

LETTERS

vector-transfected cells, the cells transfected with mutations associated with JME had unhealthy morphology 48 h after transfection, implying that the mutations did not disrupt EFHC1 function completely. We also analyzed the effects of EFHC1 isoforms on cell survival. Transfection with a construct expressing transcript B resulted in moderate cell death, and coexpression of the wild-type transcript and transcript B had intermediate effects (Fig. 3i). The cellular functions of the protein encoded by transcript B are not known, but the fact that this isoform excludes the mutation 757G→T from its open reading frame suggests that this isoform may not have a large role in the pathogenesis of JME.

Because EFHC1 contains a Ca²⁺-sensing EF-hand motif and because abnormalities of voltage-dependent Ca²⁺ channels (VDCCs) have been described in human and mouse epilepsies^{12–16}, we investigated whether the observed cell death is due to modulations of VDCCs. RT-PCR showed that most of the VDCC subtypes were expressed in mouse primary culture neurons, albeit at varied levels (Fig. 3j). Treatments of EFHC1-transfected primary culture neurons with several antagonists of VDCC subtypes indicated that SNX-482, antagonist for Ca_v2.3 (ref. 17), specifically increased the survival rates of EFHC1-positive neurons (Fig. 3k and Supplementary Fig. 3 online).

Immunohistochemical analyses (Fig. 4a–k) showed that Efhc1 protein was widely expressed in adult mouse brain including hippocampus (Fig. 4a,c), cerebellum (Fig. 4f), cerebral cortex (Fig. 4i), thalamus, hypothalamus, amygdala and upper brainstem (data not shown) and largely overlapped with signals for Ca_v2.3 (ref. 18; Fig. 4b,d,e,g,h,j,k). Double staining of hippocampal primary culture neurons with antibodies to EFHC1 and to Ca_v2.3 showed signals at soma and dendrites (Fig. 4l–n).

Patch-clamp analyses of baby hamster kidney (BHK) cells stably expressing Ca_v2.3 and transiently transfected with EFHC1 showed that EFHC1 substantially increased the R-type Ca²⁺ current generated by Ca_v2.3 (Fig. 5). Cotransfection with constructs expressing P/Q-type VDCC (Ca_v2.1) and EFHC1 did not increase Ca²⁺ currents (data not shown). The effects of EFHC1 on Ca_v2.3 were extensive and unique, even when compared with the effects of the auxiliary subunits of the Ca²⁺ channels^{16,19}. These results suggest that EFHC1 enhances Ca²⁺ influx through Ca_v2.3 and stimulates programmed cell death. Mutations associated with JME partly reversed the increase in R-type Ca²⁺ currents by EFHC1 (Fig. 5b,c). Incomplete reversal of EFHC1-induced Ca²⁺ influx through Ca_v2.3 may be responsible for the precarious state of calcium homeostasis sensitive to the triggering effects of sleep deprivation, fatigue and

alcohol in individuals with JME. The three coding polymorphisms had weaker or no reversal effects (Fig. 5b,c), implying that they could be functionally benign or less malignant. Transfection with the transcript B isoform moderately increased Ca²⁺ current (Fig. 5b,c). These results are consistent with those of the cell-death analyses (Fig. 3h,i).

VDCCs are often regulated by proteins that interact with the intracellular C termini of VDCCs²⁰. We therefore carried out coimmunoprecipitation assays with C-terminal fragments of P/Q-type (Ca_v2.1),

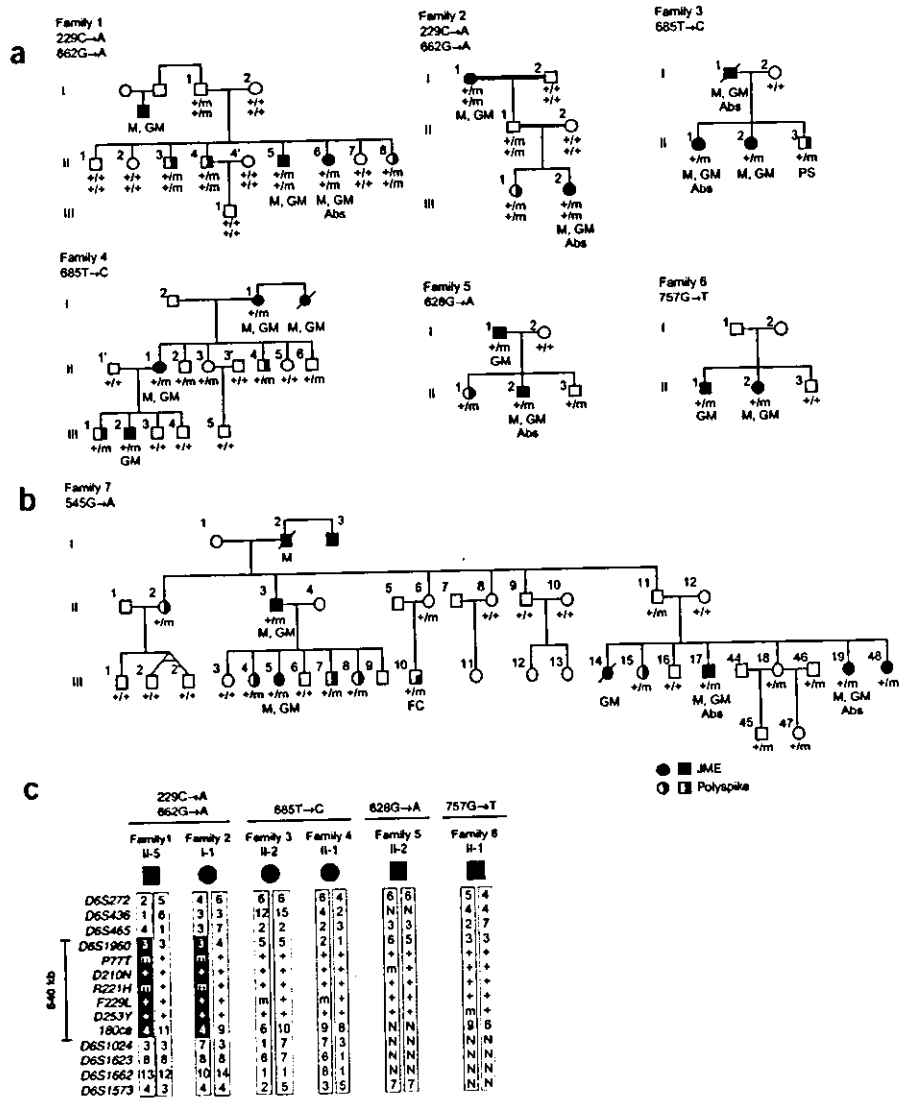


Figure 2 EFHC1 mutations segregating with epilepsy traits in families with JME. (a) One double heterozygous (229C→A and 662G→A) and three heterozygous (685T→C, 628G→A, 757G→T) missense mutations cosegregated with disease symptoms in 13 individuals with epilepsy and 8 individuals with polyspike wave in six Mexican families with JME. +, wild-type allele; m, mutated allele. Filled symbols indicate individuals with JME (M, myoclonic; GM, grand-mal tonic-clonic; Abs, absence seizures; PS, photosensitivity of polyspike wave complexes); half-filled symbols indicate clinically asymptomatic family members with 3.5- to 6-Hz multispikes and slow wave complexes. (b) The 545G→A variant segregates with JME in affected members of a large family from Belize⁴ (family 7). One-quarter-filled symbol indicates an individual with febrile convulsion (FC). (c) Haplotypes of families with JME surrounding the EFHC1 locus. Haplotype analysis detected identical a 640-kb series of alleles surrounding the double heterozygous mutations in apparently unrelated families 1 and 2, suggestive of a founder effect. No common alleles surrounding the mutations were found in families 3, 4, 5 and 6, suggesting that the identical mutations found in families 3 and 4 were generated by recurrent mutational events. m, mutated allele; +, wild-type allele; N, not done.

N-type ($Ca_v2.2$) and R-type ($Ca_v2.3$) VDCCs. Myc-tagged EFHC1 coprecipitated with the FLAG-tagged C terminus of $Ca_v2.3$ but not with $Ca_v2.1$ or $Ca_v2.2$ (Fig. 6a,b). Reciprocal coimmunoprecipitation of FLAG-tagged EFHC1 and Myc-tagged $Ca_v2.3$ C terminus also yielded positive results (Fig. 6c,d). Deletion analyses of EFHC1 indicated that $Ca_v2.3$ bound to the EFHC1 N terminus (amino acids 1–359), which was composed of DM10(1) and DM10(2) and contained all the mutations associated with JME (Fig. 6c,d). All EFHC1 mutant proteins bound to the $Ca_v2.3$ C terminus (Supplementary Fig. 3 online).

How do mutations in EFHC1 cause JME? By compromising the apoptotic activity of EFHC1 through $Ca_v2.3$, they may prevent elimination of unwanted neurons during development of the cen-

tral nervous system, lead to increased density of neurons with precarious calcium homeostases and produce hyperexcitable circuits. In fact, increased densities and dystopia of neurons have been observed in the brains of individuals with JME^{21,22}. Although no seizure phenotype has been described in mice lacking $Ca_v2.3$ (ref. 23), they may have undetected minor seizure sensitivities or brain microdysgeneses. Species differences may also be a factor. Furthermore, EFHC1 protein does not bind to $Ca_v2.3$ only, but also interacts with additional number of proteins (data not shown) that may modify the JME phenotype.

We identified mutations in EFHC1 in only 6 of 44 families with JME. Unidentified mutations may exist in intronic or regulatory regions of EFHC1, as was observed for Unverricht-Lundborg progressive

