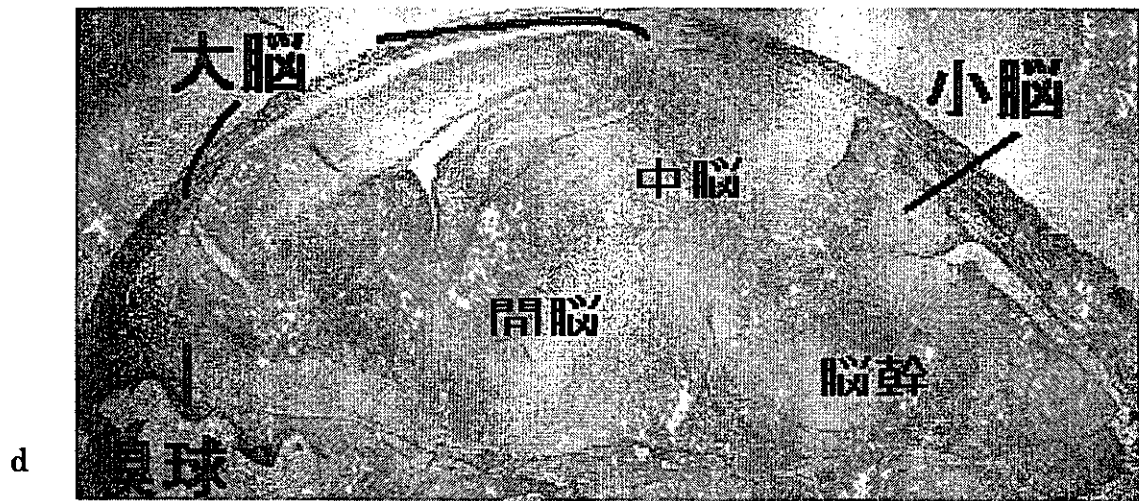
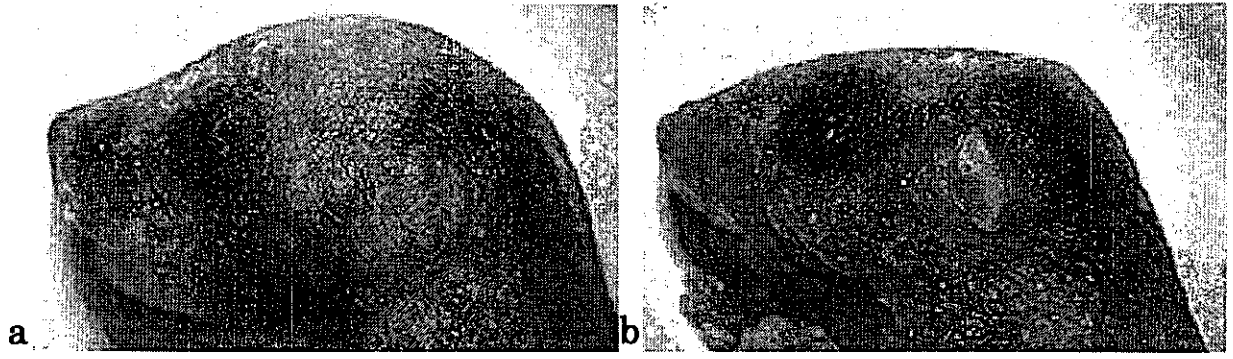
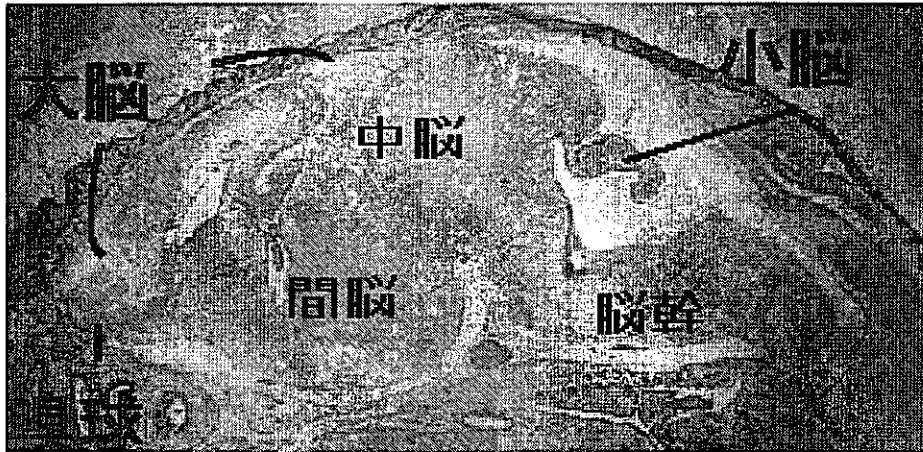


