

厚生労働科学研究費補助金「先天性水頭症」調査研究班
分担研究報告書

神経接着分子L1CAM遺伝子異常を有するヒト神経幹細胞/ 前駆細胞の生物学的特性の解析

産業技術総合研究所 ティッシュエンジニアリング研究センター¹
名古屋市立大学大学院医学研究科 生殖・遺伝医学講座 生殖・発生医学分野² 理化学研究所・脳科学総合研究センター³
慶應義塾大学医学部・生理学教室⁴ 国立病院大阪医療センター 臨床研究部⁵・脳神経外科⁶

金村 米博^{1,5} 正札 智子¹ 森 英樹¹ 種村 光代² 上口 裕之³
岡野 栄之⁴ 鈴森 薫² 山崎 麻美^{5,6}

研究要旨

現在でも根治的治療法が存在しないX連鎖性劣性遺伝性水頭症 (X-linked hydrocephalus; XLH) の神経機能の修復・再生を目指すための基礎研究として、L1CAM遺伝子異常を有する症例の病理解剖標本より樹立されたヒト神経幹細胞/前駆細胞 (human neural stem/progenitor cells; 以下hNSPC) 用いて、その分子生物学的特徴を解析した。倫理委員会承認の元、21週齢の剖検胎児大脳組織より樹立されたL1CAM遺伝子異常 (intron6 ; 694+6 g→a) を有するhNSPC (XLH hNSPC) は、イントロン6がスプライスアウトされない異常なmRNAを形成し、その結果、完全長L1CAMたんぱく質の発現喪失が見られた。このXLH hNSPCの細胞倍加速度 (64.2時間 ; 培養開始後147日目) は正常hNSPC (82.5時間 ; 培養開始後181日目) より増大していた。XLH hNSPCは増殖能の点でも、normal hNSPCと異なる性格を持つことが示唆され、今後、XLH hNSPCの特性と水頭症発症との関連性について検討する予定である。

A. 研究目的

X連鎖性劣性遺伝性水頭症 (X-linked hydrocephalus ; 以下、XLH) は、脳梁低形成 (Corpus callosum hypoplasia)、精神運動発達遅滞 (Retardation)、拇指内転屈曲 (Adducted thumbs)、痙性対麻痺 (Spastic paraplegia)、水頭症 (Hydrocephalus) の代表的な臨床症状を呈するCRASH症候群の1つである¹⁾。1992年にXLHの1家系に細胞接着分子L1CAM遺伝子異常が同定されてから、現在まで本邦例も含めて世界で140家系以上のL1CAM遺伝子異常を伴うXLH症例の報告は散見されるが、L1CAM遺伝子異常を伴うヒト神経幹細胞の機能解析の報告は皆無である。

現在でも根治的治療法が存在しないXLHの神経機能の修復・再生を目指すための基礎研究として、今回、われわれはL1CAM遺伝子異常を有する症例の病理解剖標本より樹立されたヒト神経幹細胞/前駆細胞 (human neural stem/progenitor cells; 以下hNSPC) 用いて、その分子生物学的特徴を解析したので報告する。

B. 研究方法

医学倫理委員会の承認の元、共同研究施設である名古屋市立大学大学院医学研究科生殖・遺伝医学講座 生殖・発生医学分野 (産婦人科) ならびに国立病院大阪医療センター臨床研究部が共同で樹立したL1CAM遺伝子異常 (intron 6 ; 694+6 g→a) を有するヒト胎児大脳由

来神経幹細胞/前駆細胞 (XLH hNSPC) の提供をうけて研究を実施した。

ヒト胎児大脳由来神経幹細胞/前駆細胞は、母体保護法の規定に則り妊娠21週齢で人工妊娠中絶された胎児(胎児性水頭症)大脳組織由来であり、死体解剖保存法の規定に基づき実施された病理解剖で摘出された標本(大脳組織)より樹立された。

1) XLH hNSPCの培養

XLH hNSPCの培養は、neurosphere法を基本に、Kanemuraらの変法²⁾に従って実施した。培養液 [DMEM/F-12 (1:1; Sigma)、B27 (Invitrogen)、hLIF (10 ng/ml; chemicon)、hFGF-2 (20 ng/ml; invitrogen)、hEGF (20 ng/ml; invitrogen)、heparin, anti-mycotic anti-biothic (Invitrogen)] 中で、37℃、5%CO₂の条件で浮遊培養した。得られた細胞(neurosphere)は、4~5日に一度、半量の培養液を交換して維持し、2週間に一度の割合で0.05%トリプシン溶液を用いて細胞継代を行った。

2) 増殖能評価

生細胞数測定は細胞内総ATP測定によって評価した。Celltiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega社)をプレートの各ウェルに添加し、30分間反応させた後、生細胞数を反映した発光強度を蛍光・発光マイクロプレートリーダー(Wallac社製)を用いて測定した。細胞培養1日目と6日目の細胞数の差異より細胞の生存率の解析を行い、細胞倍加速度を計算した²⁾。

3) RT-PCR

XLH hNSPCと正常hNSPC(9週齢由来;以下、normal hNSPC)の両方からtotal RNAを抽出した(RNeasy kit, QIAGEN社)。ランダムヘキサマーを用いてSuperScript II (Invitrogen life technologies社)で逆転写反応を行いcDNAを作製した。L1CAM遺伝子のエクソン6からエクソン8の313塩基対(base pair, 以下bp)をPCR法を用いて増幅した(sense primer: 5'-ctacatctgccacgccacttcccag-3', anti sense primer: 5'-gtactcgcacatcctctcctcgeccac-3')。PCRはdenature (94℃、10秒)、annealing (55℃、30秒)、extension (72℃、1分)の条件で、TaKaRa Taq (Takara社)を用いて実施した。PCR産物はDNAシーケンスを行って塩基配列の決定を行った。

4) L1CAM遺伝子導入

FLAG tagの付加されたhuman L1CAM cDNAをmammalian expression vector pIRES-hrGFP-1a (Stratagene社)に組み込んだ。遺伝子導入は293細胞に

対してLipofectamine 2000 reagent (Invitrogen life technologies社)を用いて実施した。

5) ウエスタンブロッティング

細胞を細胞溶解液で溶解し(細胞溶解液: 50mM Tris-HCl(pH 7.4)、150mM NaCl、1% NP-40、0.25% Na-deoxycholate、1mM EDTA、1mM Na₃VO₄、1mM NaF、protein inhibitor cocktail [Sigma社])、たんぱく質を抽出した。全たんぱく質(20 μ g)をSDS-PAGEで分離し、ニトロセルロース膜に転写した。ブロッキング後(5% non-fat milk/0.05% Tween20/Tris-buffered saline)、1次抗体(Anti-FLAG M2 monoclonal antibody [Sigma社]、Anti-L1 polyclonal antibodies)を4℃で一晩反応させた。2次抗体の反応後、ECL (Amersham Biosciences社)を用いてバンドの検出を行った。

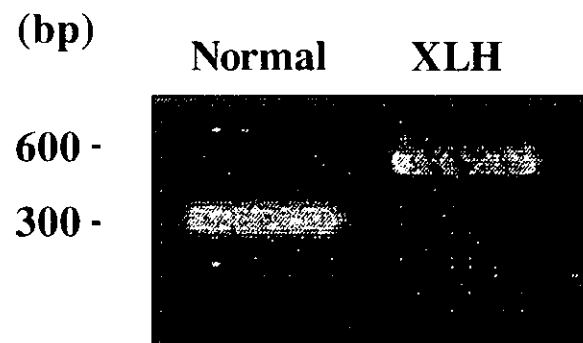
C. 研究結果

1) XLH hNSPCにおけるL1CAM遺伝子の発現様式

RT-PCRの結果、XLH hNSPCで発現するL1CAMは、正常(313bp)の転写産物は見られず、それよりも長い600bp程度の転写産物が発現していることが確認された(図1)。シーケンスの結果、XLH hNSPCで発現するL1CAMは、イントロン6(289bp)がスプライスされず残存した602bpの異常な転写産物であることが判明した。

2) XLH hNSPCにおけるL1CAMたんぱく質の発現様式

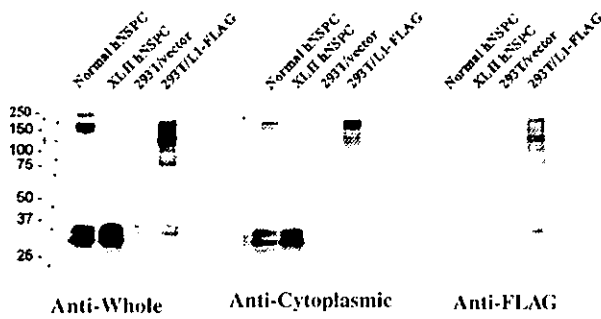
図1 XLH hNSPCにおけるL1CAM遺伝子の発現様式



完全長L1CAMとL1CAM細胞内ドメインに対する抗体の2種類の抗体を用いて解析を実施した。その解析の結果、XLH hNSPCではnormal hNSPC並びにコントロールであるL1CAM遺伝子発現ベクターを遺伝子導入した293細胞で発現するFLAG tagの付加されたL1CAMと同じ約200kDa周辺の完全長L1CAMたんぱく質の発現が見られなかった(図2)。

3) XLH hNSPCの増殖速度

図2 XLH hNSPCにおけるL1CAMたんぱく質の発現様式



XLH hNSPCとnormal hNSPCの細胞倍加速度の検討を実施した。その結果、XLH hNSPC (64.2時間：培養開始後147日目)はnormal hNSPC (82.5時間：培養開始後181日目)と比較して増殖速度が増大する傾向が見られた。