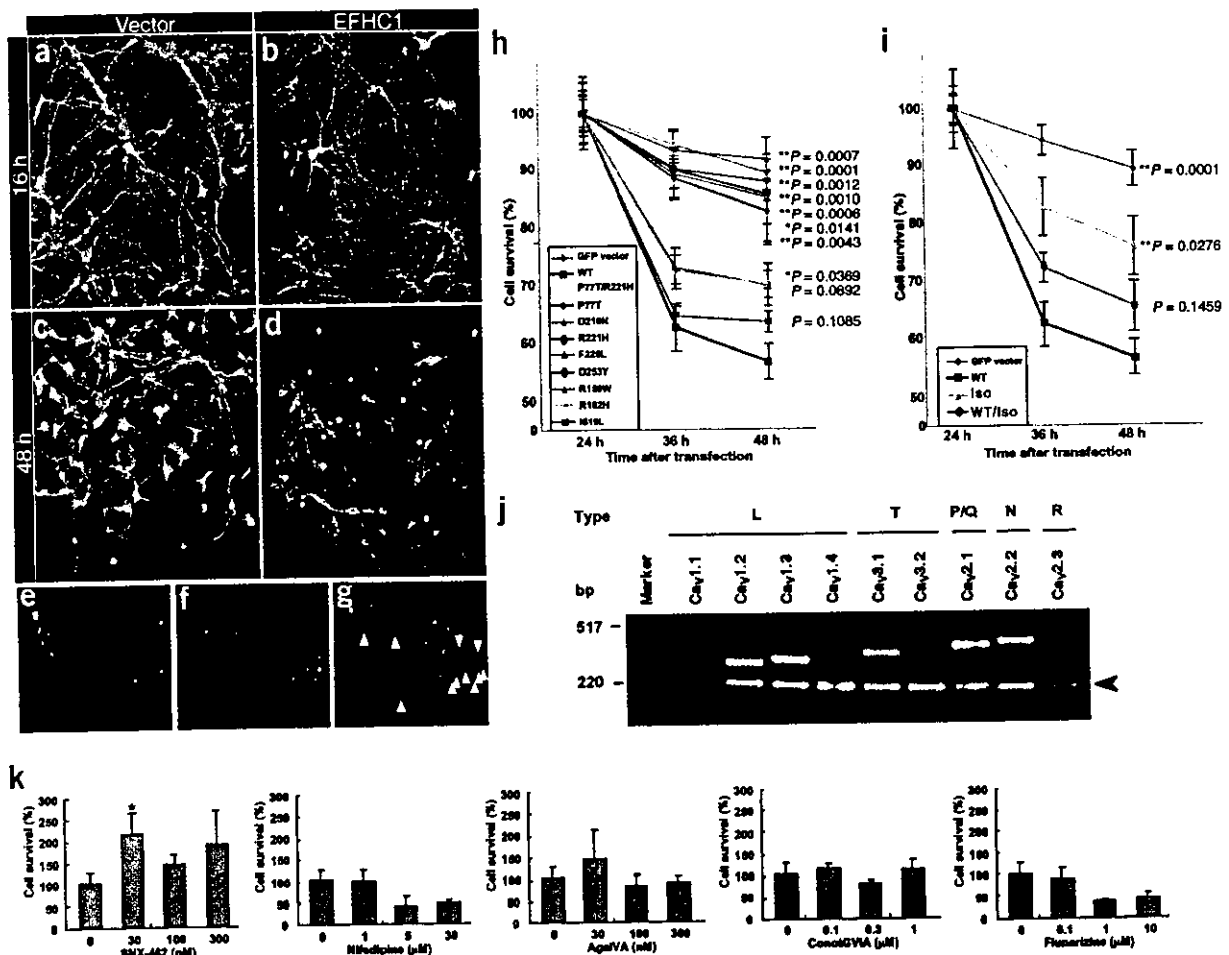


Figure 3 Activation of R-type VDCC ($Ca_v2.3$)-dependent apoptosis by EFHC1 and its reversal by mutations associated with JME. Hippocampal primary culture neurons were transiently transfected with expression constructs encoding GFP-EFHC1 (b,d) or with control vector encoding GFP only (a,c). The hippocampal neurons were stained with antibody to MAP2 (a–d). Cells transfected with EFHC1 had shorter neurites and fewer branches 16 h after transfection (b) and neurodegenerative morphologies, including shrinkage of the cell body and fragmentation of processes, 48 h after transfection (d). (e–g) TUNEL assay of hippocampal primary culture neurons transfected with a construct encoding Myc-EFHC1. (e) Staining with antibody to Myc. (f) TUNEL-positive cells. (g) Overlap of e, f and Hoechst staining of nuclear chromatin. Most of the cells transfected with EFHC1 overlap with TUNEL-positive cells (arrows). (h,i) Graphs of GFP-positive, surviving cell numbers 24, 36 and 48 h after transfection with constructs expressing EFHC1. Data shown are mean \pm s.e.m. from seven culture wells (t -test in comparison with wild-type EFHC1). (h) Mutations associated with JME (P77T/R221H, P77T, D210N, R221H, F229L, D253Y) significantly reversed the cell-death effect of EFHC1 at 36 and 48 h after transfection, whereas the polymorphisms that occurred both in individuals affected with JME and in controls (R159W, R182H, I619L) largely maintained the cell-death effects. (i) GFP fusion constructs of transcript A (WT), transcript B (Iso) or GFP vector were transfected into neuron cells. Single transfection of transcript B had a moderate cell-death effect, whereas transfection with both wild-type and transcript B (half amount of DNA for each) had an intermediate effect. (j) Expression levels of Ca^{2+} channel α -subunits in mouse primary hippocampal neurons investigated by RT-PCR. Neuron-specific enolase was coamplified as a control (arrowhead). (k) Effects of VDCC antagonists on hippocampal primary culture neurons transfected with EFHC1. The surviving cell numbers 48 h after transfections are expressed as percentage; 100% at no antagonists. Data shown are mean \pm s.e.m. ($n = 4$; control, $n = 8$). * $P < 0.05$ versus control (no antagonist; t -test). The results of control experiments with EGFP vectors are shown in Supplementary Figure 3 online.

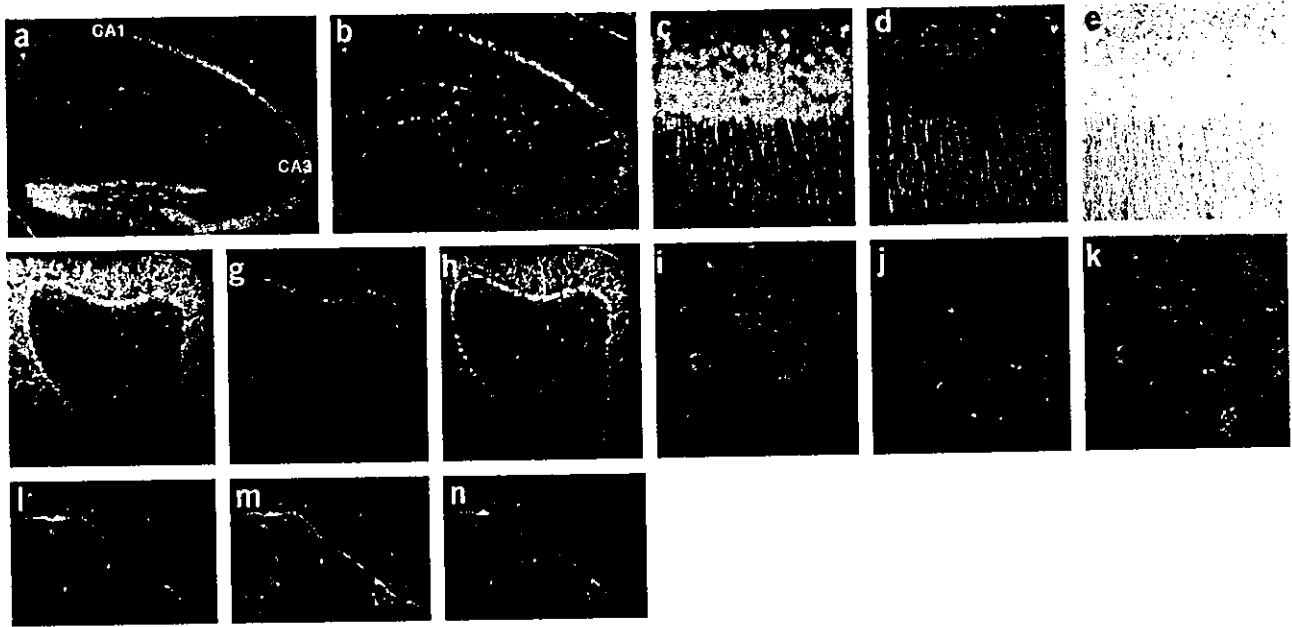


Figure 4 Colocalization of Efhc1 and Ca_v2.3. (a–k) Sections of adult mouse brain were double-stained with antiserum to EFHC1 visualized with Alexa Fluor 488 (a,c,f,i) and with antibody to Ca_v2.3 visualized with Alexa Fluor 594 (b,d,g,j). (e,h,k) Merged images. (a,b) Hippocampus. (c–e) Hippocampal CA1 region. (f–h) Cerebellum. (i–k) Cerebral cortex. (l–n) Hippocampal primary culture neurons (6 d *in vitro*) from E16 mouse embryos were double-stained with antibodies to Efhc1 (green; l) and to Ca_v2.3 (red; m). Signals were merged in n.

myoclonus epilepsy^{24,25}. We searched extensively for mutations in ~100 bp of each exon-intron boundary and ~650 bp of the 5' untranslated region of *EFHC1* in all the families with JME. Several individuals carried SNPs, but none showed significant association with the disease phenotype. The SNPs in the 5' untranslated region also did not affect the *EFHC1* promoter activity (data not shown). Further searches for mutations in expanded regions are warranted. And other genes in or outside the chromosome 6p region might be mutated in JME in some of the remaining 38 families. Common haplotypes at 6p12 in affected members of small families with JME could have occurred by chance and might not necessarily be associated with *EFHC1* mutation in all cases.

In summary, segregation of *EFHC1* mutations in individuals affected with epilepsy or polyspike wave in families with JME, together with reversal of the *EFHC1*-induced neuronal cell death and *EFHC1*-dependent increase of R-type Ca²⁺ current by mutations associated with JME, indicate that *EFHC1* is the gene on 6p12 associated with JME. Most genes incriminated as the cause of idiopathic generalized epilepsy encode ion channels. The identification of a gene that encodes a non-ion channel protein containing an EF-hand motif, which modulates and interacts with R-type VDCC and has apoptotic activity, brings a new viewpoint to the molecular pathology of idiopathic epilepsy.

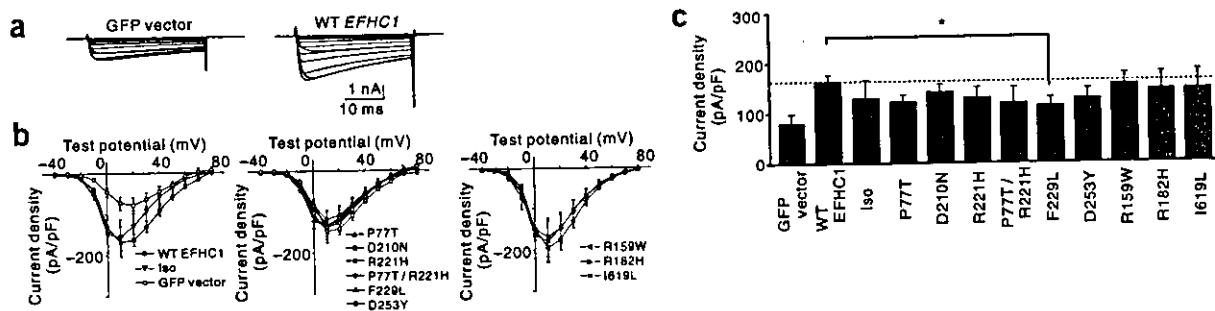


Figure 5 Potentiation of R-type VDCC (Ca_v2.3) activity by wild-type and its reversal by mutant EFHC1. (a) Ca²⁺ currents of recombinant Ca_v2.3 evoked in BHK cells transiently transfected with control GFP vector or wild-type (WT) *EFHC1* cDNA. Test depolarizing pulses were from -40 to 80 mV for 30 ms. Holding potential was -110 mV. (b) Current-voltage relationships of recombinant Ca_v2.3 in BHK cells transfected with GFP vector (open circles), wild-type (WT) *EFHC1* (filled circles), transcript B (Iso; open downward arrowheads) and *EFHC1* mutants P77T (filled triangles), D210N (open squares), R221H (filled squares), P77T and R221H (filled diamonds), F229L (open triangles), D253Y (open diamonds), R159W (open left arrowheads), R182H (filled right arrowheads), I169L (asterisks). Wild-type and mutant *EFHC1* significantly upregulated R-type (Ca_v2.3) Ca²⁺ currents. (c) Ca²⁺ current densities evoked at 20mV in BHK cells coexpressing Ca_v2.3 in combination with *EFHC1* constructs. The mutations associated with JME partly reversed the R-type current-increasing effect of *EFHC1*. The mutation F229L significantly suppressed the potentiation effect of *EFHC1* (**P* < 0.05). The modulation of activation and inactivation properties of Ca_v2.3 by *EFHC1* mutants is described in **Supplementary Table 1** online.

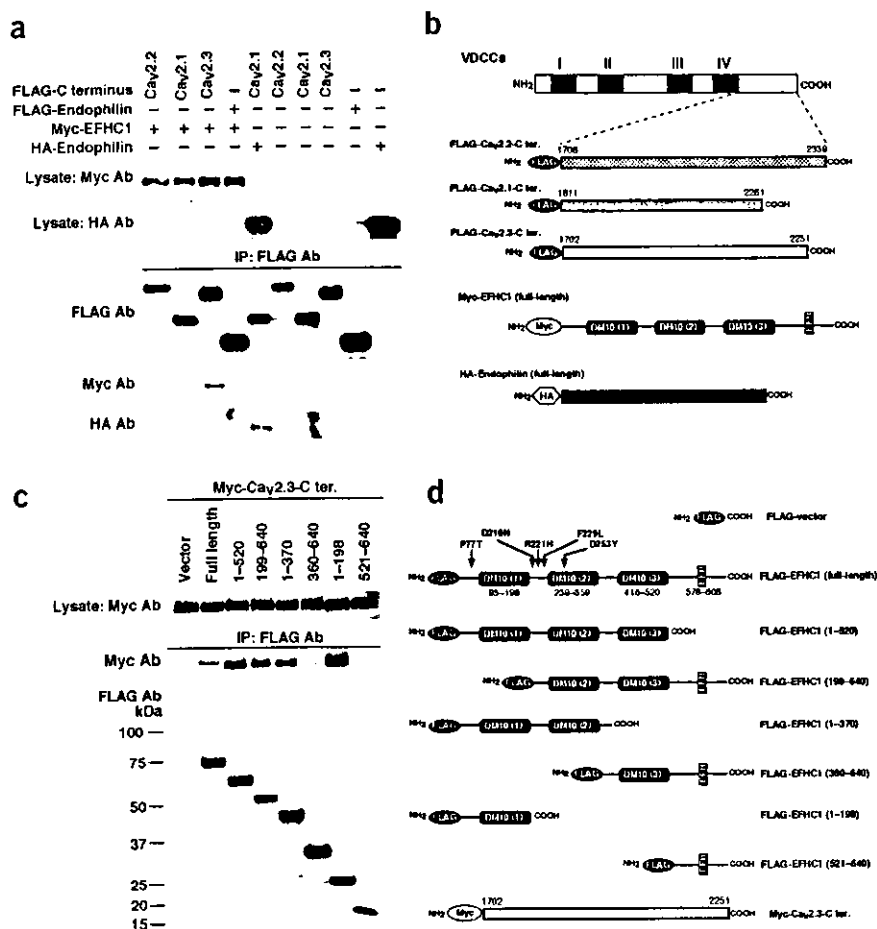


Figure 6 Immunoprecipitation assays of EFHC1 and VDCCs. (a) FLAG-tagged C termini of VDCCs, or FLAG-tagged endophilin, and Myc-tagged EFHC1 or hemagglutinin (HA)-tagged endophilin were coexpressed in HEK cells, and cell lysates were immunoprecipitated by antibody to FLAG. Cell lysates or immunoprecipitants were separated by electrophoresis and blotted on membranes and probed with antibodies to FLAG, to Myc or to hemagglutinin. The C termini of Ca_v2.3 coimmunoprecipitated with EFHC1, whereas those of Ca_v2.1 and Ca_v2.2 did not. Hemagglutinin-tagged endophilin bound to Ca_v2.1 C termini as reported previously²⁹, but FLAG-tagged endophilin did not coprecipitate with Myc-tagged EFHC1. Approximate molecular weights for EFHC1, Ca_v2.1, Ca_v2.2 and Ca_v2.3 C termini are 74 kDa, 52 kDa, 69 kDa and 62 kDa, respectively. (b,d) Structures of tagged proteins used for immunoprecipitation assays. The C termini of Ca_v2.1, Ca_v2.2, Ca_v2.3 were amplified by PCR and tagged with FLAG or Myc at their N termini. (c) The assay of EFHC1 truncated proteins and C termini of Ca_v2.3. Ca_v2.3 seems to bind to the N terminus (amino acids 1–359) of EFHC1. Ab, antibody; IP, immunoprecipitation.