図5 新生児型モデルマウスの生存期間

新生児型モデルマウス(#G15-1)の生存曲線をしめす。多くは死亡する2-3時間前よりけいれん重積状態となった。(n=38)





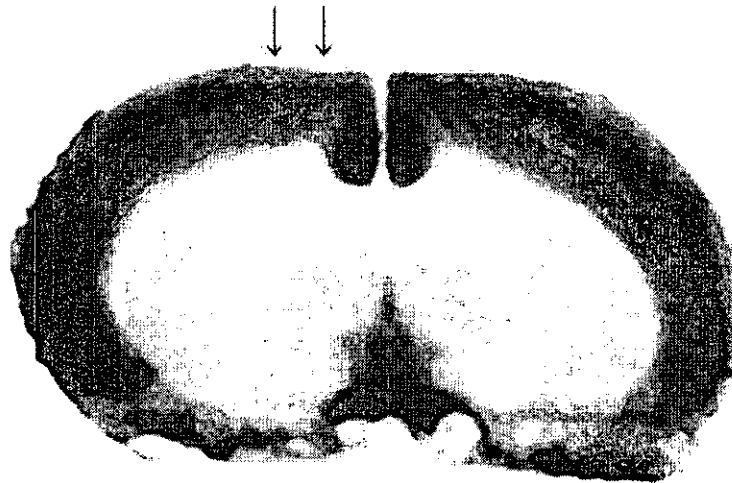
e

図3 新生児型モデルマウスに認められた脳形成異常

a. 生直後の正常マウス(a)と#15-1モデルマウス(b)の頭部外観。モデルマウスで小頭症が認められる。摘出した正常マウス(左)とモデルマウス(右)の全体像。モデルマウスでは、長径、幅、高さとも正常脳の約2分の1程度であった。正常マウス(d)とモデルマウス(e)の矢状断像。モデルマウスでは、間脳、中脳、脳幹に比べ、大脳、嗅球、小脳の発達が著しく悪い。