D. 考察

今回の我々の検討の結果、L1CAM遺伝子のイントロン6の694+6 g→aの1塩基異常はイントロン6のスプライスアウトを障害し、エクソン6とエクソン7の間に289pbの余分な配列が残存した正常より長いmRNAの合成を引き起こしていることが判明した。この異常なmRNAは結果的にL1CAMたんぱく質の発現異常に至り、完全長L1CAMたんぱく質の発現喪失に至ると予想されたが、実際のL1CAMたんぱく質の発現解析の結果、そのことが確認された。これらの結果より、XLH hNSPC並びにXLH hNSPC由来細胞ではL1CAM遺伝子の機能が喪失していると予想される。この完全長L1CAMたんぱく質の発現が喪失しているXLH hNSPCでは、normal hNSPCと比較して細胞増殖速度が速くなっていることが判明し、in vitroにおけるhNSPCの増殖に完全長L1CAMたんぱく質が何らかの関与を行っていることが示唆されるデータと考えられた。

L1CAMは神経軸索に発現する分子であり、従来は神経細胞の機能との関連性に関して議論される場合が殆どである。われわれの今までの検討では、hNSPCの内部には、neurosphere法を用いた培養条件下でもある一定の割合でβIII tubulin陽性神経細胞が存在することが判明している。今回われわれが検出したhNSPCにおけるL1CAMはこのβIII tubulin陽性神経細胞が発現しているものを検出した可能性は十分にあると思われる。よってneurosphere内に存在するβIII tubulin陽性神経細胞での完全長L1CAMの発現喪失が、何らかのメカニズムで

hNSPC全体の増殖に影響を与えた可能性が考えられる。

それとは別に、正常L1CAMが積極的にhNSPCで何らかの役割を担っている可能性も考えられ、その機能喪失がXLH hNSPCにおける増殖能の増大に関与している可能性も考えられる。最近、マウスの神経前駆細胞の生存・増殖・分化におけるL1CAM遺伝子の役割に関しての報告もあり³⁾、今後、hNSPCにおけるL1CAMの役割に関する研究の必要性が示唆される。

E. 結果

XLH hNSPCは増殖能の点でも、normal hNSPCと異なる性格を持つことが示唆された。今後、XLH hNSPCの特性と水頭症発症との関連性について検討する予定である。

F. 文献

- 1) Yamasaki M, Thompson P, Lemmon V. CRASH syndrome: mutations in L1CAM correlate with severity of the disease. *Neuropediatrics*:175-178, 1997.
- 2) Kanemura Y, Mori H, Kobayashi S, Islam O, Kodama E, Yamamoto A, Nakanishi Y, Arita N, Yamasaki M, Okano H, Hara M, Miyake J. Evaluation of in vitro proliferative activity of human fetal neural stem/progenitor cells using indirect measurements of viable cells based on cellular metabolic activity. *J Neurosci Res*. 69:869-879, 2003.
- 3) Dihne M, Bernreuther C, Sibbe M, Paulus W, Schachner M. A new role for the cell adhesion molecule L1 in neural precursor cell proliferation, differentiation, and transmitter-specific subtype generation. *J Neurosci*. 23: 6638-6650, 2003.

神経接着分子L1の細胞内局在を制御する軸索起始部拡散障壁

理化学研究所 脳科学総合研究センター 神経成長機構研究チーム¹ 東京工業大学 生命理工学研究科²

上口 裕之¹ 西村 一成¹ 駒田 雅之²

研究要旨

神経細胞の機能発現には、神経細胞の極性化（軸索と樹状突起の分化）が必要である。軸索と細胞体を隔てる軸索起始部（Axon Initial Segment; AIS）は、軸索と樹状突起細胞体間の膜蛋白の拡散を制限し、物理的拡散障壁として機能することにより神経細胞の極性維持に重要な役割を果たすと考えられている。分化した神経細胞では、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する神経接着分子L1は軸索遠位部（Axon Distal Segment; ADS）にのみ局在し、樹状突起細胞体には発現しない。以前、我々（上口裕之、山崎麻美）は、L1が神経細胞体および樹状突起に強く発現し、L1の機能不全に典型的な臨床病理学的所見を示した症例を報告したが、これらの症例ではL1構造遺伝子の変異を検出できなかった。したがって、本症例におけるL1の神経細胞内局在異常は、L1以外の何らかの分子の遺伝子変異によるAIS拡散障壁機能不全が原因と考えられた。本年度の我々の研究は、AISに集積する細胞骨格関連分子（アンキリンGと β IVスペクトリン）が拡散障壁を構成し、L1のADSへの局在維持に必須であることを明らかにした。今後の研究により、AIS拡散障壁機能不全と先天性脳奇形の関連性を追求していく。

A. 研究目的

成熟した神経細胞には、大別して2種類のコンパートメント（軸索突起と樹状突起細胞体）が存在し、これらのコンパートメントは異なる機能分子群を発現し分化した役割を担っている¹⁾。軸索突起と樹状突起細胞体が異なる分子群を発現するためには、選択的分子輸送および分子拡散の抑制機構が必要である²⁾。すなわち、神経細胞体で生合成された分子は軸索突起あるいは樹状突起細胞体へ選択的に輸送され、かつ軸索突起⇔樹状突起細胞体間の分子拡散が制限されることが、極性維持の必要条件である。本研究では、軸索突起⇔樹状突起細胞体間の分子拡散の抑制機構を解析し、その神経発生過程における生理的意義および先天性脳奇形発症との因果関係を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

β IVスペクトリン (-/-) マウスラインの遺伝子型判定はサザンブロット法により行い、蛋白質発現はウェスタンブロット法で確認した³⁾。生後0~1日齢マウスの海馬組織を0.02%トリプシン/0.1%DNaseで分散後、アストロサイトと非接触共培養した。Neurobasal/B27/L-glutamine培地で8-14日間培養し、免疫染色あるいは光ピンセットを用いた実験に使用した。L1とMAP2の細胞内局在は、4%ホルムアルデヒド固定0.1%トライトンX-100処理後、抗ラットL1抗血清⁴⁾あるいはモノクローナル抗MAP2抗体（クローンAP20, Chemicon）を用いて解析した。また5ヶ月齢マウスの脳組織のパラホルムアルデヒド固定凍結切片を作成し、抗ラットL1抗血清を用いて免疫染色を行った。抗L1抗体をコートしたマ

マイクロビーズの作成・調整および光ピンセット法は以前報告した方法で行った^{5,6)}。

C. 研究結果

神経軸索と細胞体を隔てる軸索起始部 (Axon Initial Segment; AIS) は、軸索と樹状突起細胞体間の膜蛋白の拡散を制限し、物理的拡散障壁として機能することにより神経細胞の極性維持に重要な役割を果たすと考えられている^{7,8)}。分化した神経細胞では、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する神経接着分子L1は軸索遠位部 (Axon Distal Segment; ADS) にのみ局在し、樹状突起細胞体には発現しない。以前、我々(上口裕之、山崎麻美)は、L1の神経細胞内局在異常に起因すると考えられた遺伝性水頭症1家系2症例を報告した(難治性水頭症調査研究班平成11年度研究報告書)。本症例では、L1が神経細胞体および樹状突起に強く発現し、L1の機能不全に典型的な臨床病理学的所見を呈したが、L1の構造遺伝子には変異を検出できなかった。したがって、本症例におけるL1の神経細胞内局在異常は、L1以外の何らかの分子の遺伝子変異によるAIS拡散障壁機能不全が原因と考えられた。L1細胞内領域はアンキリン(スペクトリン-アクチン骨格と結合する蛋白質)と結合し⁹⁾、アンキリンGと β IVスペクトリンはAISに強く集積する^{3,10)}。よって、これらの分子がAIS拡散障壁を構成することによりL1の局在を制御するものと推察し、本仮説を検証する実験を行った。

β IVスペクトリン (+/-) 海馬神経細胞(正常対照群)と比較して、 β IVスペクトリン (-/-) 神経細胞においてはL1が軸索から細胞体側に散在した(図1)。しかし、 β IVスペクトリンの欠失は他の分子(MAP2、テレンセファリン、Thy-1、チュブリン)の局在に影響をおよぼさなかった。成体マウスの海馬組織においても同様の結果が得られ、 β IVスペクトリンの欠失によりL1が神経細胞体に強発現した(図2)。そこで、AISのL1に対する拡散障壁を定量するため、抗L1抗体をコートした直径 $0.8\mu\text{m}$ のビーズを光ピンセットで捕捉・牽引し、培養海馬神経細胞のAISあるいはADS形質膜上でのL1分子の可動性を測定した(図3)。 β IVスペクトリン (+/-) 神経細胞(正常対照群)では、ADS膜に接着したビーズを容易に牽引することができたが、AIS膜に接着したビーズは光ピンセットの捕捉力では牽引できなかった。これはAISのL1に対する拡散障壁能を反映するものであ

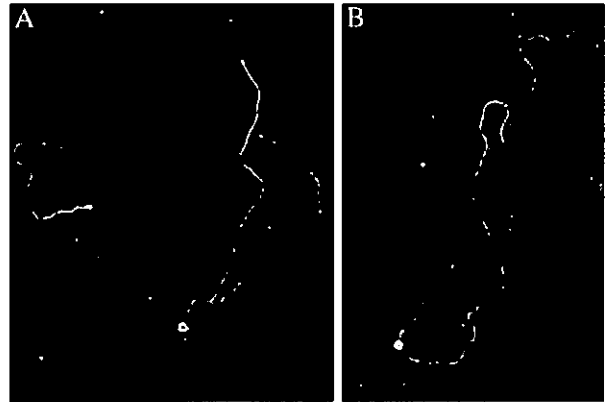


図1: β IVスペクトリン (+/-) マウス (A) あるいは β IVスペクトリン (-/-) マウス (B) 由来培養海馬神経細胞の免疫染色像。緑はL1の局在を示し、赤は樹状突起細胞体マーカーであるMAP2を示す。 β IVスペクトリン (-/-) 細胞では、MAP2陽性の細胞体にL1が強発現する。