METHODS

Families and affected individuals. We analyzed 44 families with JME (31 Mexican families⁵, 1 family from Belize and 12 European American families^{3,4}). Each participating subject or responsible adult signed an informed consent form as approved by the Human Subject Protection Committee at the University of California Los Angeles School of Medicine or by the participating institutions. Criteria for inclusion of probands are as follows: (i) myoclonic seizures starting at 10–20 years of age, usually on awakening, involving shoulders, arms and other parts of the limbs (not associated with loss of consciousness); (ii) tonic-clonic or clonic tonic-clonic convulsions, usually appearing 1–2 years or, rarely, 5–10 years after the start of myoclonic seizures; (iii) normal results of neurological examination, including mental status and intelligence; and (iv) diffuse synchronous and symmetrical 3.5- to 6-Hz polyspike-wave complexes in the interictal electroencephalogram. We considered individuals with abnormal spike or polyspike wave complexes in the electroencephalogram to be affected even if they were free of seizures. The 382 unrelated healthy controls included 252 Mexicans, 96 Japanese and 34 European Americans. We extracted genomic DNA from peripheral venous blood by using QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen).

Construction of physical and transcriptional map. We constructed the physical map as described previously²⁶. We used BAC and PAC sequences to search for genes registered in the National Center for Biotechnology Information BLAST database.

Domain search. We carried out a domain search in the EFHC1 amino acid sequence using the InterPro, Pfam and SMART databases.

Northern-blot analysis. We purchased Multiple Tissue Northern (MTN) blots (Clontech) for human, human brain, adult mouse and mouse whole embryo (E7–E17). We also prepared a blot using 4 µg of mouse E17 and adult

whole-brain poly(A)⁺ RNA. As probes, we amplified *EFHC1* or *Efhc1* cDNAs by PCR using human or mouse brain cDNA. We radioactively labeled the PCR products with ³²P using the High Prime DNA labeling kit (Roche). We hybridized membranes overnight in ExpressHyb hybridization solution (Clontech) and washed them in 0.1% saline sodium citrate and 0.1% SDS at 50 °C for 40 min. We exposed the filters to X-ray film at –80 °C overnight. We used new blots for all hybridizations.

cDNA library screening. We screened human adult brain, adult pancreas and fetal brain cDNA libraries constructed in the Lambda ZAP II vector (Stratagene) using a PCR product (probe 3; see Fig. 1b) as a probe according to the manufacturer's recommendations.

Generation of antibody to EFHC1. We used a synthetic peptide corresponding to amino acid residues 522–533 (QYSPEALASIQN) of human EFHC1, whose sequence is identical to that of mouse *Efhc1*, for immunization. We coupled the peptide, with one cysteine residue added at the N terminus, to keyhole limpet hemocyanin, mixed it with Freund's complete adjuvant in phosphate-buffered saline (PBS) and injected it into two rabbits at a dose of 1 mg protein per injection. Rabbits were boosted with peptide sequence mixed with incomplete adjuvant in PBS at 3 and 6 weeks after the first injection and bled at 8 weeks.

Primary culture of mouse hippocampal neurons. We isolated hippocampal neurons from E16 mouse embryos, plated them at 1–2 × 10⁵ cells per well in 24-well plate containing glass coverslips coated with poly-L-lysine and grew them in serum-free NEUROBASAL medium supplemented with B27 and 0.5 mM L-glutamine (Invitrogen).

Immunocytochemistry. We fixed hippocampal primary culture neurons (6 days *in vitro*) from E16 mouse embryos with 4% paraformaldehyde in PBS

LETTERS

for 15 min and permeabilized them with 0.1% Triton X-100 in PBS for 5 min. We incubated the cells with blocking solution (3% normal goat serum in PBS) for 30 min and then with primary antibody in blocking solution (antibody to EFHC1 at 1:1,000 dilution; antibody to MAP-2 at 1:500 dilution (Sigma); or antibody to phosphorylated neurofilament SMI310 at 1:200 dilution (from Sternberger Monoclonals)) for 1 h at room temperature. After thoroughly washing them with PBS, we allowed the cells to react with secondary antibody (chicken antibody to rabbit IgG conjugated to Alexa Fluor 488 and donkey antibody to mouse IgG conjugated to Alexa Fluor 594; Molecular Probes) diluted at 1:1,000 for 1 h at room temperature, washed them three times in PBS and observed fluorescence with TCS SP2 microscope (Leica).

Colorimetric immunohistochemistry. We anesthetized adult ICR mice and transcardially perfused them with 4% paraformaldehyde in phosphate buffer (pH 7.4). We dissected out the brains, postfixed them for an additional 3 h at 4°C and cryoprotected them with 30% sucrose in buffer (pH 7.4). We cut 40- μ m floating sections using a cryostat (Leica 1900), washed them in 0.1M PBS and immersed them in 10% normal goat serum in PBS with 0.3% Triton (PBST) for 10 min. We incubated even-numbered sections overnight in a solution of primary antibody (1:2,000 dilution for antibody to EFHC1; 1:2,000 dilution for preimmune serum; or 1:2,000 dilution for antibody to EFHC1 with 50 μ g ml⁻¹ EFHC1 peptide QYSPEALASIQN) diluted in 10% normal goat serum in PBST at 4°C. After serial washes in PBST, we incubated the sections for 3 h at 40°C with the secondary antibody, biotinylated goat antibody to rabbit IgG. We then allowed the sections to react with ABC reagent (Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories) for 1 h at room temperature. We washed sections in Tris buffer (pH 7.2) and allowed them to react with 0.02% DAB (Dowjindo) with 0.01% H₂O₂ for 20 min at room temperature. After washing them with Tris buffer and PBS, we mounted the sections on glass, dehydrated them, cleared them in xylene and placed them on coverslips.

RT-PCR. We extracted total RNA from whole brain and hippocampal primary culture neuronal cells of adult ICR mice using TRIZOL Reagent (Invitrogen) and obtained first-strand cDNA from 2 μ g of total RNA using ThermoScript RNA H⁻ Reverse Transcriptase (Invitrogen). To amplify mouse cDNAs, we designed primers in exon 1 and exon 11 (bp 13–2,037) for *Efhc1* and for the genes encoding the Ca²⁺ channels Ca_v1.1, Ca_v1.2, Ca_v1.3, Ca_v1.4, Ca_v3.1, Ca_v3.2, Ca_v2.1, Ca_v2.2 and Ca_v2.3. We used neuron-specific enolase cDNA primers as controls. Primer sequences are available on request.

Mutation analysis. We screened for mutations as described previously²⁷. We designed PCR primers to amplify all 11 exons of *EFHC1*, amplified genomic DNA by PCR using the Pwo DNA Polymerase (Roche) and analyzed it by heteroduplex analysis using WAVE (Transgenomic) and direct-sequencing using ABI auto-sequencer type 3700 (PE Applied Biosystems). Primer sequences are available on request.

Expression constructs and mutagenesis. We amplified the complete open reading frame of *EFHC1* (transcript A) from human adult brain cDNA (Clontech) by PCR using *Pyrobest* (TaKaRa) and cloned it into pEGFPC2 (Clontech), pcDNA3-MycN (Invitrogen) or pcDNA3-FlagN (Invitrogen) vectors. We also amplified the sequence encoding transcript B from human adult brain cDNA by PCR and cloned it into pEGFPC2. We fused the GFP, Myc or FLAG tag sequences at the N terminus of EFHC1. We introduced mutations by using the Quick Change site-directed mutagenesis kit (Stratagene) and confirmed the nucleotide changes as well as the integrity of the full sequences by DNA sequencing.

Transfection and immunostaining of mouse hippocampal neurons. On day 4, we transfected mouse hippocampal neurons with constructs encoding wild-type and mutant EFHC1 proteins using LIPOFECTAMINE2000 (Invitrogen). We fixed cultures with 4% paraformaldehyde in PBS 16 and 48 h after transfection, permeabilized them with 0.3% Triton X-100, blocked them in 3% normal goat serum in PBS and treated them with mouse monoclonal antibody to MAP-2 (1:500; Sigma) and goat antibody to mouse IgG conjugated with Alexa Fluor 594 (1:1,000; Molecular Probes).

TUNEL assay. We transfected neurons with a construct encoding wild-type EFHC1 (pcDNA-MycN-EFHC1-WT) on day 4 using LIPOFECTAMINE2000 and detected neuronal apoptosis 48 h later using the DeadEnd Fluorometric TUNEL System (Promega). We visualized nuclei with Hoescht 33342 (Molecular Probes). We also stained the cells with antibody to Myc (1:200; Cell Signaling) and goat antibody to rabbit IgG conjugated to Alexa Fluor 594 (1:1,000). All experiments were carried out in duplicate wells and repeated at least three times. We observed neurons using a confocal microscope (Olympus Fluoview) 48 h after transfection.

Cell-death analyses with EFHC1 mutants. We transfected hippocampal primary culture neurons with constructs expressing GFP-tagged wild-type EFHC1, EFHC1 carrying mutations associated with JME EFHC1 carrying polymorphisms or EFHC1 transcript B or with GFP vector alone on day 4 using LIPOFECTAMINE2000. We counted surviving cells as GFP-positive cells that attached to dishes. At each counting, we carefully removed detached (dead) cells by changing the culture medium. We did not consider cell morphology (shape, length and number of neurites, shrinkage, etc.) in the counting. We counted surviving cells 24, 36 and 48 h after transfection. We repeated the analyses twice using two independently prepared expression constructs. We counted neurons in seven wells of 24-well plates for each transfection and time point. Experiments were done in a blinded fashion.

Cell-death analyses with VDCC inhibitors. We transfected mouse hippocampal primary culture neurons with pEGFP-EFHC1 construct on day 6 *in vitro* with antagonists and fixed them 48 h after transfection. We added Ca²⁺ channel inhibitors, ω -Agatoxin IVA (Peptide Institute) for P/Q-type (Ca_v2.1), ω -Conotoxin GVIA (Peptide Institute) for N-type (Ca_v2.2), SNX-482 (Peptide Institute) for R-type (Ca_v2.3), flunarizine (Nacalai Tesque) for T-type and nifedipine (Sigma) for L-type VDCCs, directly to neuronal cultures 3 h after transfection.

Fluorescence immunohistochemistry. We perfused and fixed adult ICR mice as described above. We transferred the brain samples to molds containing Tissue-Tek OCT medium and froze them with CO₂ air. We prepared floating frozen sections (20 μ m) by cryostat. We rinsed sections in PBS, blocked them with 5% fetal bovine serum in PBS with 0.3% Triton X-100 for 1 h at room temperature and then incubated them for 72 h at 4°C with the rabbit polyclonal antibody to EFHC1 diluted at 1:3,000 and then with goat polyclonal antibody to α IE (Ca_v2.3, C-20; Santa Cruz Biotechnology) diluted at 1:10. We incubated the sections with the secondary antibodies (chicken antibody to rabbit IgG conjugated to Alexa Fluor 488 and donkey antibody to goat IgG conjugated to Alexa Fluor 564; Molecular Probes) diluted at 1:300 for 1 h at room temperature. Images were acquired under a TCS SP2 microscope (Leica).

Electrophysiological analysis. We cultured a BHK cell line (BII-104-2) stably transfected with the α_{1E} (BII), $\alpha_{2\delta}$ and β_{1A} subunits²⁸ in Dulbecco's modified Eagle medium containing 10% fetal bovine serum, 30 U ml⁻¹ penicillin and 30 mg ml⁻¹ streptomycin. To transiently express wild-type or mutant EFHC1, we transfected BHK (BII-104-2) cells with the pEGFP-C2 plasmids (Clontech) containing enhanced GFP (EGFP) fused with cDNA encoding wild-type or mutant EFHC1 using SuperFect Transfection Reagent (Qiagen). For control experiments, we transiently expressed EGFP by transfecting BHK (BII-104-2) cells with the same amount of pEGFP without the EFHC1 inserts. We treated cells with trypsin, diluted them into Dulbecco's modified Eagle medium and plated them onto glass coverslips 18 h after transfection. We recorded Ca²⁺ currents 24–48 h after transfection from GFP-positive cells. We recorded currents from BHK (BII-104-2) cells at room temperature (22–25°C) using patch-clamp techniques of whole-cell mode with an EPC-9 amplifier (HEKA, Germany). We made patch pipettes from borosilicate glass capillaries (1.5 mm outer diameter and 0.87 mm inner diameter; Hilgenberg) by using a model P-97 Flaming-Brown micropipette puller (Sutter Instrument). Pipette resistance ranged from 2 to 3 MW when filled with the pipette solutions described below. The series resistance was electronically compensated to >70%, and both the leakage and the remaining capacitance were subtracted by $-P/6$ method. We sampled currents at 100 kHz in activation kinetics, and otherwise sampled them at 50 kHz and filtered them at 10 kHz. We recorded Ca²⁺ currents in an external solution that contained 3 mM CaCl₂,

148 mM tetraethylammonium chloride, 10 mM glucose and 10 mM HEPES buffer (pH adjusted to 7.4 with Tris-OH). The pipette solution contained 85 mM Cs-aspartate, 40 mM CsCl, 4 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 2 mM ATP2Na, 5 mM HEPES buffer and 8 mM creatine-phosphate (pH adjusted to 7.4 with CsOH). To determine the voltage dependence of activation, we normalized the amplitude of tail currents at -50 mV after 5-ms test pulse (-40 to 90 mV) to the maximal tail current amplitude. To determine the voltage dependence of inactivation, we normalized the amplitude of currents elicited by the 20-ms test pulse to 30 mV after 10 ms of repolarization to -110 mV following 2 s of displacement of holding potentials (-110 mV to 20 mV) to the current amplitude elicited by the test pulse after the 2-s holding potential displacement to -110 mV. All values are given as mean \pm s.e. Statistical comparison was done by Student's *t*-test. The experiments were done in a blinded fashion.