コントロールラット



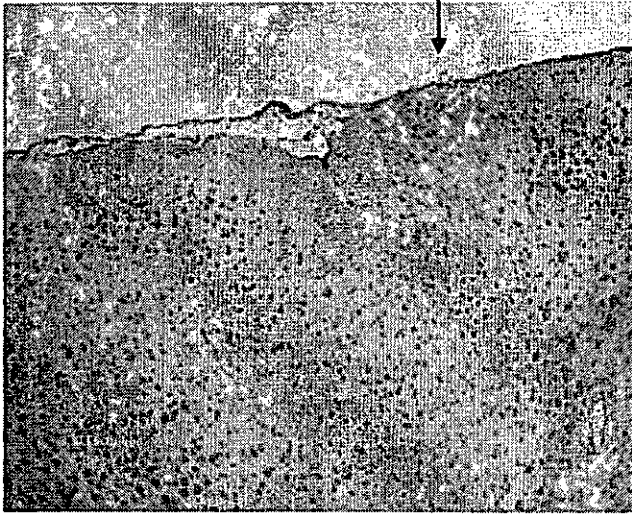
大脳皮質形成異常ラット

図4 大脳皮質形成異常モデルと¹²⁵I-iomazenil

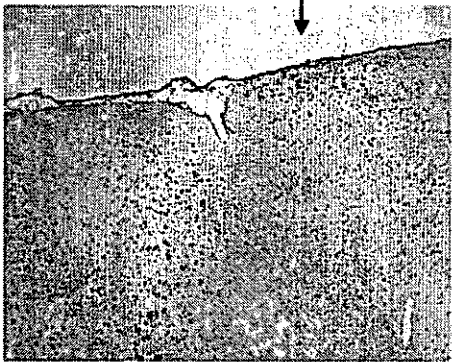
形成異常部近傍でベンゾジアゼピン受容体結合の低下を認める。

GABA-A染色

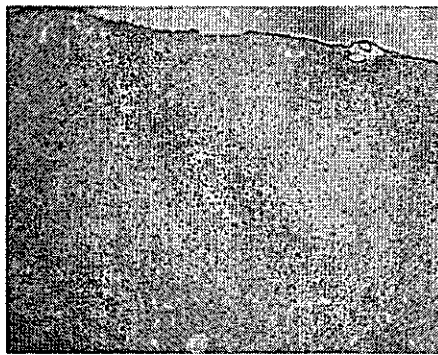
大脳皮質形成異常



大脳皮質形成異常



大脳皮質形成異常とその周囲



反対側の cerebral 皮質

図 6

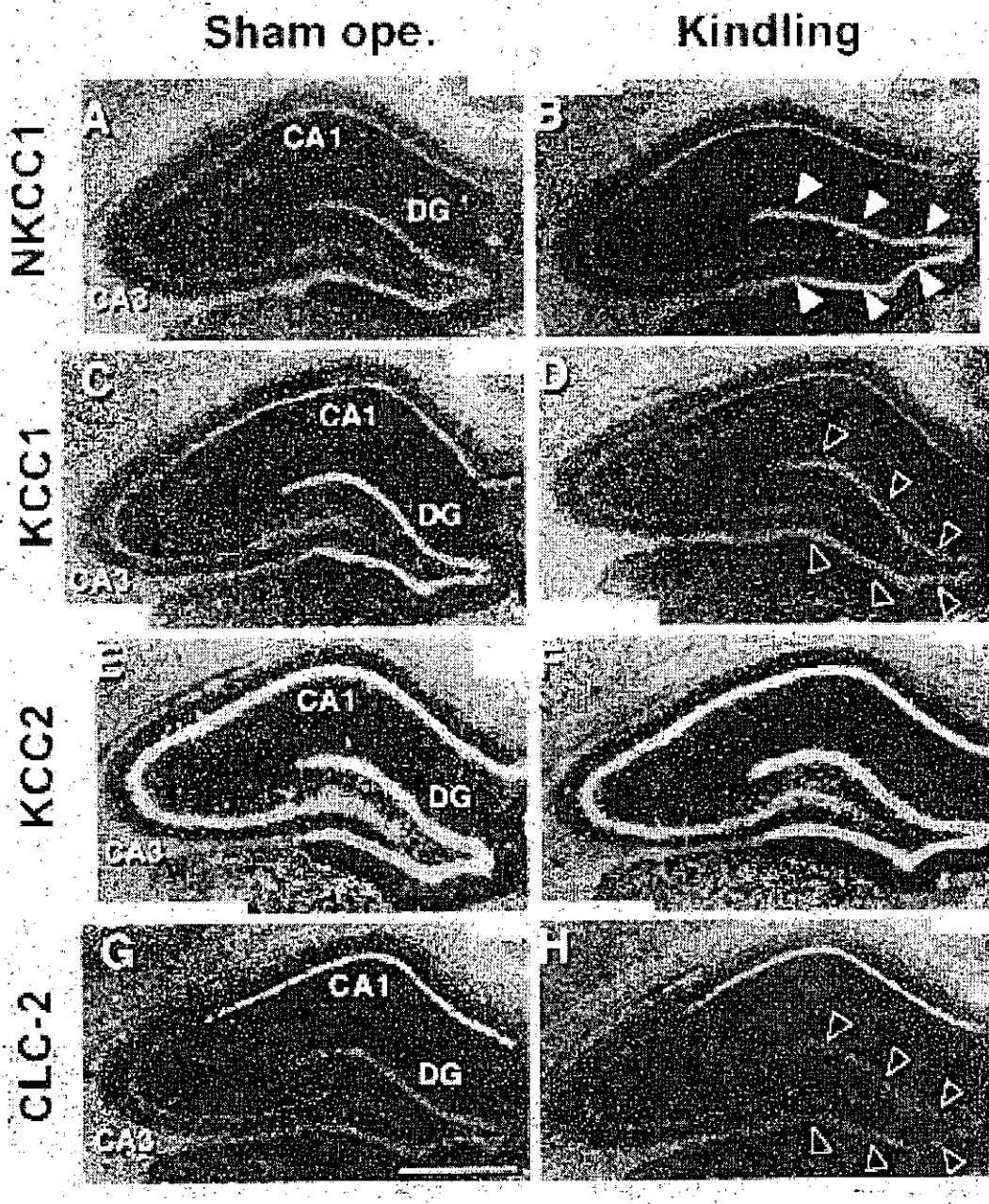


図7 Amygdala Kindling modelにおける
 クロライドコトランスポート遺伝子の
 海馬における変動

West 症候群における強直スパズムの機序—発作時 SPECT による検討—

主任研究者 飯沼 一宇

（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、宗形 光敏、横山 浩之、石飛 真美子、北村 太郎

（東北大学大学院医学系研究科小児病態学分野）

研究要旨 West 症候群における強直スパズムの機序を明らかにするため、West 症候群 21 例に発作時および非発作時 SPECT を施行した。特に発作時に限局性皮質血液灌流が変化するかどうか注目した。8 例で発作時に明らかな限局性皮質高灌流が認められた。