図2: 生後5ヶ月の野生型マウス (A) あるいは β IVスペクトリン (-/-) マウス (B) の海馬CA1錐体細胞層のL1免疫染色像。野生型マウスでは錐体細胞層でのL1発現レベルは低い(比較的黒い領域)、 β IVスペクトリン (-/-) マウスの錐体細胞層(細胞体)にはL1が強発現する。

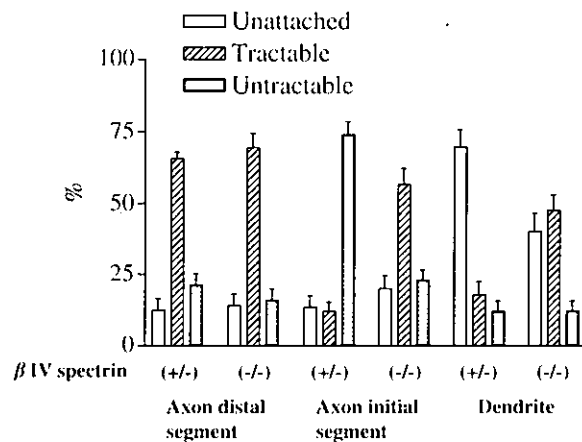


図3: 培養海馬神経細胞形質膜上でのL1の可動性の解析。 β IVスペクトリン (+/-) あるいは β IVスペクトリン (-/-) 神経細胞の形質膜上(軸索遠位部、軸索起始部、樹上突起部)へ抗L1抗体をコートしたビーズを接触させ、ビーズの挙動を3種類(接着しない、接着して牽引可能、接着して牽引不可能)に分類し、その割合を示す(平均±標準誤差、n=10)。

る。また樹状突起でのL1発現レベルが低いため、大部分のビーズは樹状突起形質膜には接着しなかった。しかし β IVスペクトリン (-/-) 海馬神経細胞においては、

AIS膜に接着したビーズであっても、光ピンセットによる牽引が可能であった。また、L1が樹状突起細胞体へ漏れ出ているため、ビーズの樹状突起膜への接着性が有意に上昇していた。以上の結果から、AISに集積する β IVスペクトリンを含む細胞骨格分子群が、L1に対する拡散障壁を構成することにより、L1の軸索への局在を維持されることが明らかになった。

D. 考察

神経細胞の機能発現には、神経細胞の極性化（軸索と樹状突起の分化）が必要である。軸索と細胞体を隔てる軸索起始部（AIS）は、軸索と樹状突起細胞体間の膜蛋白の拡散を制限し、物理的拡散障壁として機能することにより神経細胞の極性維持に重要な役割を果たすと考えられている。神経細胞体で生合成されたL1は軸索突起へ選択的に輸送され、AIS拡散障壁により樹状突起細胞体への漏れ出しが制限されることにより、軸索突起での限局性発現が維持される。軸索突起でのL1の限局性発現パターン障害が原因と考えられた先天性水頭症が報告されていることから、AIS拡散障壁の形成は神経系の発生過程に重要な役割を担っていることが示唆される。本臨床例でのAIS拡散障壁の機能不全を検証するため、アンキリンGと β IVスペクトリンの免疫染色および遺伝子解析を進める予定である。

E. 結論

β IVスペクトリンは軸索起始部で分子拡散障壁を構成し、軸索に発現するL1が樹状突起細胞体へ漏れ出すことを抑制し、L1の細胞内極性分布の形成に関与することが明らかになった。また、軸索起始部拡散障壁の機能不全が原因と推察される遺伝性水頭症例を報告した。

F. 文献

- 1) Craig AM, Banker G: Neuronal polarity. *Annu Rev Neurosci* 1994, 17:267-310.
- 2) Horton AC, Ehlers MD: Neuronal polarity and trafficking. *Neuron* 2003, 40:277-295.
- 3) Komada M, Soriano P: β IV-spectrin regulates sodium channel clustering through ankyrin-G at axon initial segments and nodes of Ranvier. *J Cell Biol* 2002, 156:337-348.
- 4) Long KE, Asou H, Snider MD, Lemmon V: The role of endocytosis in regulating L1-mediated adhesion. *J Biol Chem* 2001, 276:1285-1290.
- 5) Kamiguchi H, Yoshihara F: The role of endocytic L1 trafficking in polarized adhesion and migration of nerve growth cones. *J Neurosci* 2001, 21:9194-9203.
- 6) Nishimura K, Yoshihara F, Tojima T, Ohashi N, Yoon W, Mikoshiba K, Bennett V, Kamiguchi H: L1-dependent neuritogenesis involves ankyrinB that mediates L1-CAM coupling with retrograde actin flow. *J Cell Biol* 2003, 163:1077-1088.
- 7) Winckler B, Forscher P, Mellman I: A diffusion barrier maintains distribution of membrane proteins in polarized neurons. *Nature* 1999, 397:698-701.
- 8) Nakada C, Ritchie K, Oba Y, Nakamura M, Hotta Y, Iino R, Kasai RS, Yamaguchi K, Fujiwara T, Kusumi A: Accumulation of anchored proteins forms membrane diffusion barriers during neuronal polarization. *Nat Cell Biol* 2003, 5:626-632.
- 9) Bennett V, Chen L: Ankyrins and cellular targeting of diverse membrane proteins to physiological sites. *Curr Opin Cell Biol* 2001, 13:61-67.
- 10) Berghs S, Aggujaro D, Dirckx R, Jr., Maksimova E, Stabach P, Hermel JM, Zhang JP, Philbrick W, Slepnev V, Ort T, et al.: β IV spectrin, a new spectrin localized at axon initial segments and nodes of Ranvier in the central and peripheral nervous system. *J Cell Biol* 2000, 151:985-1002.

脳梁欠損症のMR tractography：Probst bundleの解析を中心に

福岡大学医学部放射線科¹ 帝京大学医学部放射線科² 兵庫医科大学放射線科³

宇都宮英綱¹ 大場 洋² 安藤久美子³ 黒岩 大三¹ 高野 浩一¹

研究要旨

Probst bundle (PB) は脳梁欠損症に見られる特異的な神経線維束である。今回MR tractographyを用いてPBの解析を行い、その発生学および形態学的意義について検討した。対象は脳梁完全欠損6例(小児3例、成人3例)。MRIは1.5T(GE、3例；Philips、1例)、1.0T(Philips、2例)で撮像。拡散テンソル収集はSingle shot EPI、3～5mm厚、FOV;24cm、Matrix;128×128、b=700～1000、6軸で行った。画像解析は東大医学部附属病院放射線科画像情報処理・解析研究室において開発されたVolume-oneとdTV1.5の組み合わせで行った。b=0画像の冠状断でPBと思われる部位にROIを設定しone-ROI法にて軌跡を描出させ、PBの全体像を把握した。続いて、軌跡の前方部(前頭葉白質)に標的ROIを設け、両者を通過する軌跡のみ描出させた(two-ROI法)。両法で得られた軌跡を重ね合わせ、PB内での神経線維の配列を調べた。全例(12半球)に両側のPBが明瞭に描出され、3例ではPBのサイズに左右差が認められた。前頭葉からの神経線維はPBの内側(半球間裂側)を走行し、尾側の線維ほど外側(側脳室側)を走行していた。

MR tractographyはPBの発達の評価に有用であった。また、PB内での神経線維の配列は、本来なら脳梁となる神経線維の発達過程を反映している可能性が示唆された。

A. はじめに

近年、MR拡散テンソル画像(MR-diffusion tensor imaging：MR-DTI)にて脳内の拡散異方性(diffusion anisotropy)の情報を詳細に解析することが可能となった^{1,2)}。中でも、異方性の強さと方向性から隣接するボクセル同士の拡散テンソルの連続性を同定し、巨視的な神経線維の走行を想定する神経線維追跡法(fiber tracking)が開発され、現在その臨床応用について勢力的に研究が進められている³⁾。Fiber trackingにより必要な神経線維束を選択的かつ3次元的に描出する方法をMR-tractographyと呼ぶ。

今回、MR tractographyにより、脳梁欠損症に見られる特異的な白質線維束であるProbst bundle⁴⁾を解析し、そ

の発生学および形態学的意義について検討したので報告する。

B. 対象と方法

脳梁完全欠損6例(小児3例、成人3例)を対象とした。性別は男性3例、女性3例である。MRIはPhilips Intera 1.0T(福岡大；2例)、Philips Intera 1.5T(兵庫医大；1例)、GE Signa 1.5T(帝京大；3例)を使用した。撮像シークエンスはスピンエコー型EPIを用い、TR:4000～7000ms、TE:98～130ms、加算回数；2～4、マトリックス数；128×128、FOV:24cm、スライス厚；3～5mm、b値；700～1000s/mm²、MPGパルス；6軸(Philips)、13軸(GE)にて拡散テンソルデータを収集した。拡散テンソルデータの解析は、東大医学部附属病院放射線科画

像情報処理・解析研究室にて開発された、画像解析ソフトDiffusion tensor visualizer (dTV) 1.5と3次元表示ソフトVolume-oneの組み合わせで行った¹⁾。FA (fractional anisotropy) の閾値は >0.12 とした。MPGを印加する前のT2強調画像(b=0画像)冠状断で、Probst bundleが最もよく描出されていると思われる部位に関心領域(ROI)を設定し、これを起点として軌跡を描出させた(one-ROI法)。続いて、軌跡の前方部(前頭葉白質)に標的ROIを設け、最初に設けたROIと標的ROIの両者を通過する軌跡のみ描出させた(two-ROI法)。両法で得られた軌跡を重ね合わせ、Probst bundle内での神経線維の配列を解析した。尚、標的ROIは前頭前野(前頭極)、運動前野～運動野、および眼窩回白質に置いた。