Immunoprecipitation. We collected HEK cells 20 h after transfection with EFHC1 expression constructs. We washed the cells in PBS, scraped them and homogenized them in the lysis buffer (10 mM Tris (pH 8.0), 150 mM NaCl and 5 mM EDTA) supplemented with protease inhibitors (Complete; Roche). We removed cellular debris by centrifugation at 12,000g for 10 min at 4 °C. We pre-cleared the supernatants with protein G-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) for 2 h at 4 °C and then incubated them with monoclonal antibody to FLAG M2 Affinity Gel (Sigma) or antibody to Myc (Santa Cruz Biotechnology) for 12 h at 4 °C. We used protein G-Sepharose for precipitation with antibody to Myc. We washed the beads with lysis buffer five times and then eluted them with either FLAG peptide or SDS sample buffer for immunoblot analyses.

Western-blot analysis. We placed confluent HEK cells transiently transfected with EFHC1 expression constructs on ice and washed them twice with ice-cold PBS. We scraped cells from the dishes and homogenized them in a hypotonic buffer (0.25 M sucrose, 10 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl and 1 mM EDTA (pH 7.5)) supplemented with protease inhibitors (Complete; Roche). We centrifuged the lysate at 3,300g for 5 min to remove nuclei and used the supernatant as total cytosolic protein. We separated the samples on a 4–20% gradient SDS-polyacrylamide gel and transferred them onto a nitrocellulose filter (0.45 μ m; Schleicher & Schuell) using an electroblot apparatus (Bio-Rad) at 100 V for 1 h in transfer buffer (25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine, 0.1% SDS and 20% (v/v) methanol). We incubated the filter in blocking solution (50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl and 1 mM MgCl₂ (pH 7.4)) containing 3.5–10% nonfat dry milk powder at 37 °C for 1 h. The membrane was processed through sequential incubations with primary antibody (antibody to EFHC1 at 1:1,000 dilution; mouse monoclonal antibody to GFP (Roche) at 1:1,000 dilution; rabbit polyclonal antibody to Myc (Cell Signaling) at 1:1,000 dilution; goat antibody to hemagglutinin (Roche) at 1:1,000 dilution; or antibody to FLAG conjugated to horseradish peroxidase (Sigma) at 1:1,000 dilution) for 1 h and then with 0.4 μ g ml⁻¹ secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (Santa Cruz Biotechnology). We visualized immunoreactive proteins on the filter using the Western Lighting Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer Life Sciences).

URLs. The National Center for Biotechnology Information BLAST database is available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. The InterPro, Pfam and SMART databases are available at <http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/>, <http://pfam.wustl.edu/hmmsearch.shtml> and <http://smart.embl-heidelberg.de/>, respectively.

Accession numbers. GenBank: EFHC1 transcript A, AK001328; EFHC1 transcript B, AL122084; EFHC1 EST clone, AY608689; mouse *Efhc1* ortholog, AK006489; pig EST clone, AW344780; cow EST clones, BE666117 and AV595456. SNP database: 475C→T (R159W), rs3804506; 545G→A (R182H), rs3804505.

Note: Supplementary information is available on the Nature Genetics website.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the family members for participating in this study; Y. Itsukaichi, K. Yamada, Y. Tsutsumi, K. Shoda, E. Mazaki, A. Nitta, N. Okamura, C. Uchikawa, M. Hishinuma and S.G. Pietsch for their help; and the Research Resources Center of RIKEN Brain Science Institute for DNA sequencing analysis and generation of

rabbit polyclonal antibodies. This work was supported in part by a grant from RIKEN Brain Science Institute, Japan. A.V.D.E. is partly supported by a grant from the US National Institutes of Health.

COMPETING INTERESTS STATEMENT

The authors declare that they have no competing financial interests.

Received 4 March; accepted 21 May 2004

Published online at <http://www.nature.com/naturegenetics/>

- Janz, D.C.W. Impulsive-petit mal. *J. Neurol.* **176**, 344–386 (1957).
- Delgado-Escueta, A.V. *et al.* Mapping and positional cloning of common idiopathic generalized epilepsies: juvenile myoclonus epilepsy and childhood absence epilepsy. *Adv. Neurol.* **79**, 351–374 (1999).
- Liu, A.W. *et al.* Juvenile myoclonic epilepsy locus in chromosome 6p21.2-p11: linkage to convulsions and electroencephalography trait. *Am. J. Hum. Genet.* **57**, 368–381 (1995).
- Liu, A.W. *et al.* Juvenile myoclonic epilepsy in chromosome 6p12-p11: locus heterogeneity and recombinations. *Am. J. Med. Genet.* **63**, 438–446 (1996).
- Bai, D. *et al.* Juvenile myoclonic epilepsy: Linkage to chromosome 6p12 in Mexico families. *Am. J. Med. Genet.* **113**, 268–274 (2002).
- Sander, T. *et al.* Refined mapping of the epilepsy susceptibility locus EJM1 on chromosome 6. *Neurology* **49**, 842–847 (1997).
- Greenberg, D.A. *et al.* Reproducibility and complications in gene searches: linkage on chromosome 6, heterogeneity, association, and maternal inheritance in juvenile myoclonic epilepsy. *Am. J. Hum. Genet.* **66**, 508–516 (2000).
- Pal, D.K. *et al.* BRD2 (RING3) is a probable major susceptibility gene for common juvenile myoclonic epilepsy. *Am. J. Hum. Genet.* **73**, 261–270 (2003).
- Pinto, D. *et al.* Evidence for linkage between juvenile myoclonic epilepsy-related idiopathic generalized epilepsy and 6p11-12 in Dutch families. *Epilepsia* **45**, 211–217 (2004).
- Suzuki, T. *et al.* Identification and mutational analysis of candidate genes for juvenile myoclonic epilepsy on 6p11-p12: LRRCL1, GCLC, KIAA0057 and CLIC5. *Epilepsia Res.* **50**, 265–275 (2002).
- Braunewell, K.H. & Gundelfinger, E.D. Intracellular neuronal calcium sensor proteins: a family of EF-hand calcium-binding proteins in search of a function. *Cell Tissue Res.* **295**, 1–12 (1999).
- Escayg, A. *et al.* Coding and noncoding variation of the human calcium-channel beta 4-subunit gene CACNB4 in patients with idiopathic generalized epilepsy and episodic ataxia. *Am. J. Hum. Genet.* **66**, 1531–1539 (2000).
- Jouveneau, A. *et al.* Human epilepsy associated with dysfunction of the brain P/Q-type calcium channel. *Lancet* **358**, 801–807 (2001).
- Fletcher, C.F. *et al.* Absence epilepsy in tottering mutant mice is associated with calcium channel defects. *Cell* **87**, 607–617 (1996).
- Burgess, D.L., Jones, J.M., Meisler, M.H. & Noebels, J.L. Mutation of the Ca²⁺ channel beta subunit gene Cchb4 is associated with ataxia and seizures in the lethargic (lh) mouse. *Cell* **88**, 385–392 (1997).
- Letts, V.A. *et al.* The mouse stargazer gene encodes a neuronal Ca²⁺-channel gamma subunit. *Nat. Genet.* **19**, 340–347 (1998).
- Newcomb, R. *et al.* Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula *Hysterocrates gigas*. *Biochemistry* **37**, 15353–15362 (1998).
- Yokoyama, C.T. *et al.* Biochemical properties and subcellular distribution of the neuronal class E calcium channel alpha 1 subunit. *J. Neurosci.* **15**, 6419–6432 (1995).
- Wakamori, M. *et al.* Single tottering mutations responsible for the neuropathic phenotype of the P-type calcium channel. *J. Biol. Chem.* **273**, 34857–34867 (1998).
- Catterall, W.A. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 521–555 (2000).
- Woermann, F.G., Sisosiya, S.M., Free, S.L. & Duncan, J.S. Quantitative MRI in patients with idiopathic generalized epilepsy - Evidence of widespread cerebral structural changes. *Brain* **121**, 1661–1667 (1998).
- Meencke, H.J. & Veith, G. The relevance of slight migrational disturbances (microdysgenesis) to the etiology of the epilepsies. In *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies, 3rd Edition, Advances in Neurology* vol. 79 (eds. Delgado-Escueta, A.V., Wilson, W.A., Olsen, R.W. and Porter, R.J.) 123–131 (Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 1999).
- Saegusa, H. *et al.* Altered responses in mice lacking α_{1E} subunit of the voltage-dependent Ca²⁺ channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 6132–6137 (2000).
- Pennacchio, L.A. *et al.* Mutations in the gene encoding cystatin B in progressive myoclonus epilepsy (EPM1). *Science* **271**, 1731–1734 (1996).
- Virtaneva, K. *et al.* Unstable minisatellite expansion causing recessively inherited myoclonus epilepsy, EPM1. *Nat. Genet.* **15**, 393–396 (1997).
- Sugimoto, Y. *et al.* Childhood absence epilepsy in 8q24: refinement of candidate region and construction of physical map. *Genomics* **68**, 264–272 (2000).
- Morita, R. *et al.* Exclusion of the JRK/JH8 gene as a candidate for human childhood absence epilepsy mapped on 8q24. *Epilepsia Res.* **37**, 151–158 (1999).
- Niidome, T., Kim, M.S., Friedrich, T. & Mori, Y. Molecular cloning and characterization of a novel calcium channel from rabbit brain. *FEBS Lett.* **308**, 7–13 (1992).
- Chen, Y. *et al.* Formation of an endophilin-Ca²⁺ channel complex is critical for clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis. *Cell* **115**, 37–48 (2003).

症例報告

Carbamazepine による爪甲脱落症の 1 例

Carbamazepine-induced Reversible Onychomadesis : A Case Report

伊藤 康^{1,2)} 小国弘量¹⁾ 土屋 喬義²⁾
土屋 恭子³⁾ 大澤真木子¹⁾

要旨：症例は3歳1カ月、男児。1歳0カ月時熱性けいれん (FC) 発症。その後 FC を反復し、重積化が多く、複合型 FC と診断された。2歳1カ月時入浴後の無熱性けいれん (左半身間代発作) が出現し carbamazepine (CBZ) 内服治療を開始した。睡眠時脳波では右中心あるいは左側頭中部域に独立して散在性に局在性棘波を認めた。2歳9カ月時両側第1趾爪根部の爪甲離開に気づかれ、2カ月後に右第1趾の爪甲が脱落した。他に皮膚病変は認めなかった。血液検査異常なく、角質の鏡検では真菌は検出されなかった。CBZ を減量・中止、valproate を増量する過程で爪甲の異常が改善したことより、CBZ によって誘発された爪甲脱落症と考えた。CBZ による爪甲脱落症は稀な副作用と考えられるが、脱落に至らない微少な爪甲変化は見逃されている可能性があり、注意すべき所見と考えた。

てんかん研究 2005 ; 23 : 14-17

Key Words : onychomadesis (nail shedding), carbamazepine, side effect

(受付：2004年8月23日、訂正：2004年10月5日、受理：2004年10月5日)

はじめに

爪甲剥離症 onycholysis は爪甲が爪床部より部分的に離れる状態で、多くは爪の遠位端から徐々に進行し、完全脱落することは稀である。近位端 (爪根部) から爪が離脱する爪甲脱落症 onychomadesis は前者とは本質的に異なるものとされている^{1,2)}。今回我々は carbamazepine (CBZ) により爪甲脱落症をきたした小児例を経験したので報告する。

症 例

症例は3歳1カ月、男児。母親に無熱性けいれん (3~4歳頃) の既往がある。その他神経疾患の家族歴なし。在胎38週吸引分娩にて出生。仮死なし。出生時体重3,244g。あやし笑い2カ月、定頻3カ月、独坐7カ月、始歩1歳1カ月と発達の遅れはなかった。

1歳0カ月時熱性けいれん (FC) (全般性強直発作=GTS) で発症。その2週間後に有熱性の全般性強直間代発作 (GTCS) が50分間持続し diazepam 静注により停止した。頭部 CT、MRI は正常。

- 1) 東京女子医科大学医学部小児科
〒162-8666 東京都新宿区河田町8-1
Yasushi Ito, Hirokazu Oguni, Makiko Osawa
Department of Pediatrics, Tokyo Women's Medical University, School of Medicine
- 2) 土屋小児病院小児科
Yasushi Ito, Takayoshi Tsuchiya
- 3) 同 皮膚科
Kyoko Tsuchiya

