

表 2 mtDNA・nDNA と主な呼吸鎖複合体 (DiMauro ら<sup>9)</sup>より)

ミトコンドリア DNA			核 DNA		
遺伝子変異	臨床像	低下を認める主な呼吸鎖酵素活性	遺伝子変異	臨床像	低下を認める主な呼吸鎖酵素活性
Single deletions	KSS	I, III, IV	<i>NDUF</i> genes*	LS	I
	PEO	I, III, IV		Leukodystrophy	I
	PS			Encephalomyopathy	I
tRNA mutations	MELAS	I, III, IV	<i>SDH</i> genes*	LS	II
	MERRF	I, III, IV		Paranglioma	II
	Multisystemic Myopathy	I, III, IV		Pheochromocytoma	II
<i>ND</i> genes*	LHON	I	<i>BCS 1 L</i>	LS	III
	MELAS	I	<i>COX</i> genes	GRACILE syndrome	III
	LS	I	<i>SURF 1</i>	Infantile myopathy	IV
	Myopathy	I	<i>SCO</i> genes	LS	IV
	Dystonia	I		Hepatopathy	IV
<i>Cyt b</i> *	Encephalomyopathy	III		Cardioencephalomyopathy	IV
	LHON	III		Leukodystrophy	IV
	Myopathy	III		/tubulopathy	IV
	Septo-optic dysplasia	III			
	Cardiomyopathy	III			
<i>COX</i> genes*	LS	IV			
	Anemia	IV			
	Myopathy	IV			
	Encephalomyopathy	IV			
	ALS-like syndrome	IV			
<i>ATPase 6</i> genes*	NARP	V			
	MILS	V			
	FBSN	V			

\*印は複合体サブユニットをコードする遺伝子  
 KSS : Kearns-Sayre syndrome, PEO : progressive external ophthalmoplegia, PS : Pearson syndrome, MELAS : mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, stroke-like episode, MERRF myoclonus epilepsy and ragged-red fiber, *ND* : NADH dehydrogenase, LHON : Leber hereditary optic neuropathy, LS : Leigh syndrome, *COX* : cytochrome *c* oxidase, NARP : neuropathy, ataxia, retinitis pigmentosa, MILS : maternally inherited Leigh syndrome, FBSN : familial bilateral striatal necrosis, *NDUF* : NADH dehydrogenase ubiquinone oxidoreductase, *SDH* : succinate dehydrogenase, GRACILE : growth retardation, aminoaciduria, lactic acidosis, and early death.

例えば Leigh syndrome (LS) は両側の基底核, 脳幹, 小脳などに神経画像上異常が認められ, 高乳酸血症を伴う進行性の疾患であるが, 病因として heterogenous な原因が報告されている (図 3 A, B)。

電子伝達系異常症は各複合体酵素活性のそれぞれの欠損を基にした生化学的分類にそって説明をされる場合が多いが, 後で述べるようにそれぞれの複合体の障害で単一の疾患のみを説明できるものではなく, また複数の複合体の欠損もあり, 一次的なものか, 二次的なものかなど病態は複雑である。今回は複合体ごとに疾患を述べるより, 遺伝子の観点と複合体酵素の生化学的な観点をあわせて述べることにする。なお各疾患についての詳細は他稿での記述を参考にさせていただきたい。

**遺伝子異常とミトコンドリア電子伝達系疾患 (表 2)<sup>8)</sup>**

表 2 に主な遺伝子異常と複合体酵素, 疾患の関係についてまとめた。

てまとめた。

**□ mtDNA の異常に基づく電子伝達系異常症**

mtDNA の異常に基づく複合体酵素活性の障害と疾患は 1 対 1 の対応ではなく, 複数の複合体が障害される場合が多い。mtDNA の deletion では疾患として KSS, PEO が報告されているが, 複合体酵素の異常は複数 (主に I, III, IV) に異常を来す場合が多い。またミトコンドリア蛋白合成に関わる tRNA の変異では, 疾患として MELAS (A 3243 G<sup>9)</sup>など, MERRF (A 8344 G<sup>10)</sup>など) が有名であり, やはり複数の複合体 (主に I, III, IV) の障害をおこす。ミトコンドリア複合体サブユニットをコードする遺伝子群の異常では広範な臨床症状が認められる。複合体 I の *ND* 遺伝子では MELAS, LHON, LS, 複合体 II の *cytochrome b* 遺伝子では運動不耐性ミオパチー<sup>11)</sup> (運動誘発による筋症状), LHON, encephalomyopathy などがみられる。複合体 IV の *COX* 遺伝子では比較的多彩な症候を示す。複合体 V では NARP, MILS, FBSN が報告されている<sup>9)</sup>。