C. 結果

- 1) One-ROI法により、全例(12半球)にProbst bundle (PB)の描出が可能であった。小児例の2例にPBの左右差(左側 $>$ 右側)が見られ、大脳半球のサイズの左右差に相応していた。また、限局性(右側前頭葉)皮質異形成を合併する成人1例にPBの左右差が見られ、合併側(右側)のPBが小さかった(図1)。
- 2) Two-ROI法によりPB内の神経線維の配列が解析し得た。すなわち、前方(前頭前野)の線維ほどPBの内側下部を走行し、後方(運動前野～運動野)の線維ほどPBの外側上部を走行していた。また、眼窩回(3症例、3半球に同定)からの線維はPBの最外側部を走行していた(図2)。

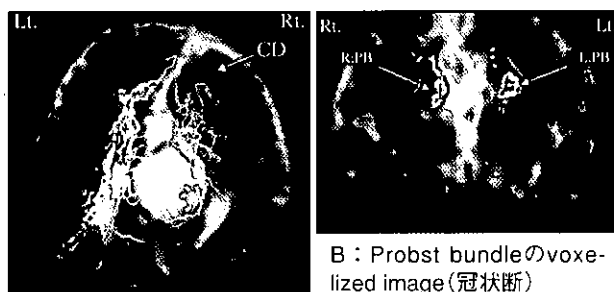
D. 考察

脳梁は胎生期の正中終脳に発生するMassa commissuralis (MC)を大脳新皮質から投射される神経線維が通過することで形成される。胎齢11～12週頃最初の神経線維が通過し、12～13週で将来脳梁膝となる交連線維の集合体が形成される。その後、5～7週の間新皮質の急速な成長とともに頭側から尾側にかけて神経線維の通過が起こる。このように、脳梁の発生には、原基であるMCの形成とこれを通過する神経線維(脳梁線維)の発達といった2つのメカニズムが関与している⁵⁾。何らかの原因でMCの形成不全が生じると神経線維は通過する「窓」を失い脳梁欠損が生じる。一方、MCを通過できなかった神経線維は同側の大脳半球内側面を頭尾方向に走行し、Probst bundle (PB)と呼ばれる特異的神経

線維束を形成する⁶⁾。したがって、脳梁欠損症において本来脳梁となるべき神経線維の発達が正常に成されたならば、両側ともによく発達したPBが側脳室内側面に形成されることになる。

今回のMR tractographyによる検討では、6症例(12半球)全てにPBを描出することができた。この内、小児の2例にはPBのサイズに左右差を認め、それぞれ大脳半球のサイズに相応していた(図2)。この所見は左右大脳半球における新皮質の発達には少なからず左右差が存在することを示唆するものと思われる。また、限局性(右側前頭葉)皮質異形成を伴う成人の1例においても、

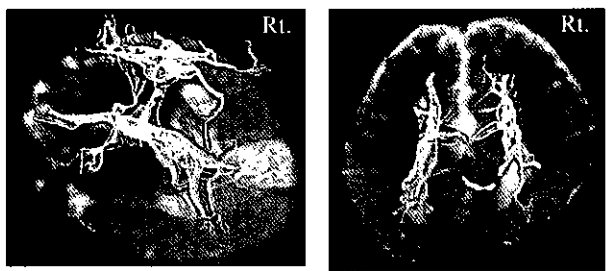
図1) 右側前頭葉の皮質異形成を伴った脳梁欠損症：34歳、男性。



A: Probst bundleのfiber tracking (背側から見た図) 右側のProbst bundleの低形成が明瞭である。右側前頭葉に皮質異形成 (CD) が見られる。

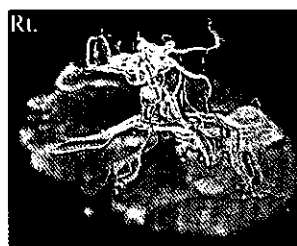
B: Probst bundleのvoxelized image (冠状断) 左側Probst bundle (Lt. PB)の形成は正常で、側脳室体部内側面を走行している。右側(Rt. PB)は低形成を示し、内側(半球間裂側)を走行している。

図2) 後頭蓋窩くも膜嚢胞を伴った脳梁欠損：1歳、女児。



A: One-ROI法による両側Probst bundleのfiber tracking 両側のProbst bundleが明瞭に描出されている。右側のProbst bundleが大脳半球の大きさに相応して、やや小さい。

B: Two-ROI法による左側前頭極からのfiberの走行 左側前頭極からのfiber (青色)はProbst bundleの内側部(半球間裂側)を走行している。



C: Two-ROI法による左側運動野および眼窩回からのfiberの走行 運動野からのfiber (ピンク色)は眼窩回からのfiber (緑色)の内側を走行している。

合併半球のPBが非合併側より明らかに低形成を示していた(図1)。これは、皮質異形成により同側の神経線維の発達が障害されたことを示すものと考えられる⁶⁾。すなわち、MR tractographyによるPBの解析は、脳梁欠損症における神経線維の発達を評価する上で、形態学的にも臨床的にも重要な意義をもつものと思われる。

前述したように脳梁の発生は膝(genu)より始まり尾側の幹(truncus)、膨大(splenium)が形成され、最後にもっとも前方の吻(rostrum)が形成されると考えられている。Rakicら⁵⁾は吻の形成がもっとも最後に生じることを病理学的に示したが、これには異論を唱える研究者もある⁷⁾。Probst bundleは、本来脳梁となるべき神経線維であるため、MCを通過しようとする神経線維の走行を表すと考えられる。すなわち、脳梁膝を構成する前頭前野からの神経線維は最初にMCを通過しようとするため、MCが存在しない脳梁欠損症の場合はPBの最内側を構成すると想定される。同様に脳梁幹を構成する運動前野、運動野の線維は前頭前野の線維よりPBの外側を構成すると考えられる。今回のMR tractography (two-ROI法)によるPB内神経線維の配列の解析では、予測されたように前頭前野からの線維がPBの内側を走行し、後方の線維ほどPBの外側を走行することが示された。また、眼窩回からの線維(3半球に同定)はいずれもPBの最外側を走行していた(図2)。この所見は脳梁吻を構成する眼窩回からの線維はMCを最後に通過することを示唆していると思われ、脳梁吻は最後に形成されるとしたRakicらの学説を支持する所見と考えられる。このように、MR tractographyは発生学的知見の解析にも応用することが可能と思われた。

E. 結語

- 1) MR tractographyは脳梁欠損症におけるProbst bundleの発達の評価に有用であった。
- 2) Probst bundle内での神経線維の配列は、本来なら脳梁となる神経線維の発達過程を反映している可能性が示唆された。

F. 文献

- 1) Masutani Y, Aoki S, Abe O, et al: Diffusion tensor imaging : Recent advance and new techniques for diffusion tensor visualization, European J. of Radiology, vol 2002:46:53-66.
- 2) Mori S, Crain BJ, Chacko VP, et al: Three-dimensional

tracking of axonal projections in the brain by magnetic resonance imaging. Ann Neurol 1999; 45: 265-2.

- 3) 青木茂樹、阿部 修 編、これでわかる拡散MRI、秀潤社 2002.
- 4) Probst FP: Congenital defect of the corpus callosum - morphology and encephalographic appearances. Acta Radiol[suppl] 1973; 331:1-52.
- 5) Rakic P, Yakovlev PI : Development of the corpus callosum and cavum septi in man. J Comp Neurol 1968; 132: 45-72.
- 6) Utsunomiya H, Ogasawara T., Hayashi T, et al : Dysgenesis of the corpus callosum and associated telencephalic anomalies: MRI. Neuroradiology 1997;39: 302-310.
- 7) Kier EL, Truwit CL: The lamina rostralis: modification of the concepts concerning the anatomy, embryology, and MR appearance of the rostrum of the corpus callosum. AJNR Am J Neuroradiol 1997; 18: 715-722.

高周波細径プローブを用いた子宮腔内超音波法による 胎芽頭部脳室間孔および中脳水道計測

香川大学医学部母子科学講座周産期学婦人科学

田中 宏和 金西 賢治 秦 利之

研究要旨

生体内における1st trimesterの胎芽／胎児の脳脊髄液交通路についての検討を、高周波細径プローブによる子宮腔内超音波法により行った。脳室間孔は妊娠8週に極小をしめす2次関数で回帰される特徴的な発育形態をしめし、中脳水道は週数に比例した発育をしめすことが確認された。このような脳脊髄液交通路の詳細な観察は、水頭症の初期発症過程の解明につながる可能性を示唆するものと考えられた。

A. 研究目的

近年の超音波断層法の発達により、超音波による胎児の観察は飛躍的に進歩した。とりわけ、産科領域における経膈超音波法の導入は、1st trimesterの胎芽および胎児の成長の把握や各部の異常についての早期診断を著しく進歩させた。しかしながら、中枢神経系における細部の形態観察は、経膈超音波法によってもなお困難である。今回、妊娠6週から妊娠11週の胎芽および胎児に対し、高周波細径プローブをもちいて中枢神経系の観察を行い、妊娠初期の胎芽および胎児の脳脊髄液交通路についての検討を行った。

B. 研究方法

妊娠6～11週で治療的な中絶手術を予定した85名を対象として、十分にインフォームド・コンセントを行い同意を得た後に、手術に先立って子宮腔内超音波法を施行した。妊娠週数は、経膈超音波法によるCRL計測により確認した。体腔内用超音波診断装置(ALOCA SSD-550)に装着した細径プローブ(20MHz,6Fr)を、滅菌シースカ