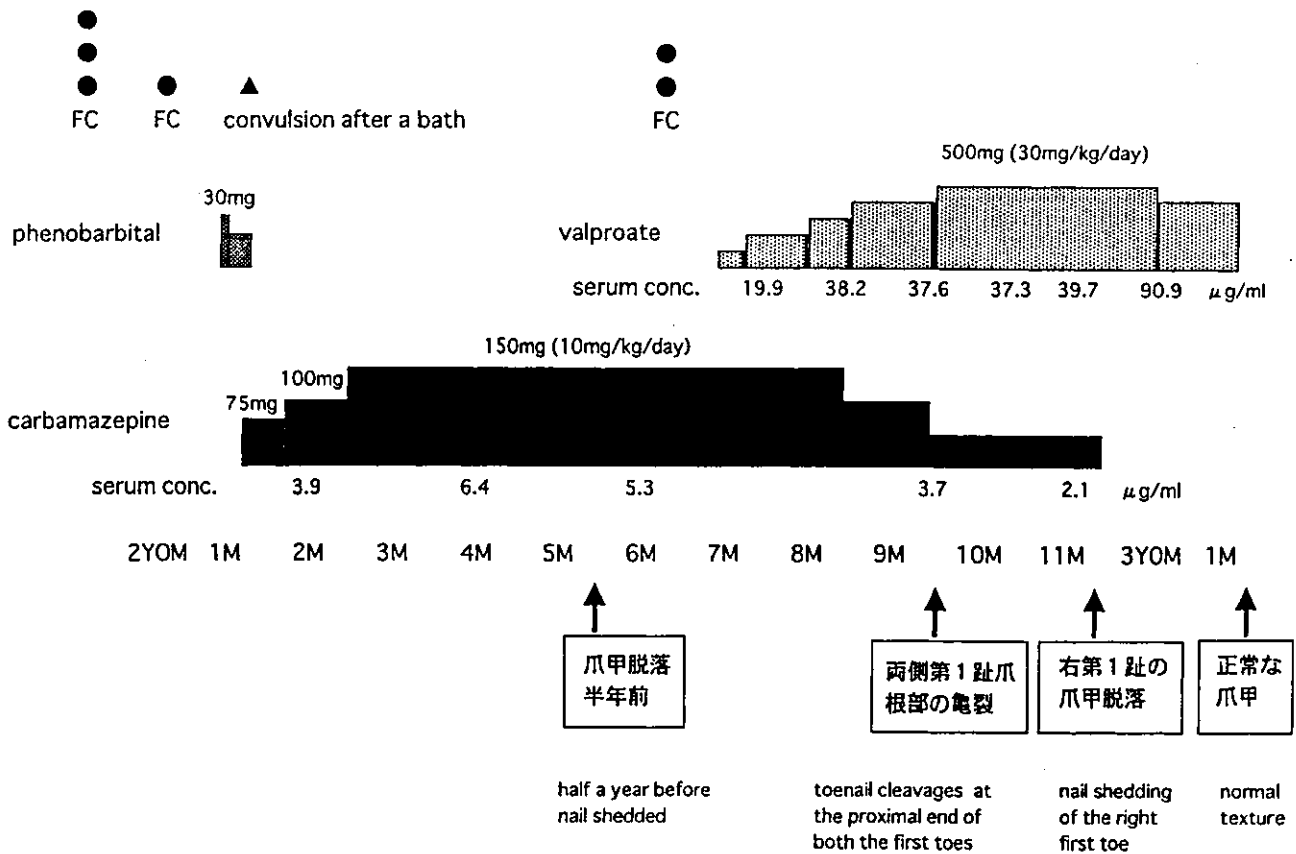


Fig. 1 Clinical course : At age 2 years 9 months, toenail cleavages at the proximal end of both the first toes were noticed. Nail shedding of the right first toe occurred 2 months later.

以降の臨床経過は Fig. 1 に示した。1 歳 11 カ月時に有熱性 GTS (25 分間)、さらに 4 時間後に GTS (10 分間)、6 時間後に GTS が再発し、diazepam を静注し停止した。2 歳 0 カ月時には diazepam 坐薬使用にもかかわらず FC 出現し、phenobarbital (PB) 内服が開始された。PB 開始後眠気、行動異常を認め減量、中止。2 歳 1 カ月時長時間の入浴後に 8 分間の無熱性左半身間代発作が出現し、翌日まで左下肢の軽度麻痺を認めた。同日より carbamazepine (CBZ) 内服が開始された。2 歳 6 カ月時に短時間の FC が 2 回群発した。頭部 MRI 正常。睡眠時脳波にて、右中心あるいは左側頭中部域に独立、散在性に棘波を認めた (Fig. 2)。Valproate (VPA) を開始し、CBZ を減量することにした。その後不明瞭ながら語彙が急速に増えだした。身長 100.4 cm (+1.8 SD)、体重 17.0 kg (+1.9 SD)、頭囲 50.0 cm (+0.3 SD)、胸囲 54.5 cm (+1.3 SD) であり、相対的に頭囲が小さい。微細・粗大運動、社会性は年齢相当。二語文表出は少ないが、言語

理解は良好。皮膚・毛髪は低色素。発汗過多なし。球根状の鼻、対輪低形成を伴う耳介聳立、二分口蓋垂などの変質徴候を認めるがその他の神経学的異常所見はなかった。

2 歳 9 カ月時に両側第 1 趾の爪根部に亀裂があることに気づかれた (Fig. 1、3)。先行する疼痛や炎症症状はなく、他に皮膚病変は認めなかった。血液一般、生化学検査は異常なし。爪甲の直接鏡検では真菌は検出されなかった (KOH 処理)。その後両側第 1 趾、左側第 1、4 指では爪根より非薄な爪が伸長した。2 カ月後 (2 歳 11 カ月時) には右第 1 趾の爪甲のみが脱落し、その下部には新しい爪甲が存在した。さらに 4 カ月後 (3 歳 1 カ月時) の爪甲には異常を認めなかった。

考 察

爪甲脱落症は後爪郭部に強い炎症が生じたり、爪甲下に血液・滲出液などが貯留したりした後に生じ、原因として外傷、水疱性疾患、Stevens-

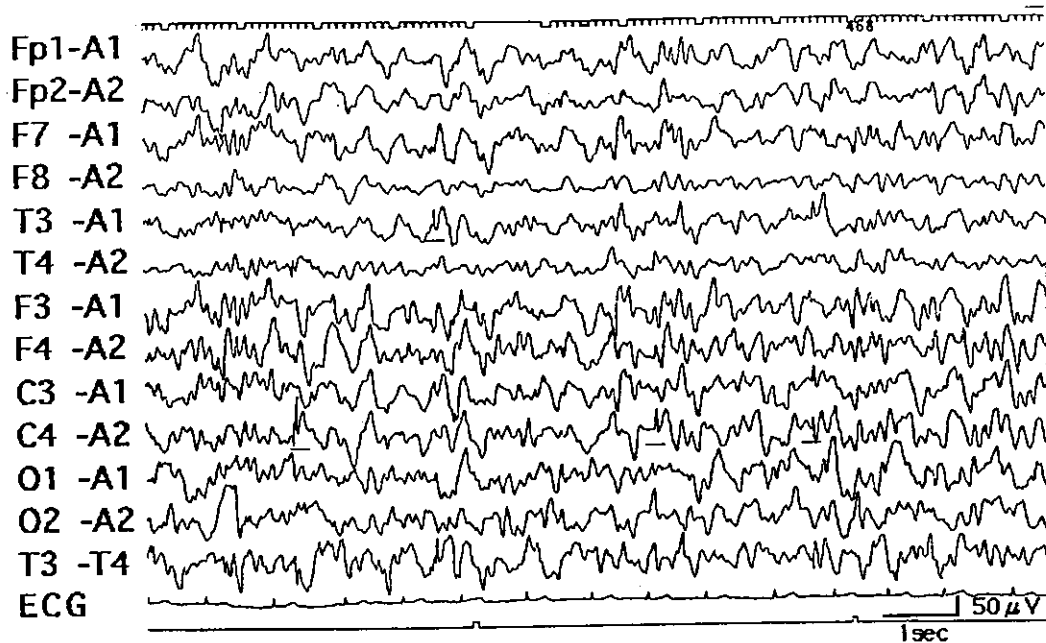


Fig. 2 EEG findings during induced sleep (calibration : 1 s/0.05 mV) : Interictal EEG at age 2 years and 6 months shows intermittent and independent focal spikes from the right central or left mid-temporal region (shown by the underlines).



Fig. 3 Toenail cleavage at the right first toe : At age 2 years and 9 months, toenail cleavages at the proximal end of both the first toes were found. The separated old nail plate had overlapped on the newly generated one.

Johnson 症候群、爪郭部に生じた接触性皮膚炎、掌蹠角化症、ペニシリンアレルギーなどがある²³⁾。また爪甲剥離症の原因には、物理・化学的要因(外傷、化学物質など)、感染症(カンジダ、白癬菌、細菌など)、薬剤(光線性、非光線性)、皮膚疾患(乾癬、強皮症、接触性皮膚炎、掌蹠多汗症など)、

全身性疾患(甲状腺機能異常、ポルフィリン症、ペラグラなど)がある²⁴⁾。これらのうち日光暴露が発症因子として関与している光線性爪甲剥離症には、薬剤光線過敏症(テトラサイクリン系薬剤、ニューキノロン系薬剤など)、光線過敏症の部分症状(ポルフィリン症、ペラグラなど)、自発性光線性爪甲剥離症がある¹⁾。

本症例において一過性に認めた爪甲の異常は病歴、検査上原因を特定できなかった。爪甲異常に気付かれた時点ではCBZとVPAを内服していたが、CBZを減量、VPAを増量する過程で爪甲異常は改善したこと、その後VPA血中濃度高値の際にも再発はなかったことより、CBZ単独の関与が疑われた(Fig. 1、3)。一般に指爪の成長速度は1日に0.1 mm、趾爪はその半分の速さとされている²⁵⁾。3歳の小児であれば足趾の爪甲が生え替わるのに約半年を要すると考えられるため、爪甲異常が実際に出現したのはCBZの血中濃度が高値であった頃と推定される。現在までに調べた限りではCBZが誘発したと考えられる可逆性の爪甲脱落症の類似症例が1例報告されている²⁶⁾。Mishraらの例では、離開は爪根部から始まり、全ての指趾での爪甲脱落を認め、ほぼ正常の外観を

呈するのに 9.5 カ月を要した。

CBZ は代表的な光線過敏性薬剤であるが⁵⁹⁾、爪以外の露光部位の皮膚症状は認めなかった。また CBZ は Stevens-Johnson 症候群の原因薬剤でもあるが⁶⁰⁾、投与早期より本症に特徴的な症状はなかった。CBZ⁷⁾あるいは phenytoin⁸⁾が妊娠中に投与され、出生児に爪の形成不全を認めた抗てんかん剤による胎児奇形が報告されている。本症例における爪甲脱落を含めた爪甲異常はすべて爪根部に認めた。また爪甲脱落の原因は爪母基機能の一時的な停止である可能性があり³⁾、爪甲の形成に CBZ あるいはその代謝産物が血中濃度依存性に抑制的に作用したものと考えた。

CBZ による爪甲脱落症は報告が少なく、比較的稀な副作用と考えられるが、脱落に至らない微少な爪甲変化は見逃されている可能性もある。指の細かな機能に支障を来す可能性もあり、留意すべき所見と考えた。

文 献

- 1) 橋本洋子. Photo-onycholysis. 佐藤吉昭, 市橋正光, 堀尾 武編. 光線過敏症. 第 3 版. 東京: 金原出版, 2002: 217-221.
- 2) 東 禹彦. 爪の疾患. 玉置邦彦編. 爪の疾患. 最新皮膚科学大系 17. 第 1 版. 東京: 中山書店, 2002: 185-212.
- 3) Arnold HL, Odom RB, James WD. Diseases of the skin appendages. Andrews' diseases of the skin; clinical dermatology. 8th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1990: 879-924.
- 4) Mishra D, Singh G, Pandey SS. Possible carbamazepine-induced reversible onychomadesis. Int J Dermatol 1989; 28: 460-461.
- 5) 戸倉新樹. 薬剤性光線過敏症. medicina 2003; 40: 1000-1001.
- 6) 村上貴孝. カルバマゼピン服用開始後に発症した Stevens-Johnson 症候群の 1 例. 診断と治療 1996; 84 (suppl): 168.
- 7) 中島康雄. 妊婦・授乳婦への薬剤投与ガイド. カルバマゼピン. 薬事新報 2001; 2182: 57-63.
- 8) 岡本伸彦. 母親のてんかん治療による胎児性ヒダントイン症候群の 1 例. 診断と治療 1996; 84 (suppl): 184.