この 8 例中 2 例でのみ左右非対称の発作パターンを認めた。すなわち、多くの例で局所皮質の活性化が皮質下の活性化を促し、左右対称性の発作を呈するのではないかと推測された。13 例で発作時 SPECT が全般性変化を示し、これは発作時に全般性高灌流もしくは変化を示さないものであった。これらの結果から West 症候群はその発作の起源を局所皮質に求められる群と、皮質以外に求められる群とに 2 分されると考えられた。また発作時は SPECT が個々の症例でそれぞれ異なっていることから、West 症候群の強直スパズムの特異な本質、すなわち、個々の症例によって発作クラスターやその間隔が異なることが推測された。

A. 研究目的

West 症候群は年齢依存性てんかん性脳症の代表的疾患であり、多彩な病因によって比較的均質な発作パターンを示す、小児てんかんの中の特異な一群である。West 症候群は国際てんかん症候群分類では発作像が両側性であり、かつ脳波が全般性異常を呈することから、全般てんかんに分類されているが、最近の神経画像の研究から局所皮質が強直スパズムの発生に重要な関わりをもつことが示唆されている。しかし West 症候群の発作発現機序は依然不明の点が多い。一方てんかんの SPECT 画像では発作時に焦点部位での局所高灌流が認められ、非発作時に同部位の低灌流が認められる所見が定着して、術前の焦点決定に寄与している。しかし多くの SPECT 画像は非発作時に施行されており、発作時 SPECT の研究はごく限られている。われわれは West 症候群について