テータルに挿入。無菌的操作にて経膈的に子宮頸管より子宮腔内に誘導し、メカニカルラジアル方式にて作動するスキャナーセンサー部を胎芽近傍に位置させることにより、胎芽頭部の観察を行った。

観察された頭部において脳室間孔(Monro孔)の内径および中脳水道の縦径(高さ)・横径(幅)を計測した(Fig.1～3)。得られた各計測値と妊娠週数およびCRLとの関係を検討した。

C. 研究結果

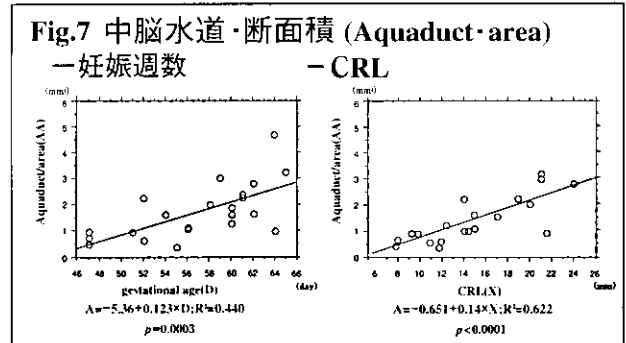
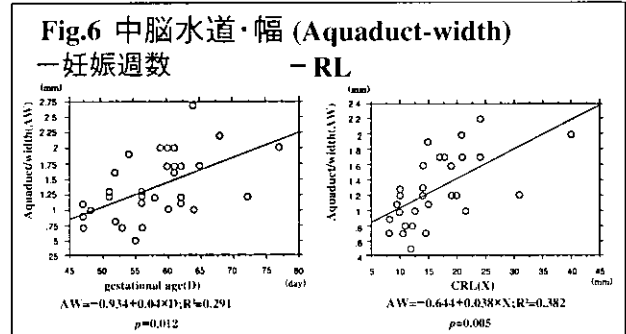
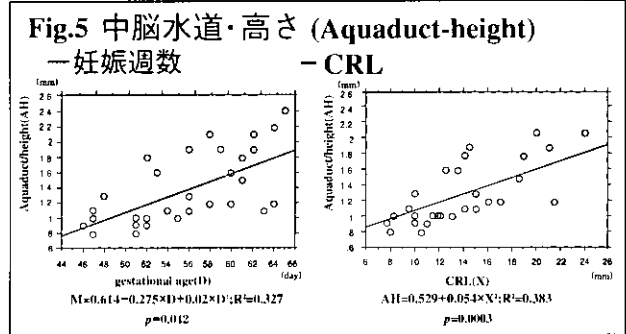
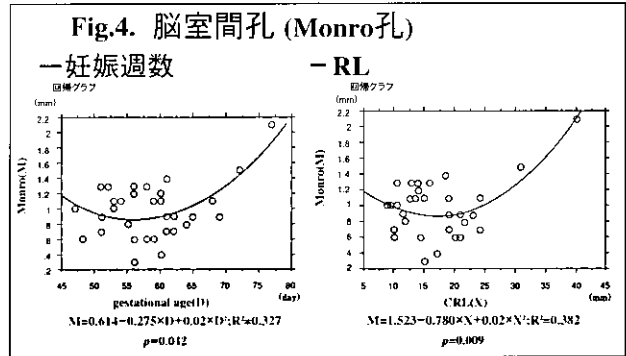
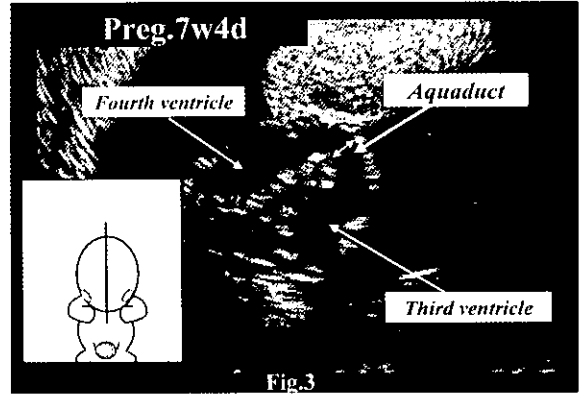
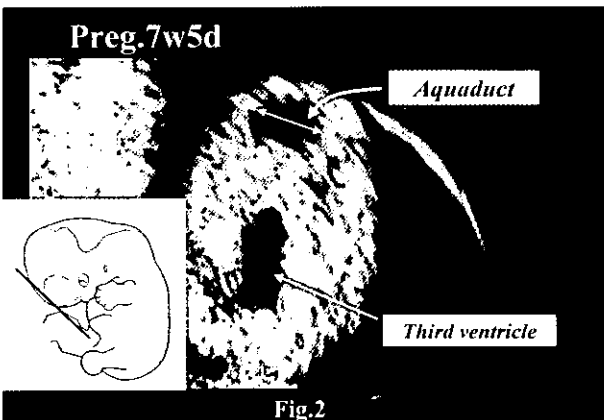
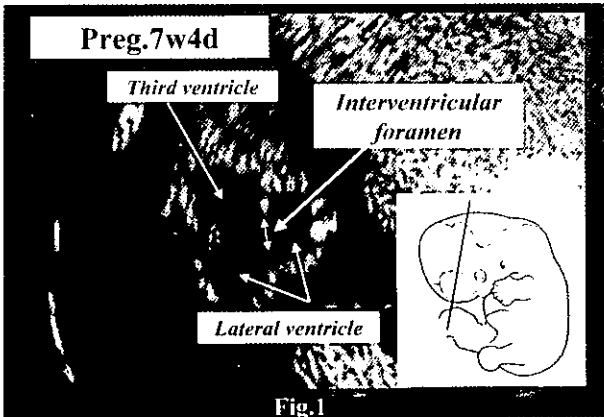
胎芽頭部の観察により、脳室間孔もしくは中脳水道部が正確に描出された(Fig.1～3)。計測が可能であった症例は85例中54例(63.5%)であった。

この54例における検討の結果、観察期間において、脳室間孔(M:脳室間孔径)と妊娠週数(D:最終月経からの日数)の間には $M=0.614-0.275\times D+0.02\times D^2$ ($R^2=0.327$, $p=0.042$)で回帰される有意な相関が認められた。またCRL(X)との間には $M=1.523-0.780\times X+0.02\times X^2$ ($R^2=0.382$, $p=0.009$)でしめされる有意な相関が認められた(Fig.4)。

一方中脳水道の径と妊娠週数およびCRLとの間では、中脳水道の高さ(AH)と妊娠週数(D:最終月経からの日数)の間に $AH = -1.51 + 0.052 \times D$ ($R^2 = 0.417, p < 0.0001$)、中脳水道の高さ(AH)とCRL(X)の間に $AH = 0.529 + 0.054 \times X$ ($R^2 = 0.383, p = 0.0003$)のともに1次関数で回帰される有意な相関が認められた(Fig.5)。また、中脳水道の幅(AW)と妊娠週数(D:最終月経からの日数)の間に $AW = -0.934 + 0.04 \times D$ ($R^2 = 0.291, p = 0.012$)、中脳水道の幅(AW)とCRL(X)の間に $AW = -0.646 + 0.038 \times X$ ($R^2 = 0.382, p = 0.005$)のそれぞれ1次関数で回帰される有意な相関が認められた(Fig.6)。

さらに中脳水道の高さと幅の計測が可能であった25例において、近似楕円とした面積計測値と妊娠週数およびCRLとの関係について相関をもとめた。その結果、中脳水道断面積(AA)と妊娠週数(D:最終月経からの日数)の間に $AA = -5.36 + 0.123 \times D$ ($R^2 = 0.440, p = 0.0003$)、またCRL(X)との間に $AA = -0.651 + 0.14 \times X$ ($R^2 = 0.622, p < 0.0001$)で回帰される非常に高い有意な相関が明らかとなった(Fig.7)。

なお子宮腔内超音波法の施行に際し、その手技中・手技後ともに、問題となる副作用は認められなかった。



D. 考察

超音波断層法による1st trimesterの胎芽／胎児における中枢神経系の観察は、1994年・1995年のBlaas et al.の経膈超音波法による脳胞計測の報告がある^{1,2)}。その後、我々は2000年に高精細細径プローブによる子宮腔内超音波法³⁾をもちい、さらに精度の高い報告を行った⁴⁾。(1999年の「難治性水頭症」調査研究班で報告)さらに、同手法により胎芽の脳実質部分についての検討を2001年の「先天性水頭症」調査研究班・班会議で報告し、実質部分の形態観察が可能であることを示した。

上記の検討により、高精細細径プローブによる子宮腔内超音波法により1st trimesterにおける中枢神経の詳細にわたる観察が可能となることを証明した。そこで今回、脳脊髄液の産生時期の前に、水頭症を予測しえる可能性を模索するために、脳室間孔と中脳水道の計測を試みた。結果から観察期間において、脳室間孔は妊娠8週くらいに極小をしめす特徴的な経過をとることが確認された。前脳の両側方向より終脳が嚢胞状に発生する際に境界部分が狭小化し、第3脳室と側脳室に分離する。その分離が妊娠8週の初めにほぼ完成するものと考えられる。中脳水道については妊娠週数の進行に比例して拡張することが明らかとなった。