Summary

Carbamazepine-induced Reversible Onychomadesis: A Case Report

Yasushi Ito¹²⁾, Hirokazu Oguni¹¹⁾, Takayoshi Tsuchiya²⁾,

Kyoko Tsuchiya³⁾, Makiko Osawa¹⁾

¹⁾Department of Pediatrics, Tokyo Women's Medical University, School of Medicine

²⁾Department of Pediatrics, Tsuchiya Children's Hospital

³⁾Department of Dermatology, Tsuchiya Children's Hospital

Carbamazepine (CBZ)-induced onychomadesis is a rare adverse drug reaction. It can often be left unnoticed especially when the symptom is limited to a subtle change of nail plate. We describe a 3-year and 1-month old boy who had reversible onychomadesis. At 12 months of age, the boy encountered first febrile convulsion (FC). The FC occurred repeatedly thereafter and it was classified as complex form FC. At age 2 years and 1 month, the boy had left predominant afebrile clonic hemiconvulsion after taking a bath. We then initiated carbamazepine administration. At age 2 years and 9 months, toenail cleavages at the proximal end of both first toes were found. Two months later, nail shedding of the right first toe occurred. No other systemic skin lesion was present. Blood examination was normal and microscopy of nail scraping revealed no mycete. Abnormal texture of nail plate improved after a gradual withdrawal of CBZ. Based on this finding and the finding of a similar case reported by Mishra *et al* in 1989, we concluded that the onychomadesis was induced by CBZ.

J. Jpn. Epil. Soc. 2005; 23: 14-17

(received: August 23, 2004, revised: October 5, 2004, accepted: October 5, 2004)

= 原 著 論 文 =

併存障害のある注意欠陥/多動性障害児における
交感神経皮膚反応の検討

山城 大 相原 正男 小野智佳子 金村 英秋
青柳 閣郎 後藤 裕介 岩垂 喜貴 中澤 眞平

要旨 行為障害 (conduct disorder; CD) を併存した注意欠陥/多動性障害 (attention deficit/hyperactivity disorder; AD/HD) 児 2 名において、医療介入後に新たに作製した情動的な内容を含む画像を呈示した時の交感神経皮膚反応 (sympathetic skin response; SSR) を記録した。介入後に CD および反抗挑戦性障害 (oppositional defiant disorder; ODD) の診断基準を満たさなくなった症例 1 では、受動的応答で SSR は出現しなかったが、呈示画像に対して情動評価する能動的応答で SSR が出現した。一方、介入後に ODD の診断基準を満たしていた症例 2 では、両応答とも SSR が出現しなかった。併存障害を有する AD/HD 児における情動表出反応の客観的評価法として、視覚的情動刺激による SSR は有用と考えられる。

見出し語 注意欠陥/多動性障害, 情動, 交感神経皮膚反応, 反抗挑戦性障害, 行為障害

はじめに

我々は日常生活や社会的な状況の中で特定の行動を選択する際、考えられる多くの可能性の中から将来における利益と損失を評価した上で意思決定を行う。Damasio はこのような行動選択や意思決定をする時の自動化された信号としてソマティックマーカー仮説を提唱した¹⁾。ソマティックマーカーは、社会化のプロセスにおいて特定の刺激を特定の身体状況と結びつけることにより機能する情動のプロセスとされる。すなわち、ネガティブなソマティックマーカーが特定の予測結果と並置されると警報として、またポジティブなソマティックマーカーが並置

されると動因として機能する。ソマティックマーカー装置すなわち情動プロセスは、社会の秩序と倫理の規定に適應すべく調整されている不可欠な要素であると考えられる。

一方、sympathetic skin response (以下 SSR) は末梢の交感神経反応として臨床応用されてきたが、近年情動表出反応として研究されてきた^{2,3)}。さらに、情動機能を評価する視覚刺激として成人では International Affective Picture System (IAPS) などが報告されている。今回、情動的内容を含むさまざまな画像をオリジナルに作成し、健常小児のアンケートをもとに各画像の情動的评价を決定した。また、健常小児ならびに行為障害 (conduct disorder; CD) を認めていた注意欠陥/多動性障害 (attention deficit/hyperactivity disorder; AD/HD) 児 2 名の医療介入後において、これらの画像を呈示した時の SSR を記録した。これらの症例の SSR を健常小児と比較することで、併存障害を有する AD/HD 児の情動表出反応を検討したので報告する。

第 44 回日本小児神経学会総会推薦論文

山梨大学医学部小児科

連絡先 〒 409-3898 山梨県中巨摩郡玉穂町下河東 1110

山梨大学医学部小児科 (相原正男)

E mail: maihara@res.yamanashi-med.ac.jp

(受付日: 2003. 4. 17, 受理日: 2003. 8. 18)

I 対象・方法

あらかじめ7～13歳の健常小児18名により、20枚の画像の情動評価を決定した。その内訳は幾何学的図形、動物やぬいぐるみ、親子の戯れる絵や虫などの画像、殴るなどの非社会的画像とした。それぞれの評価は、「とても嫌い」の-2、「嫌い」の-1、「どちらでもない」の0、「好き」の+1、「とても好き」の+2の5段階とした。

SSR対象児は、医療介入後のAD/HD症例2名および、7～12歳の健常小児9名とした。被験者およびその保護者には検査の内容、趣旨について説明し同意を得た。

情動評価された画像をモニターに表示し、被験者には安静座位で1メートル前方のモニターを注視するように指示した。画像の呈示時間は1.5秒、刺激間隔は10秒とし、画像を注視する以外には特別な指示を与えない受動的応答と、同じ画像を見て被験者が感じた快、中性、不快を評価して答える能動的応答におけるSSRを同時記録した。SSRの記録にはNeuropack（日本光電社製）を用い、記録電極は右手手掌、基準電極は右手手背とした。両応答ともSSR出現率（健常小児の対象人数に対するSSRが出現した人数の比）の高い画像について、AD/HDの2症例と健常小児とで比較検討した。

症例1 10歳、男児。

主訴 盗み、多動。

妊娠分娩歴 在胎38週、3,120gで出生。周産期に異常はなかった。

家族歴 特記事項なし。

経過 保育園に入園した頃より、言葉より先に友人に手を出すことが多く、小動物に対しても暴力を加えていた。小学校入学後に担任から落ち着きのなさを指摘され、7歳時より教室から出て行く、友人の持ち物や店の品物を盗むといった行動が多くなり、8歳時に当科を受診した。神経学的所見に特記すべきことはなく、血液検査、頭部CTおよび脳波所見で異常を認めなかった。WISC-RでFIQは77（VIQ;83,PIQ;75）であった。DSM-IVの診断基準に従いAD/HD（混合型）と診断した。さらに、CDの診断基準を満たした。Methylphenidateを開始し、心理カウンセリングや教師、父母とのミーティングを2年間継続した。現在、ODDとCDの診断基準は満たしていない。

症例2 12歳、男児。

主訴 暴力。

妊娠分娩歴 在胎39週、3,000gで出生。周産期に異常はなかった。

家族歴 特記事項なし。

経過 有意語は3歳頃からで、言語発達遅延を認

めていた。この頃から笑いながら友人を突き飛ばすといった行動を認め、小学校入学後は教室で座っていられず、思い通りにならないと周囲の人に乱暴したり物を投げたりした。11歳頃より、母の胸や臀部に触れたり、着替えをのぞくなどの行為も認め、友人との喧嘩、動物に対する暴力、嘘をつくことが目立つようになったため、12歳時に当科を受診した。神経学的所見に特記すべきことはなく、血液検査、頭部CT、脳波所見に異常を認めなかった。WISC-RではFIQ 65（VIQ;65,PIQ;65）であった。DSM-IVに従いAD/HD（混合型）と診断、さらにCDの診断基準も満たした。Methylphenidateを開始し、さらに心理カウンセリング、父母、教師とのミーティングを定期的に行った。FIQも77（VIQ;80,PIQ;77）と改善したが、現在父母や教師との口論、反抗、特定の友人に対する神経過敏等のODDの診断基準を満たしている。

II 結果

各画像呈示後に出現する健常小児の代表的なSSR波形を示す（図1）。また、健常小児における受動的、能動的応答時の各画像の情動評価値とSSR出現率を示す（図2）。受動的応答において、情動性の高い画像、すなわち評価値の絶対値が大きい画像でSSRの出現率が高い傾向が認められた。また、受動的応答よりも能動的応答で全体にSSRの出現率が高くなった。すべての画像の中で、両応答ともSSRの出現率が高かった画像4枚をSSR高出現率画像とした。高出現率画像の具体例と、これらの画像に対する健常小児におけるSSR出現率、平均振幅を示す（図3）。

対照群では、これらのSSR高出現率画像のSSR出現率は受動的応答ではすべて40%以上であり、能動的応答では、すべての対照児においてSSR高出現率画像4枚のうち3枚以上でSSRが明瞭に出現していた。

AD/HD児における能動的応答時の各画像に対する情動評価は、健常小児と同様であり、4枚のSSR高出現率画像の評価もすべて「不快」であった。両者にSSR高出現率画像を呈示した時のSSR波形を示す（図4、5）。医療介入後にCDおよびODDの診断基準を満たさなくなった症例1では、受動的応答ではSSRが出現しなかったが、能動的応答ではSSR高出現率画像を含めた情動性の高い画像（高出現率画像の他に威嚇するへび、子猫、母親が娘の髪を

結っている画像等)でSSRが出現した。一方、医療介入後もODDを認める症例2では、両応答のいずれもSSRは出現しなかった。

Ⅲ 考 察

近年、AD/HD児において、positron emission computed tomography (PET) 等による検討から脳血流および代謝率の減少、ドパミン、ノルエピネフ

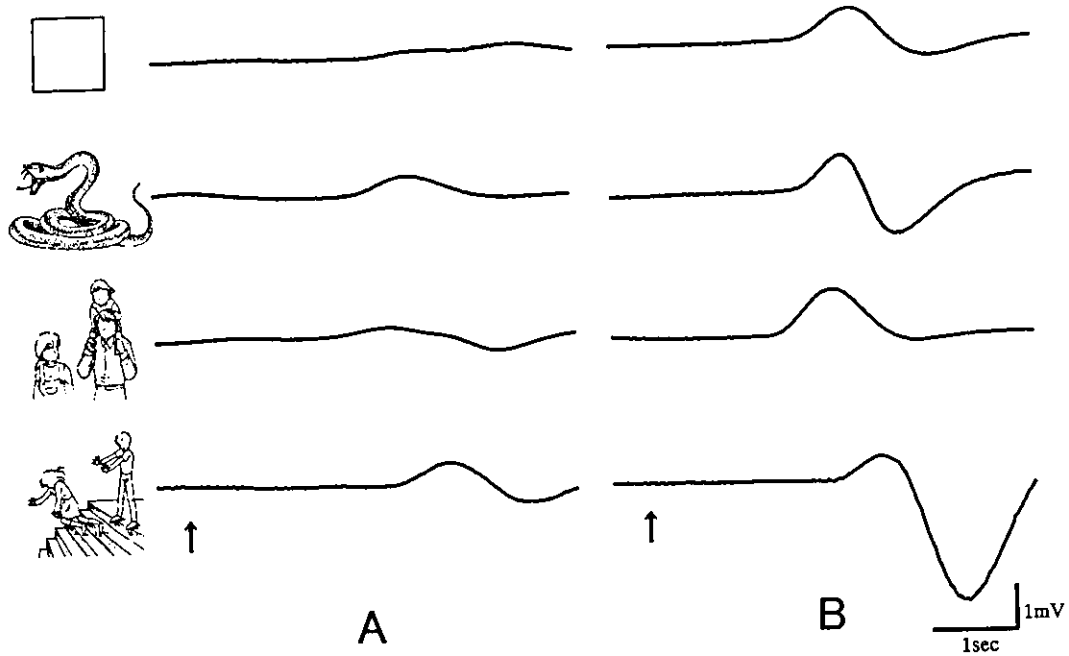


図1 健常小児の代表的SSR波形
A:受動的応答, B:能動的応答
↑:刺激開始

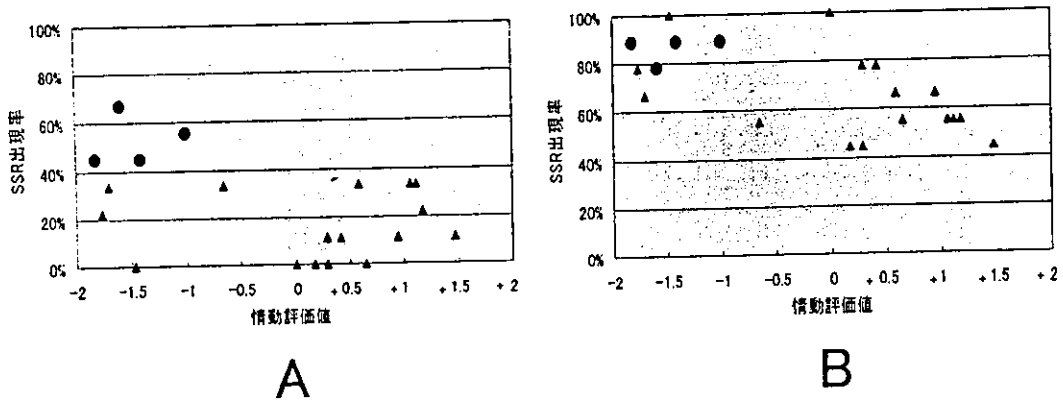


図2 健常小児における各画像に対する情動評価値とSSR出現率との関係

A:受動的応答, B:能動的応答
▲:各画像の情動評価値に対するSSR出現率
●:SSR高出現率画像(両応答とも出現率が高い4画像)
受動的応答に比し能動的応答では全体にSSRの出現率が高い、両応答ともSSRの出現率が高い画像を高出現率画像とした。