発作時と非発作時の SPECT を施行し、これらを比較し、発作像との相関を検討することにより、West 症候群における発作の発現機序を推定した。

B. 研究方法

21 例の West 症候群（男児 8、女児 13 例）を対象とした。これらの症例の概要は表 1 に示す通りである。すべての患者の親権者から SPECT を行う旨の同意書を得て行った。発作時 SPECT については担当医が発作を観察した時に 185 MBq の [^{99m}Tc] ethyl cysteinyl dimer (ECD) を静注し、30 分後に、MULTI-SPECT3 (Siemens, GerfaHldt, Germany) を用いて SPECT 造影を行った。非発作時は SPECT は非発作時で覚醒時に同様の方法で施行した。

SPECT 画像は小児神経科医と放射線科医が独立

に視察し、限局性灌流異常について相方が一致したものを限局性灌流異常と判定した。統計学的には Fisher's exact probability 法により、 $P < 0.05$ を有意とした。

C. 研究結果

SPECT 画像では、皮質下の灌流について定量的評価は困難なので、今回の分析では皮質の灌流状況について検討した。すなわち、限局性かつ非対称性と、非限局性に2分し、前者をA群、後者をB群とした。

表に示すように21例中8例でA群に分類され、残り13例はB群と判定された。潜因性 West 症候群7例中3例(43%)が、また症候性 West 症候群14例中5例(36%)がA群であった。A群8例のうち2例(25%)で非対称性発作を示し、B群13例のうち2例(15%)で非対称性発作を示した。局所皮質の灌流異常(多くは高灌流)を呈していても75%で発作像が左右対称であった。

一方非発作時の SPECT が局所以上を呈したのはA群で6例であるが、このうち3例は多焦点性の低灌流領域と発作時の高灌流領域が一致したのは2例であった。

D. 考察

局所性皮質の高灌流を呈した8例は、全般てんかんに分類されている West 症候群の亜型として局在関連小児てんかんに位置づけるべきという考えもある。一方非発作時に灌流異常を呈した SPECT が必ずしも発作時の限局性皮質高灌流とは相関を示さなかった。従来いわれているように、非発作時の低灌流領域が発作焦点を示唆するとの考え方からすると、West 症候群においてはこのような推論は説明し難い。また非対称性強直スパズムは症候性 West 症候群あるいは非対称性脳波異常と相関し、病巣を暗示するというのも従来からの見解であった。しかし、われわれの成績では、非対称スパズムは局所皮質の高灌流とは相関していなかった。たとえ、発作時に SPECT で限局性皮質の高灌流が認められた例においてもその発作像は左右対称性のものが多くを占めた。逆に左右非対称の発作像は必ずしも局所皮質の

高灌流を示唆しなかった。

局所皮質のてんかん原性病変部から皮質下への興奮が伝播し、その結果として両側四肢の強直が生じると考えられる。

一方では、何故に他の例では SPECT が全般性パターンを示したのかという疑問が生じる。これについては、一つには、West 症候群における発作はその持続、あるいはそのシリーズの間隔が症例によってさまざまであることがある。ECD はは静注後約1分で脳内活性が最高に達し、相当時間脳内に停滞するとされるが、発作と発作の間隔が非常に短時間であれば、静注から撮影までの30分が発作状態をほぼ反映するといえる。しかし発作間隔が長い例(30分中の実発作時間が短い)では必ずしも発作そのものの影響としての脳血流を反映していないかも知れない。

また症例14,15のように著明な脳の形態的異常がありながら、発作時 SPECT が局所異常を示さない例では、皮質下の構造、特に脳幹が対称性発作発現に重要であろうと考えられる。

E. 結論

West 症候群の発作時 SPECT を検討したところ、症候性であっても多くは発作像は左右対称であり、また発作時に非対称の局所皮質の血流の増加を示す例でも、発作は左右対称性であった。皮質にてんかん原性焦点をもち、視床を経由し、脳幹に興奮が伝わり、その結果、発作として両側性対称性のパターンを示すのではないかと考えられた。発作の発現において脳幹が重要な役割を果た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

Takayanagi M, Yamamoto K, Nakagawa H, Munakata M, Kato R, Yokoyama H, Haginoya K, Iinuma K.

Two successful cases of bromide therapy for refractory