E. 結論

子宮腔内超音波法により、妊娠初期における脳室間孔と中脳水道の発育に関する特徴が示され、将来の非交通性水頭症の発症予測に役立つ可能性が示唆された。

F. 文献

- 1) Blaas, H.G., Eik-Nes, S.H. et al. Early development of the forebrain and midbrain : a longitudinal ultrasound study from 7 to 12 weeks of gestation . Ultrasound Obstet. Gynecol. , 4 , 183-192 , 1994.
- 2) Blaas, H.G., Eik-Nes, S.H. et al. Early development of the hindbrain : a longitudinal ultrasound study from 7 to 12 weeks of gestation. Ultrasound Obstet. Gynecol. , 5 , 151-161 , 1995.
- 3) 田中宏和, 妹尾大作, 秦 利之. 超音波診断・細径プローブ . 産科と婦人科 , Vol.67, 882-887, 2000.
- 4) Tanaka, H. , Hata, T. et al. Intrauterine sonographic

L1CAM異常によるX-linked hydrocephalusと ヒルシュスプルング病

大阪府立母子保健総合医療センター 企画調査部¹ 産業技術総合研究所ティッシュエンジニアリング研究センター²
国立病院大阪病院医療センター 臨床研究部・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

先天性水頭症の中にX-linked hydrocephalus (以下XLH)がある。先天性水頭症と白質低形成など多彩な脳形成異常、痙性四肢麻痺、精神遅滞、内転母指などを特徴とする先天奇形症候群である。責任遺伝子は神経接着因子L1CAM (L1 cell adhesion molecule)で、各種遺伝子異常が同定されている。XLHの中樞神経系以外の症状として、ヒルシュスプルング病 (HSCR)を合併する例が報告されている (Okamoto et al. 1997, Vits et al. 1998, Parisi et al. 2002)。HSCRの責任遺伝子はRET、EDN3、EDNRB、GDNF、SOX10などが知られている。その他、各種の先天性疾患に合併するHSCRが知られている (Amiel et al. 2001)。L1CAM遺伝子は腸管壁内神経節細胞の発生にも重要な役割を持つことが知られており、多因子性のHSCRの病因の一部を占めると考えられる。

今回我々はXLHとHSCRを合併する症例、3家系4例においてL1CAM遺伝子の新変異を同定したので報告する。

A. 研究目的

XLHの原因が神経接着因子L1CAM遺伝子異常であることが報告された (Rosenthal et al. 1992)。L1CAMは6個の免疫グロブリン様ドメインと5個のフィブロネクチンリピート様ドメインおよび膜貫通ドメインと細胞内ドメインから構成される免疫グロブリンスーパーファミリーの糖蛋白である。L1CAM遺伝子座位はXq28にある。L1CAM蛋白は細胞分裂後の神経細胞の軸索表面に出現し、神経系の発生、神経細胞の移動、神経突起延長などに重要である。L1CAMは中樞神経系だけでなく、消化管の神経芽細胞の遊走移動にも重要な分子である。HSCRの大腸ではL1CAMの発現が減少している。YonedaらはCAM-陽性神経線維が有意にaganglionic bowelでは減少していることを示した。CAM-FGFシグナル伝達が

HSCRでは異常をきたすという知見が明らかになっている。XLHとHSCRの合併例でL1CAM遺伝子異常の検索を行い、HSCRの病因としてのL1CAM異常を検討した。

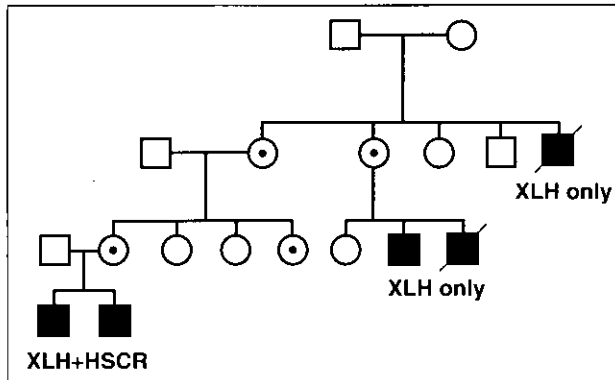
B. 研究方法

最初に、症例の臨床経過を記載する。遺伝子解析の方法は本研究班の過去の報告同様、リンパ球から抽出したDNAを用いてL1CAM遺伝子各エクソンをPCRで増幅し、直接シーケンスで塩基配列を決定した。まず、患者の臨床像を記載する。

Case 1

先天性水頭症のカナダ人家族で遺伝子検索の依頼を受けた。家族歴をみると、母方の祖母の妹は先天性水頭症男児同胞例があり、一方は死産であった(図1)。さらに、

母方祖母には乳児期に死亡した先天性水頭症の弟がいた。この3死亡例については水頭症の所見の詳細は不明で、HSCRを合併したという記載もないが、家系的にはXLHを考えさせる。解析対象の症例は、生後まもなく哺乳障害があり、HSCRと診断されてストマ手術を受けた。その後、生後3カ月に頭囲拡大で受診した。内転母指を認めた。CT、MRIで側脳室の顕著な拡大を認めた。



Case 2

case1の弟で胎児期に中脳水道閉塞を伴うXLHと診断されていた。生後3日でシャントを受けた。後日、腹部膨満を生じ、HSCRと診断された。母指異常も認めた。

L1CAM遺伝子intron15のスプライス異常を生じうる新変異を同定した(IVS15+5G→A)。家系内に存在するXLHのみの例や女性保因者については遺伝子解析はしていないが、同じ変異を持つことが予想される。家系内でXLHだけの例とHSCR合併例がともに存在するintrafamilial heterogeneityが認められた。

Case 3

8歳のスペイン人男児。健康な姉がいる。本児の次の妊娠は先天性水頭症で人工流産となっている。生後まもなくHSCRの手術を受けた。頭囲拡大があり、水頭症と診断された。痙性四肢麻痺、眼振、舌萎縮、軽度精神遅滞であった。両側内転母指を認めた。

画像診断上、大脳白質低形成、波打ち状の側脳室壁、脳梁欠損、透明中隔欠損、視床癒合、小脳低形成、皮質脊髄路の低形成などの多彩な脳形成障害を特徴とする。

スペインの研究者から遺伝子解析依頼を受けた。intron5において、一塩基置換を認めた(IVS5+6T→G)。この変異についてはHofstraからも報告しており、同一症例か近親者の可能性が考えられる。一般にはIVS1から5での塩基置換はスプライス異常を生じるが、より内部の

塩基置換は特殊な例を除いては異常を生じないHofstraらはin vitroでmRNAを調べた結果、スプライス異常は生じていないと報告したが、スプライス効率の低下によるin vivoでのL1CAM蛋白量の減少は否定できない。

Case 4

14歳のスペイン人男児。次の妊娠は先天性水頭症で人工流産となった。第3子は健康。HSCRの手術を受けていた。頭囲拡大があり、画像診断でXLHの特徴的所見を認めた。痙性四肢麻痺、眼振、舌萎縮、軽度精神遅滞であった。両側内転母指を認めた。

exon22に一塩基変異を認め、stopコドンに変化していた。L1CAM蛋白は短縮した分子しか形成されず、病因と考えられた。

表1 X連鎖性水頭症とヒルシュスプルング病の合併例のまとめ

報告者	年	変異の位置とドメイン	変異の内容
Okamoto et al.	1997	Exon 18 Fn2	2421delTG
Vits et al.	1998	Exon 15 Fn1	R632P
Parisi et al.	2002	Exon 18 Fn2	V752M
Case 1 & 2	本報告	Intron 15 Fn1	IVS 15+5G→A
Case 3	〃	Intron 5 Ig1	IVS 5+6T→G
Case 4	〃	Exon 22 Fn4	Gln992Stop

C. 考察

過去のXLHとHSCRの合併例についてまとめる。

①在胎25週で先天性水頭症と超音波診断された。生後、HSCR、口蓋裂、両側内転母指を認めた。まずHSCRの手術を受け、後日脳室腹腔シャント手術を受けた。3歳時点で痙性四肢麻痺、重度精神遅滞を認めた。大脳白質低形成、波打ち状に変形した側脳室壁、視床癒合などの特徴的所見を認めた。家族例ではなかったが臨床像からXLHを疑い、遺伝子解析を行った。その結果、L1CAM遺伝子のエクソン18に2塩基欠失(2421delTG)を認めた(Okamoto et al. 1997)。フレームシフトのため下流に早期ストップコドンが生じ、L1CAM分子はFn2の途中までしか作られない。やはり、膜結合ができず、分子の機能はなくなる。母親は変異保因者であった。

②Vitsらは2歳の男児例で精神遅滞、内転母指、HSCR、側脳室拡大、脳梁欠損、小脳低形成を呈する例を報告した。R632P missense mutationを見いだした。

③ParisiらはXLHとHSCR合併例においてexon18に

V752M mutation を報告した。ただし、同じ変異のXLHがGuらにより報告されているが、その例にHSCRはなかった。

今回の報告にこれらに加えると6家系7例になる(表1)。L1CAMmutationホームページでは現時点で153例の集積がある。

<http://dnalab-www.uia.ac.be/dnalab/l1/>

未報告例も多数あると思われるが、概算ではXLHの3-4%でHSCRが合併することになり、偶然とは言えない頻度である。XLHの重度神経障害例では早期死亡や難治性便秘としてHSCRが看過されている可能性もあり、これよりもさらに多い可能性がある。XLHの経過の中で注意すべき合併症と考えられる。遺伝子変異には一定の傾向はない(表1)。

図1に示すように、Case1では家系内にXLHにHSCRを合併する例としない例が存在するので、intrafamilial heterogeneityが存在する。同じL1CAM異常でありながら、Parisiらの例はHSCRを合併するが、別の報告では合併しなかった。このようにHSCRの発症についてはL1CAM異常だけでは説明できない点が存在する。また、L1CAMノックアウトマウスではHSCRなど消化管異常の記載はない(Dahme et al. 1997)。

HSCRは、RET proto-oncogene、EDNRB (endothelin-receptor B) and EDN3 (endothelin-3)、GDNF、Neurturin、ECE、SOX10、SIP1などの遺伝子異常によるものが報告されている。しかし、これらの遺伝子異常が神経芽細胞の遊走異常を起こす原因は十分解明されていない。