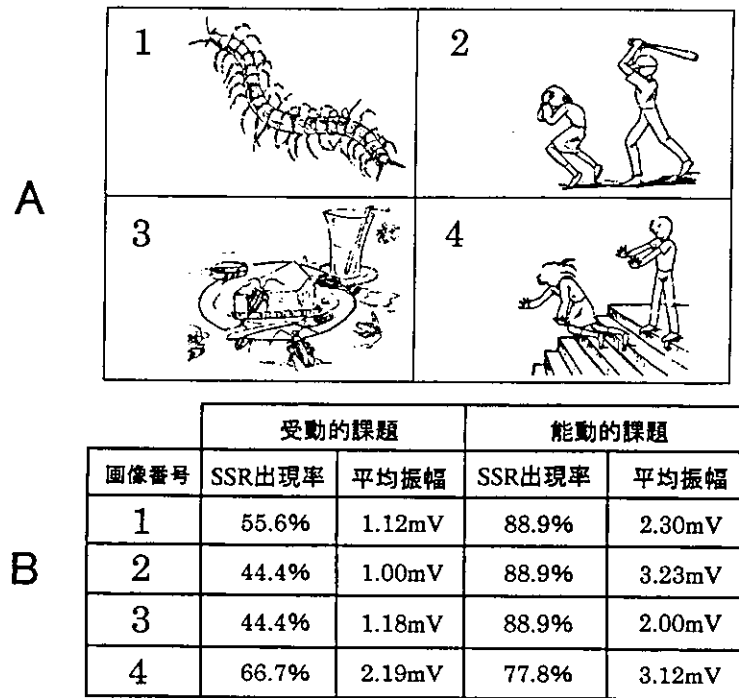


図3 SSR 高出現率画像における両応答での SSR 出現率と平均振幅

A : SSR 高出現率画像

B : 受動的, 能動的応答における SSR 出現率と平均振幅

リン系の機能不全が認められている¹⁰⁾。特に前頭葉眼窩部と、それを大脳辺縁系へ連絡する尾状核を結ぶ経路の機能障害が注目されている¹¹⁾。また、AD/HDはODD、さらにCDに発展することもあり、CDの発症を早めることがあるとされている¹²⁾。ODDやCDを併存した場合、その拒絶的、破壊的行動から社会適応が非常に困難となり、成人期には反社会性人格障害へと移行しうる可能性が考えられる。

SSRは末梢の交感神経活動による出現以外に、情動的要素を含む視覚刺激や音楽といった聴覚刺激によって出現し、いずれも快および不快な刺激で覚醒性が高くなるにしたがいSSRの出現率と振幅が高くなると報告されている¹³⁾。また、未治療もしくは治療中断中のAD/HD児では、報酬と罰を用いた課題施行中の皮膚電位差反応が、正常コントロール児に比し有意に低いという報告がなされている¹⁴⁾。さらに、我々は前頭葉離断症候群2症例において、画像内容の情動評価が言語表出できているにもかかわらず、情動表出能力が消失した認知と感情機能の解離

現象をSSRによる電気生理学的手法で証明した¹⁵⁾。

今回の2症例では、いずれも介入前にはCDを認めていたが、介入後に問題行動の軽減を認めている。CDとODDの診断基準を満たさなくなった症例1では能動的応答において情動評価値が低い、すなわち不快な画像と、情動評価値が高い、すなわち快な画像の一部を呈示した時にSSRが出現した。これらの画像はいずれもコントロール群の能動的応答では出現率が50%を超えるものであった。一方、ODDを有する症例2では、両応答とも高出現率画像を含めたすべての画像でこの反応が認められなかった。情動的な画像刺激によるSSRの出現の有無から、ODDのない児では情動表出反応が認められ、ODDを有する児ではこの反応が認められないことが示唆される。このことから、ODD児には情動的な信号の欠如から主観的感情を体験する能力の低下が推察される。換言すれば、他者への感情移入による共感のためには情動反応が必要不可欠であることが示唆される。さらに、症例1で能動的応答時にSSRが出現している

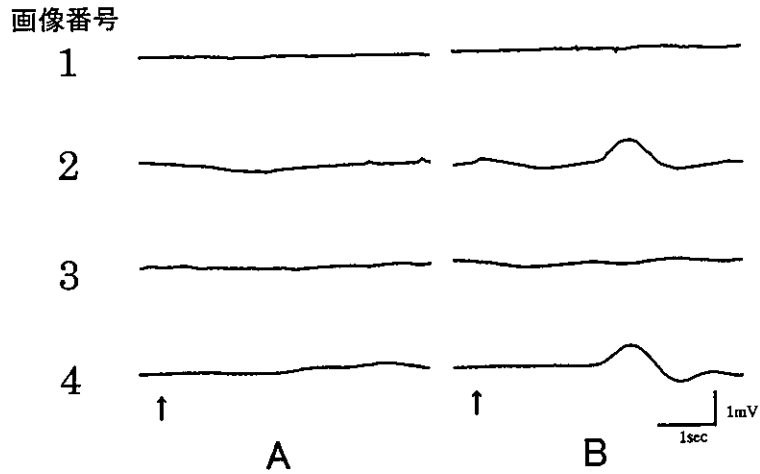


図4 SSR高出現率画像呈示によるSSR波形(症例1)

A:受動的応答, B:能動的応答

画像番号:図3-Aを参照, ↑:刺激開始

受動的応答では全ての画像でSSRは出現しなかったが, 能動的応答では2枚の画像でSSRの出現を認めた.

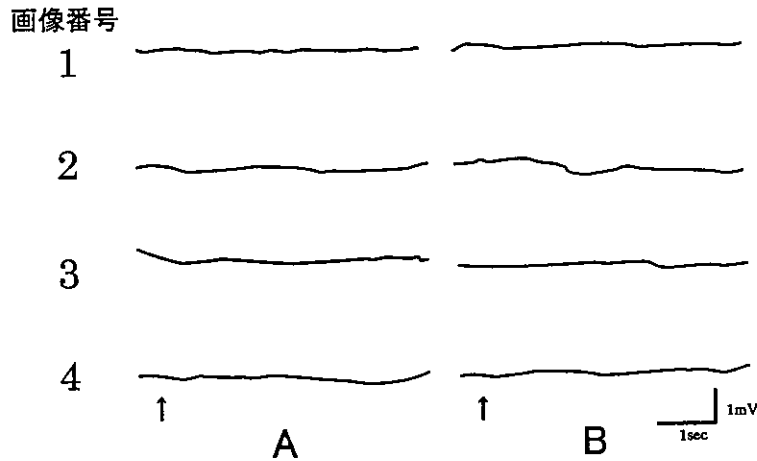


図5 SSR高出現率画像呈示によるSSR波形(症例2)

A:受動的応答, B:能動的応答

画像番号:図3-Aを参照, ↑:刺激開始

両応答ともすべての画像でSSRは出現しなかった.

ことより, 感情投影を用いた心理療法を行っていくことが今後の治療上有効であるものと思われる. 今回は2例のみの検討であるため, AD/HDやODDの特性を明確に断定するものではないが, ODDやCDをもつ児における情動の客観的評価ならびに治療方針や治療経過を決定, 観察する上で, 情動的要素を含む視覚刺激によるSSRは有用と考えられる. 今

後, さらに症例を増やし, また医療介入前後のSSRの推移を臨床症状との関連を通して検討していきたい.

本論文の要旨は第44回日本小児神経学会総会(2002年6月, 仙台)において発表した.

本研究の一部はてんかん治療研究振興財団研究助成に

よって行われた。

文 献

- 1) Damasio AR. *Descartes' error: emotion, reason, and the human brain*. New York: Grosset/Putnam, 1994.
- 2) Damasio AR. *The feeling of what happens: body and emotion in the making of consciousness*. New York · San Diego · London: Harcourt Brace & Co., 1999.
- 3) Damasio AR, Tranel D, Damasio H. Individuals with sociopathic behavior caused by frontal damage fail to respond autonomically to social stimuli. *Behav Brain Res* 1990; **41**: 81-94.
- 4) Lang PJ, Greenwald MK, Bradley MM, Hamm AO. Looking at pictures: affective, facial, visceral, and behavioral reactions. *Psychophysiology* 1993; **30**: 261-73.
- 5) Aihara M, Sata Y, Osada M, Ozaki Y, Nakazawa S. The effects of higher cortical functions on sympathetic skin responses. In: Hashimoto I, Kakigi R, eds. *Recent advances in human neurophysiology*. Amsterdam: Elsevier, 1998: 1089-94.
- 6) van Dyck CH, Quinlan DM, Cretella LM, et al. Unaltered dopamine transporter availability in adult attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Psychiatry* 2002; **159**: 309-12.
- 7) Dresel S, Krause J, Krause KH, et al. Attention deficit hyperactivity disorder: binding of [^{99m}Tc] TRODAT-1 to the dopamine transporter before and after methylphenidate treatment. *Eur J Nucl Med* 2000; **27**: 1518-24.
- 8) Hale TS, Hariri AR, McCracken JT. Attention-deficit/hyperactivity disorder: perspectives from neuroimaging. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2000; **6**: 214-9.
- 9) Loeber R, Burke JD, Lahey BB, Winters A, Zera M. Oppositional defiant and conduct disorder: a review of past 10 years. Part I. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2000; **39**: 1468-84.
- 10) Khalifa S, Isabelle P, Jean-Pierre B, Manon R. Event-related skin conductance responses to musical emotions in humans. *Neurosci Lett* 2002; **328**: 145-9.
- 11) Iaboni F, Douglas VI, Ditto B. Psychophysiological response of ADHD children to reward and extinction. *Psychophysiology* 1997; **34**: 116-23.
- 12) 青柳閣郎, 相原正男, 神谷裕子, ら. 前頭葉離断症候群における認知・感情機能の解離. *臨床脳波* 2003; **45**: 441-6.

= 原著論文 =

視覚的情動刺激による交感神経皮膚反応の発達的变化

山城 大 相原 正男 小野智佳子 金村 英秋
 青柳 閣郎 後藤 裕介 岩垂 喜貴 中澤 眞平

要旨 交感神経皮膚反応 (sympathetic skin response; SSR) は情動表出反応として出現することが報告されている。情動機能を評価する画像をオリジナルに作製し、これらを視覚刺激として呈示した際に出現する SSR について健常小児と健常成人で比較検討した。小児では成人に比し高い SSR 出現率を認めた。さらに、不快な画像における SSR 出現率は、成人では生理的に不快な画像に比し暴力行為などの非社会的画像で有意に高かったが、小児においては両者に明らかな差異を認めなかった。このことから、小児期から成人にいたる情動的評価・意義の相違と変化は、情動発達に伴う推移を示すものと思われる。情動の客観的評価に視覚刺激による SSR が有用であると考えられる。

見出し語 情動, 情動評価, 交感神経皮膚反応 (SSR)

はじめに

情動の定義にはさまざまな意見があるが、集約すると次のような心理学的、生物学的提案がなされている。つまり情動とは精神の働きとしての感情状態のうち喜怒哀楽といった比較的強い生理的喚起を伴った、明確な対象によって喚起される感情状態とされる¹⁾。また、個体および種族維持のための生得的な欲求が脅かされるか、満たされない、あるいは満たされたときなどの「感情体験」およびそれに伴う行動などの「身体反応」に分けられる²⁾。すなわち、情動とは我々が外界からある刺激を知覚情報として受けた時に、その刺激に対して経験や記憶、知識などをもとに反応を決定し、その出力として呼

吸・心拍などの神経生理学的変化を伴い、実際の行動の動機付けとなるものである³⁾。Damasioはこのような行動選択や意思決定をする時の自動化された信号としてソマティックマーカー仮説を提唱した⁴⁾。すなわち、ネガティブなソマティックマーカーが特定の予測結果と並置されると警報として、また、ポジティブなソマティックマーカーが並置されると動因として機能する。ソマティックマーカー装置すなわち情動プロセスは、社会の秩序と倫理の規定に適応すべく調整されている不可欠な要素であると考えられる。

一方、情動研究の客観的・記録方法が近年報告されてきた。情動機能を評価する視覚刺激として、成人では International Affective Picture System (IAPS) などが報告されている⁵⁾。さらに情動記録としては、sympathetic skin response (以下 SSR) が近年情動表出反応として研究されている⁶⁻⁹⁾。

今回、情動機能を評価する画像をオリジナルに作製し、健常小児および成人にこれらの画像を呈示した時に出現する SSR を記録して小児と成人における情動的評価・意義の相違と発達的变化を検討したので報告する。

第 45 回日本小児神経学会総会推薦論文

山梨大学医学部小児科

連絡先 〒409-3898 山梨県中巨摩郡玉穂町下河東
1110

山梨大学医学部小児科 (相原正男)

E-mail: maihara@res.yamanashi-med.ac.jp

(受付日: 2004. 2. 12, 受理日: 2004. 3. 26)

I 対象・方法

5～16歳（平均10歳1カ月）の健常小児20名および24～39歳（平均28歳6カ月）の健常成人20名によるアンケートをもとに、20枚の画像を情動評価した。その内訳は幾何学的図形、動物やぬいぐるみ、親子の戯れる絵や虫などの画像、殴るなどの非社会的画像とした。それぞれの評価はIAPSの評価法に準じ、誘発性として「とても嫌い」の-2から「とても好き」の+2まで、覚醒性として「ぜんぜんびっくりしない」の-2から「とてもびっくりする」の+2までのそれぞれ5段階とした。

これらの視覚刺激からSSRを記録した対象は、7～16歳（平均11歳0カ月）の健常小児11名、および19～34歳（平均26歳4カ月）の健常成人13名であった。被験者およびその保護者には検査の目的、内容について説明し同意を得た。

前述の情動評価された画像をモニターに表示し、被験者には安静座位で1メートル前方のモニターを注視するように指示した。画像の呈示時間は1.5秒、刺激間隔は10秒とし、画像を注視する以外には特別な指示を与えない受動的応答と、同じ画像を見て被験者が感

じた快、中性、不快を評価して答える能動的応答におけるSSRを同時記録した。SSRの記録にはNeuropack（日本光電社製）を用い、記録電極は右手手掌、基準電極は右手手背とした。画像呈示に伴うSSRの出現率（全対象人数に対するSSRが出現した人数の比）を受動的応答と能動的応答のそれぞれにつき、小児と成人で比較検討した。統計処理にはDr. SPSS II for Windowsを使用し、Mann-WhitneyのU検定を行った。

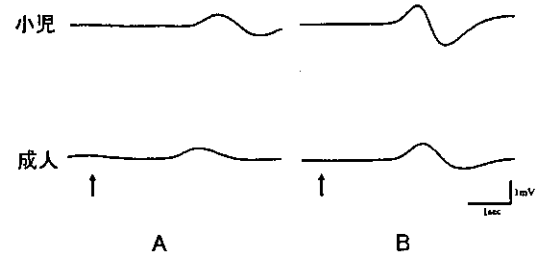


図1 代表的SSR波形

A：受動的応答、B：能動的応答
↑：刺激開始

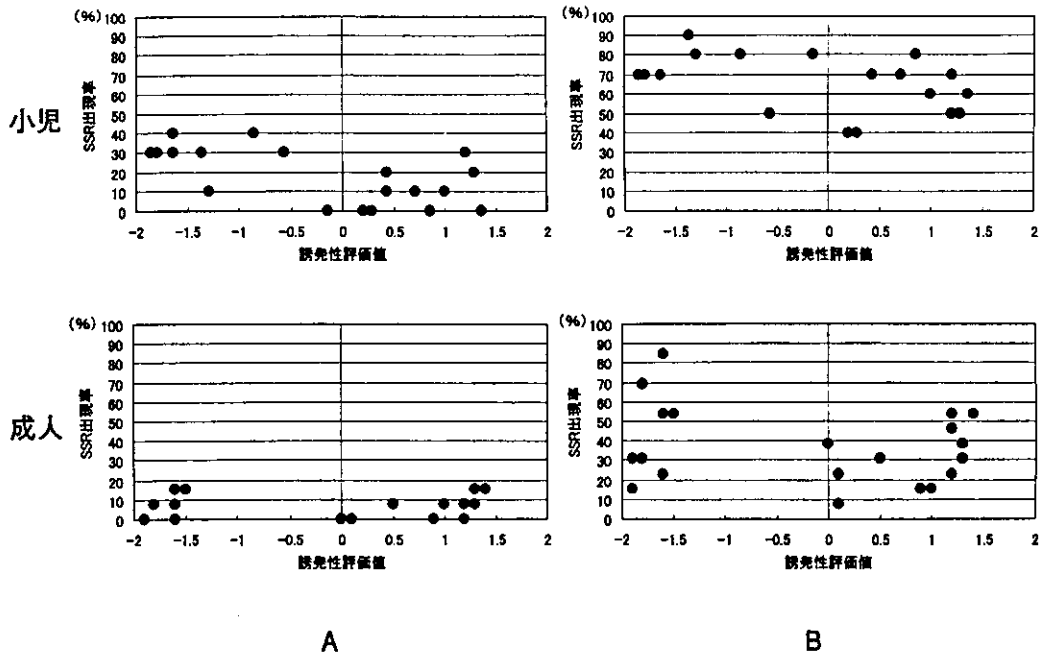


図2 小児および成人における各画像の誘発性評価値とSSR出現率との関係

A：受動的応答、B：能動的応答

SSR出現率は受動的応答に比し能動的応答で全体に高く、受動的応答では評価値の絶対値が大きい画像で高い傾向が認められる。

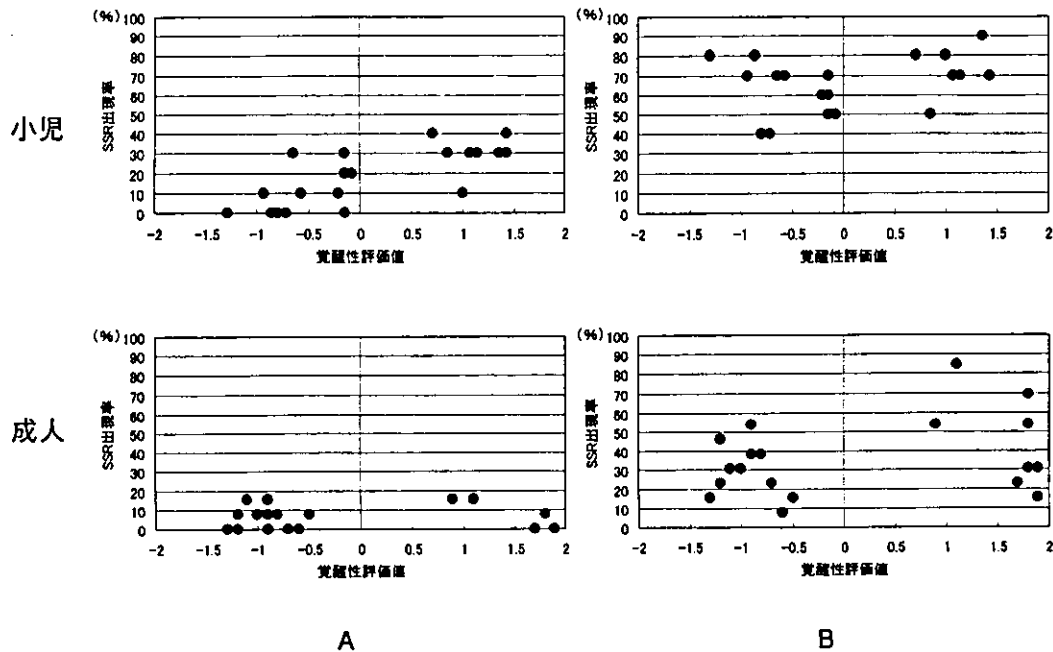


図3 小児および成人における各画像の覚醒性評価値とSSR出現率との関係

A：受動的応答，B：能動的応答

SSR出現率は受動的応答に比し能動的応答で全体に高く、受動的応答では評価値の高い画像でSSR出現率が小児において高い傾向が認められる。

II 結 果

各画像呈示後に出現する代表的なSSR波形を示す(図1)。また、小児と成人における各画像の誘発性と覚醒性の評価値に対するSSR出現率を受動的応答と能動的応答別に示す(図2, 3)。SSR出現率は成人に比し小児で全体に高い傾向を認めた。誘発性評価値では受動的応答で、その絶対値が大きい画像、すなわち「好き」もしくは「嫌い」の強度が高い画像でSSR出現率は高く、「好き」と「嫌い」の中間周辺に位置する画像で低い傾向が認められた。能動的応答では受動的応答に比しSSR出現率は高い傾向を認めるが、誘発性で評価値との間に明らかな傾向は認められなかった。一方、覚醒性評価値では受動的応答で、その評価値が高くなるにしたがいSSR出現率は小児において高い傾向が認められた。能動的応答では誘発性評価値と同様に、受動的応答に比しSSR出現率は高い傾向を認めるが、覚醒性評価値との間に明らかな傾向は認められなかった。

誘発性が低く覚醒性が高い画像は、虫やヘビと

いった生理的に嫌悪感を来すものと暴力行為のような社会的に非道徳的なものに分けられ、これらを生理的不快群と社会的不快群とした(図4)。各応答におけるこれらの画像に対するSSR出現率を生理的不快群と社会的不快群に分けて示す(図5)。各群とも成人に比し小児でSSR出現率は有意に高かった。また、小児では両群のSSR出現率に有意差は認められなかったものの、成人の能動的応答では、生理的不快群に比し社会的不快群で有意に高いSSR出現率を示した。

III 考 察

情動は人間の意思や行動を決定する上で必要不可欠なものであり、個々の場面における行動選択ならびに長期的な社会生活や人間関係の構築において重要な役割を果たしている¹⁰⁾。そのため、情動機能の評価は問題行動を有する症例や社会的に不適応な症例の病態把握や治療方針を決定する上で重要と考えられる。一方、情動は「情動体験」と「情動表出」に分けて考えられ、前者は主観的に感情として体験

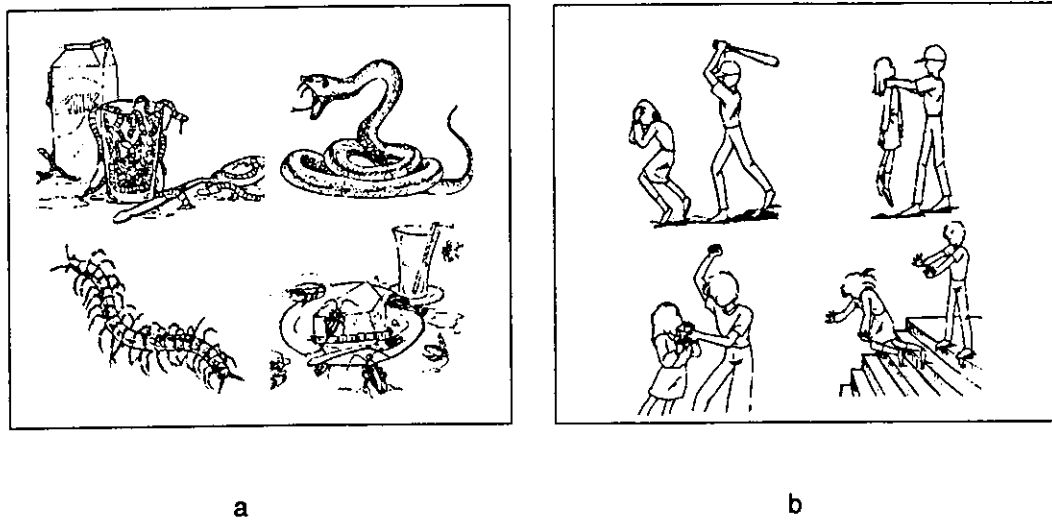


図4 低誘発性かつ高覚醒性と評価された画像

a : 生理的不快群, b : 社会的不快群

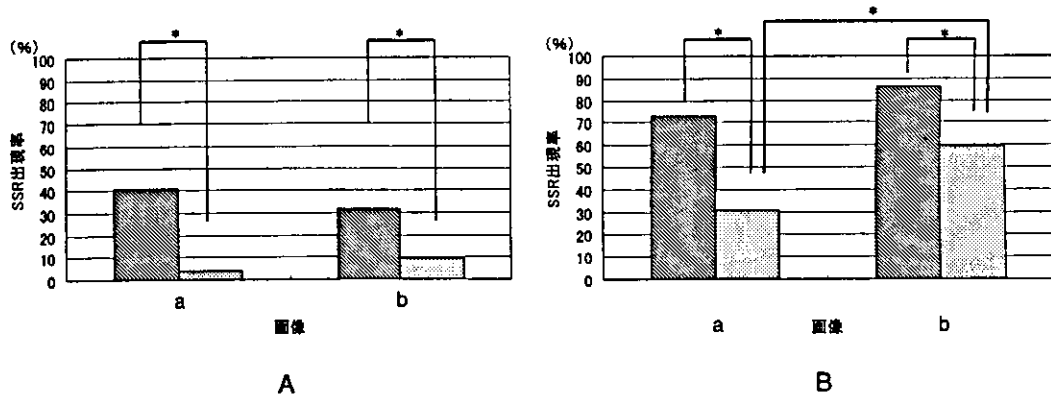


図5 受動的応答と能動的応答における生理的不快群と社会的不快群に対するSSR出現率

■ 小児 □ 成人

A : 受動的応答, B : 能動的応答, a : 生理的不快群, b : 社会的不快群, * : $p < 0.05$

SSR出現率は、両応答のいずれの群でも成人に比し、小児で有意に高かった。また、小児では生理的不快と社会的不快群内でSSR出現率に有意差は認められないが、成人の能動的応答では生理的不快群に比し、社会的不快群で有意に高いSSR出現率を示した。

される内的なものであり、後者は客観的にとらえられる身体反応である²⁾。この情動体験は情動表出を通して他の個体へ伝達されるため、情動の研究は表出された行動やそれに関連する身体的変化、中枢神経系の活動変化を分析することにより行われており、具体的には心拍数、眼輪筋筋電図、事象関連電位などの報告がみられる^{3)~5)}。また、脳波周波数解析により情動反応の際の脳活動部位を推定した報告もあ

る⁶⁾。各情動研究において、不快な刺激では心拍数の上昇、皺眉筋の収縮、事象関連電位のN300振幅の増大、左頭頂葉の γ 波の活性化を認めたと報告されている。

SSRは末梢の交感神経活動による出現以外に、情動的要素を含む視覚刺激や音楽といった聴覚刺激によって出現し、いずれも快および不快な刺激で覚醒性が高くなるにしたがいSSRの出現率と振幅が高く