一方、L1CAMは消化管の神経芽細胞の遊走移動に重要な分子であることは証明されている。HSCRの大腸ではL1CAMの発現が減少している。米田らはCAM-positive神経線維が有意にaganglionic bowelでは減少していることを示した。CAM-FGF signallingがHSCRでは異常をきたしていると考えた。L1CAM異常単独ではHSCRを生じないが、他の遺伝因子や環境因子の複合作用がHSCR発症につながると考えられる。L1CAMは多因子の中の重要な1因子と考えられる。

従来HSCRの責任遺伝子として報告された遺伝子はすべて常染色体上にあり、3:1-4:1といわれる男児優位のHSCRの罹患の原因を説明することができない。Xq28に座位を持つL1CAM遺伝子は男女差を説明するのに都合がよい。Hofstraらは男児HSCR患者を対象にしてL1CAM遺伝子異常をスクリーニングしたが、有意な変

異は同定できなかった。現在までのところ、水頭症を合併しないHSCR単独の症例ではL1CAM異常はみつかっていない。他にX染色体上に重要な遺伝因子が存在する可能性も考えられ、さらなる研究が必要である。

D. まとめ

XLHとHSCRを合併するカナダ人兄弟例、スペイン人2家系でL1CAM遺伝子の変異を同定した。L1CAM異常は多因子遺伝のHSCRの病因の一端を担うことは間違いないが、他の遺伝因子や環境因子との複合作用がHSCR発症に必要と考えられる。

XLHの早期死亡例ではHSCRが認識されずにいる可能性がある。重度神経障害例では早期死亡や難治性便秘としてHSCRが看過されている可能性もあり、XLHでHSCRは注意すべき合併症である。HSCRは男児に有意に多いが、L1CAM遺伝子による修飾が性差の一原因である可能性もあるが、現状では証明されていない。

E. 文献

- 1) Amiel J, Lyonnet S. Hirschsprung disease, associated syndromes, and genetics: a review. *J Med Genet.* 2001 38:729-39.
- 2) Dahme M, Bartsch U, Martini R, Anliker B, Schachner M, Mantei N. Disruption of the mouse L1 gene leads to malformations of the nervous system. *Nat Genet.* 1997 17:346-9.
- 3) Gu SM, Orth U, Zankl M, Schroder J, Gal A. Molecular analysis of the L1CAM gene in patients with X-linked hydrocephalus demonstrates eight novel mutations and suggests non-allelic heterogeneity of the trait. *Am J Med Genet.* 1997 ;71: 336-40.
- 4) Hofstra RM, Elfferich P, Osinga J, Verlind E, Franssen E, Lopez Pison J, de Die-Smulders CE, Stolte-Dijkstra I, Buys CH. Hirschsprung disease and L1CAM: is the disturbed sex ratio caused by L1CAM mutations? *J Med Genet.* 2002 ;39:E11.
- 5) Ikawa H, Kawano H, Takeda Y, Masuyama H, Watanabe K, Endo M, Yokoyama J, Kitajima M, Uyemura K, Kawamura K. Impaired expression of neural cell adhesion molecule L1 in the extrinsic nerve fibers in Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg.* 1997 ;32:542-5.
- 6) Kaplan P. X linked recessive inheritance of agenesis of the corpus callosum. *J Med Genet* 1983;20:122-124.

- 7) Okamoto N, Wada Y, Goto M. Hydrocephalus and Hirschsprung's disease in a patient with a mutation of L1CAM. *Med Genet.* 1997;34:670-1.
- 8) Parisi MA, Kapur RP, Neilson I, Hofstra RM, Holloway LW, Michaelis RC, Leppig KA. Hydrocephalus and intestinal aganglionosis: is L1CAM a modifier gene in Hirschsprung disease? *Am J Med Genet.* 2002 ;108:51-6.
- 9) Rosenthal A, Joust M, Kendrick S. Aberrant splicing of neural cell adhesion molecule L1 mina in a family with X-linked hydrocephalus. *Nature genet.* 1992; 2:107-112.
- 10) Vits L, Chitayat D, Van Camp G, Holden JJ, Fransen E, Willems PJ. Evidence for somatic and germline mosaicism in CRASH syndrome. *Hum Mutat.* 1998;Suppl 1:S284-7.
- 11) Yoneda A, Wang Y, O'Briain DS, Puri P. Cell-adhesion molecules and fibroblast growth factor signalling in Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int.* 2001;17:299-303.

先天性水頭症における脳室拡大の程度が転帰に及ぼす影響 —2000年全国疫学調査結果から—

島根大学医学部 脳神経外科¹ 国立病院大阪医療センター 臨床研究部・脳神経外科²

宮崎 健史¹ 森竹 浩三¹ 永井 秀政¹ 上村 岳士¹ 長廻 紀子¹
赤水真希子¹ 朝山 玲子¹ 山崎 麻美²

研究要旨

脳室拡大の程度と転帰との関係を調べ、さらに脳室拡大の程度がシャント術後成績に及ぼす影響についても検討を行った。対象は、第2次全国先天性水頭症調査(2000年)に回答があった。422例のうち、重複例、不適格例などを除いた374例。胎児期に診断された水頭症(以下、胎児期Hx)と出生直後から生後12ヶ月までに診断された水頭症(以下、乳児期Hx)を区別して評価した。脳室拡大の程度は、調査要項に基づいて、回答した医師の判断により、軽度、中等度、高度の3段階に分類した。転帰についてはA: independent, B: partially dependent, C: totally dependentに分類した。結果は、胎児期Hx、乳児期Hxいずれにおいても、脳室拡大が軽度、中等度間では転帰に有意な差が見られなかったが、中等度、高度の間では後者で不良な転帰が有意に高率に見られた。軽度から中等度の脳室拡大例では、シャント術によって転帰の有意な改善はなかったが、高度の脳室拡大例では、有意に転帰不良例の割合が減少し、転帰の改善にシャント術が有効であることを示した。以上より、少なくとも脳室拡大が軽度の段階では性急にシャント術を施行するべきでなく、経過を見ながら進行した場合にシャントに踏み切るのが妥当ではないかと考えた。高度脳室拡大を認めた場合には早期にシャント術を施行することでその転帰の悪化を軽減できることが示された。診断時の脳室拡大の程度は、有効な予後判定因子となりうると思われた。

A. 研究目的

我が子が先天性水頭症と診断されたとき、まず思うことは治療方法の有無とその転帰であろう。しかしながら、水頭症が様々な原因で、形で、そして程度で生じる一つの病態であるため、先天性水頭症の個々の患児はもちろん、一般的な転帰を予測することは困難で、本研究班においても疾患ごとに検討が勧められてきたところである。有用な転帰予測因子の同定は、医療者側のみならず、先天性水頭症患児をもつ家族にとっても重要な課題にな

ると思われる。先天性水頭症の多くは胎児期において原因疾患を確定する前に、超音波上の脳室拡大所見として比較的早期に発見される。それ故、もしこの脳室拡大の程度から多少とも転帰を推定できれば、その意義は極めて大きいと考えられる。本稿では、脳室拡大の程度と転帰との関係を調べ、さらに脳室拡大の程度がシャント術後成績に及ぼす影響についても検討した。

B. 研究方法

対象は、第2次全国先天性水頭症疫学調査(2000年)

に回答があった422例のうち、重複例、不適格例などを除いた374例である。これまで、胎児期と生後12ヶ月迄に水頭症と診断された症例を合わせたものを先天性水頭症（以下、先天性Hx）と定義し検討を進めてきた。今回は胎児期に診断された水頭症（以下、胎児期Hx）と出生直後から生後12ヶ月までに診断された水頭症（以下、乳児期Hx）を区別し評価した。脳室拡大の程度は、調査要項に基づいて、回答した医師の判断により、軽度、中等度、高度の3段階に分類した。転帰についてはA：independent（正常、わずかな障害のみ）、B：partially dependent（中等度の障害）、C：totally dependent（重度障害）に分類し、評価不能のものや回答の無かったものはn.d.とした（Table 1）。統計学的有意差検定には、 χ^2 乗検定を用い、5%以下を有意とした。

Table 1 転帰判定表

身体障害 障害度	知能障害 IQ (DQ)	85以上 正常	84~75 やや劣る	74~50 劣る 教育訓練可能	49~25 教育困難 訓練可能	24以下 要保護
0 身体障害なし (例えば自由に走る)		A	A	A	B	C
I 日常生活が不自由ながらも できるもの (例えば一人で歩ける)		A	A	A	B	C
II 軽度の障害 制約されながらも有用な 運動ができるもの (障害はあるが歩ける)		A	A	B	B	C
III 中等度の障害 有用な運動がきわめて制 限されているもの (座れるが立てない)		B	B	B	C	C
IV 高度の障害 何ら有用な運動がで きないもの(寝たきり)		C	C	C	C	C

* 身体障害者手帳体幹機能障害度による(浜本らの知能・身体障害評価法を一部改変)

C. 研究結果

胎児期Hxにおいては、診断時の脳室拡大の占める程度が、軽度、中等度、そして高度の順に転帰良好なA群の割合が減少する傾向が見られたが有意ではなかった。一方、高度脳室拡大群で有意に転帰不良なC群の割合が高かった(Fig.1a,b)。乳児期HxではA群の割合は脳室拡大の程度と相関は見られなかったが、C群の割合は高度脳室拡大群で有意に高かった(Fig.2a,b)。先天性Hxでは、脳室拡大が軽度と中等度では転帰に有意な差は見られなかったが、中等度と高度では高度の方が有意にA群の割合が低く、C群の割合は高かった(Fig.3a,b)。

続いて脳室拡大の程度別にシャント施行例と非施行例との間で転帰を比較した。軽度脳室拡大を認めた胎児期Hxでは、シャントの有無で転帰に有意な差は認められ

なかった。また乳児期Hxでもシャントの有無で転帰に差は見られず、先天性Hxでもシャントの有無により転帰に有意な差は見られなかった。中等度脳室拡大を認めた胎児期Hxでは、シャント群でA群の割合が高い傾向が見られたが、転帰に有意な差は見られなかった。一方、乳児期Hxでは非シャント群でA群の割合が有意に高かった(p<0.05)(Fig.4a,b)。非シャント群7例のうち、5例で第3脳室開窓術を施行されていた。先天性Hxとしては、シャントの有無により転帰に有意な差は見られなかった。高度脳室拡大を認めた胎児期Hxでは、シャ

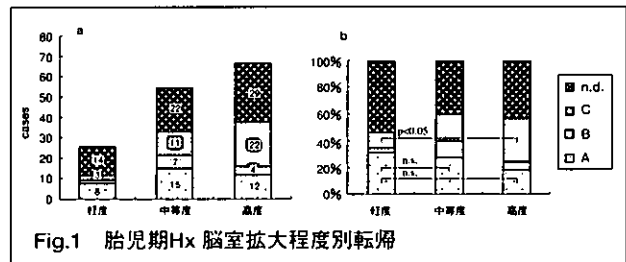


Fig.1 胎児期Hx 脳室拡大程度別転帰

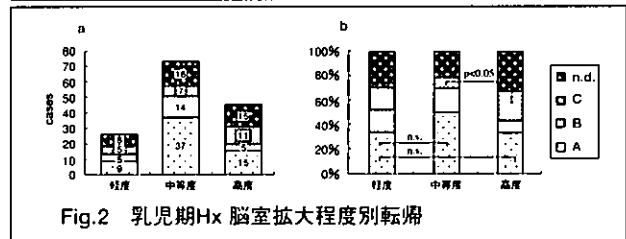


Fig.2 乳児期Hx 脳室拡大程度別転帰

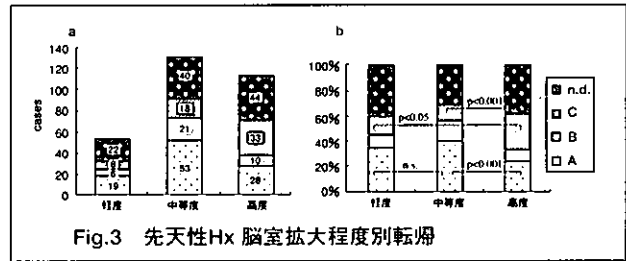


Fig.3 先天性Hx 脳室拡大程度別転帰

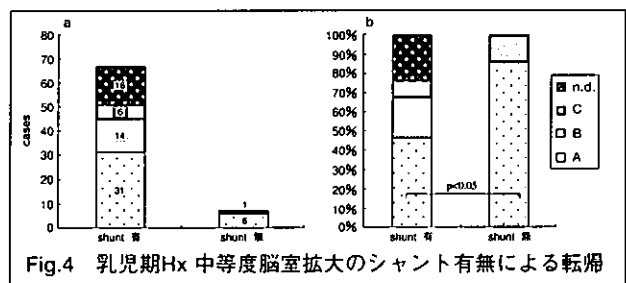


Fig.4 乳児期Hx 中等度脳室拡大のシャント有無による転帰

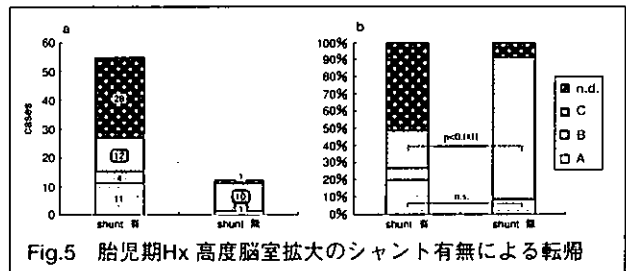


Fig.5 胎児期Hx 高度脳室拡大のシャント有無による転帰

ント群でA群の割合が高い傾向が認められ、さらに非シャント群でC群の割合が有意に高かった ($p < 0.001$) (Fig.5a,b)。乳児期Hxでも同様の傾向がみられたが有意差は無かった。先天性Hxとしてもシャント群でA群の割合が高い傾向が見られ、さらに非シャント群でC群の割合が有意に高かった ($p < 0.001$)。

D. 考察

先天性水頭症を原因別に、診断時の状態から転帰を予測し、それに応じた治療法の選択基準を設けることが本研究の最終目的の一つである。著者らはこれまで、先天性水頭症全国疫学調査票をもとに、水頭症の原因別分類、治療の実態、シャント術が転帰に及ぼす影響、分娩時期が転帰に及ぼす影響などを検討し報告してきた^{1,2)}。今回は脳室拡大の程度がどの程度転帰に影響をおよぼすかを検討した。また、これまで脳室拡大の程度は考慮せずにシャント術の効果を評価してきたが、今回、脳室拡大の程度ごとにシャント術後の臨床転帰を検討することで、脳室拡大の程度がシャント効果や転帰予測因子になりうるかを検討した。その結果、胎児期Hx、乳児期Hxいずれにおいても、脳室拡大が軽度、中等度間では転帰に有意な差が見られなかったが、中等度、高度の間では後者で不良な転帰が有意に高率に見られた。また、軽度から中等度の脳室拡大例では、シャント術によって転帰の有意な改善はなかったが、高度の脳室拡大例では、有意に転帰不良例の割合が減少し、転帰の改善にシャント術が有効であることを示唆した。Choudhury³⁾は小児水頭症の脳室拡大をCT上のventricular/biparietal比でmild (0.26-0.40)、moderate (0.41-0.60)、severe (0.61-0.90)、extreme (0.91-1.0)と4段階に分類しその転帰を比較しているが、正常発達したものの割合は、mild群では90%、moderate群ではシャント術を施行したもので71%、sever群でシャントを施行したもので64%であったが、extreme群ではシャントを施行しても19%にとどまっていたと報告し、脳室拡大の程度により転帰を予測できる可能性を示唆している。本調査では脳室拡大の程度が各医師の主観にゆだねられている点で問題を残すが、374例中64例でlateral ventricular width/hemispheric width (LVW/HW)比の記載があり、軽度と判断された群では平均0.52、中等度と判断された群では平均0.54、高度と判断された群では平均0.66となっており、脳室拡大が軽

度、中等度、そして高度の順に高値をとっていた。この点も考慮すると、ある程度主観的に判定した診断時の脳室拡大の程度も転帰予測因子となりうると考えられた。また、今回の検討において、診断時に軽度から中等度の脳室拡大を認めた場合、シャントにより転帰が改善する傾向が見られたが、統計学的に有意で無かった。さきに述べたように主観的に診断された脳室拡大が軽度と中等度との間でLVW/HWが近接している可能性があるため、断定的なことは言えないが、少なくとも脳室拡大が軽度の段階では性急にシャント術を施行するべきでなく、経過を見ながら進行した場合にシャントに踏み切るのが妥当ではないかと考えた。特に胎児期診断例においては、これまでの我々の主張してきたように十分な肺成熟を待った上で分娩させ、出生後に時期をみてシャント術を施行すべきと考える。これに対し、高度脳室拡大を認めた場合には早期にシャント術を施行することでその転帰の悪化を軽減できることが示された。すなわち、診断時に高度脳室拡大を認めた場合、あるいは明らかな脳室拡大の進行を認めた場合には、その転帰は不良となる可能性が高いが、可及的速やかにシャント術を施行することによって転帰の悪化を多少とも防ぐことができると思われた。また、中等度の脳室拡大を認めるもシャント術が施行されなかった群で有意に転帰が良好であったのは、そのほとんどが第3脳室開窓術を施行された症例であった。近年、第3脳室開窓術の有効性が数多く報告⁴⁾されており、先天性水頭症においてもスタンダードな治療法となりうる可能性が高いと考えられた。

今回の検討を踏まえた上で、今後の課題として具体的な脳室拡大の程度の数値化を行った上での評価も必要と考える。また、今回の検討においては転帰判定がn.d. (判定不能、無回答)例が多く含まれており、先天性水頭症患児の転帰判定の難しさが現れていた。従って今後は少なくとも幼児、小児期などまでの一定期間の経過観察を経た上で転帰判定された症例について検討する必要があると思われた。これらの結果を踏まえつつ、各原疾患に特徴的な転帰予測因子を加えて行くことが重要と思われる。

D. 結論

診断時の脳室拡大の程度は、有用な転帰判定因子となりうる。診断時に高度脳室拡大を認めた場合、シャント術により転帰悪化を軽減しうる。

F. 文献

- 1) 上村岳士、森竹浩三、中山登志子、他：先天性水頭症全国疫学調査－出生時期と手術時期による臨床像の比較－。厚生科学研究費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13年度研究報告書 38-43, 2002.
- 2) 森竹浩三、上村岳士、宮崎健史、他：臨床転帰からみた胎児水頭症の分娩・手術時期－全国疫学調査結果から－。厚生労働科学研究費補助金特定疾患対策研究事業 先天性水頭症調査研究班平成14年度分担研究報告書 85-89,2003.
- 3) Choudhury AR: Infantile hydrocephalus: management using CT assessment. Child's Nerve Syst 11: 220-226, 1995.
- 4) Cinalli G, Sainte-Rose C, Chumas P, Zerah M, Brunelle F, Lot G, Pierre-Kahn A, Renier D: Failure of third ventriculostomy in the treatment of aqueductal stenosis in children. J Neurosurg. 90: 448-454, 1999.