#### ■ nDNA の異常に基づく電子伝達系異常症<sup>12)</sup>

ミトコンドリア呼吸鎖複合体をコードする遺伝子の大部分(約80遺伝子)がnDNAであることは、今後さらにnDNA遺伝子に起因するミトコンドリア病が判明してくる可能性を示唆している。また複合体サブユニットをコードしている遺伝子以外で、サブユニットのassembly, insertionに関与する蛋白などが約60遺伝子あり、複合体活性に関わっている。複合体のサブユニットをコードするnDNAの異常で発症するミトコンドリア病は複合体I, IIにのみみられる。複合体IのNDUF遺伝子異常ではLS, leukodystrophy, encephalomyopathyが、複合体IIのSDH遺伝子異常ではLS, paraganglioma, pheochromocytomaなどの報告がある。他に複合体のサブユニットのassemblyやinsertに関わっている核遺伝子でミトコンドリア病を呈するものはSURF1遺伝子で、その遺伝子異常は複合体IVの低下と臨床症状としてLSが報告されている<sup>13)</sup>。SCO2, COX15はcardioencephalomyopathyに、COX10, SCO1はそれぞれ腎臓、肝臓を障害する。その他

ミトコンドリア内に存在するnDNAにコードされる蛋白でミトコンドリア病がおこることが判明してきている。ophthalmoplegiaを示す症例や、ミトコンドリア多重欠失、mtDNA欠乏を示す例の中に、様々なnDNA遺伝子異常が見出された。それらはthymidine phosphorylase, ANT1, Twinkle, mitochondrial polymerase  $\gamma$ , thymidine kinase-2, deoxyguanosine kinaseなどである(これらは他稿を参照されたい)。ミトコンドリア複合体サブユニットをコードするnDNAで複合体III, IV, Vの遺伝子異常による疾患が見出されないのは、おそらくその欠損は致死的になるためではないかと考えられている<sup>14)</sup>。

#### ■ 今後の展開

ミトコンドリア電子伝達系は複雑な遺伝子のコントロール下で機能している。今後より詳細に検討がなされることにより、疾患の病態生理が判明し、またミトコンドリア病自体の分類も再編成されると思われる。

#### 文 献

- 1) DiMauro S, Bonilla E. Mitochondrial encephalomyopathies. In: Engel AG, Franzini-Armstrong C, editors. Myology. New York: McGraw-Hill; 2004. p. 1623-62.
- 2) Murray RK, 他. 呼吸鎖と酸化的リン酸化(14章). 上代淑人, 監訳. ハーパー・生化学(原書25版). 丸善; 2001. p. 149-61.
- 3) Schwartz M, Vissing J. Paternal inheritance of mitochondrial DNA. N Engl J Med. 2002; 347: 576-80.
- 4) DiMauro S, Davidzon G. Mitochondrial DNA and disease. Ann Med. 2005; 37: 222-32.
- 5) 壺中征哉. VI. ミトコンドリア病. 複合体I欠損症. 日本臨床 領域別症候群シリーズ No 36. 日本臨社; 2001. p. 129-31.
- 6) Shoffner JM. Oxidative phosphorylation diseases. In: Scriver CR, et al, editors. The metabolic & molecular bases of inherited diseases. 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 2367-432.
- 7) 太田成男. ミトコンドリアDNA: その特徴, 遺伝, ヘテロプラズミー, 閾値効果. 臨床検査. 2005; 49: 9-15
- 8) Servidei S. Mitochondrial encephalomyopathies: gene mutation. Neuromuscul Disord. 2000; 10: XVI-XXIV.
- 9) Goto Y. A mutation in the tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> gene associated with MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. Nature. 1990; 348: 651-53.
- 10) Schoffner JM, Lott MT, Lezza AM, et al. Myoclonic epilepsy and ragged red fiber disease(MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA<sup>Leu</sup> mutation. Cell. 1990; 61: 931-7.
- 11) Andreu AL, Hanna G, Reichmann H, et al. Exercise intolerance due to mutations in the cytochrome b gene of mitochondrial DNA. N Engl J Med. 1999; 341: 1037-44.
- 12) Shoubbridge EA. Nuclear gene defects in respiratory chain disorders. Semin Neurol. 2001; 21: 261-7.
- 13) Zhu Z, Yao J, Johns T, et al. SURF1, encoding a factor involved in the biogenesis of cytochrome c oxidase, is mutated in Leigh syndrome. Nature Genet. 1998; 20: 337-43.
- 14) DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial respiratory-chain diseases. N Engl J Med. 2003; 348: 2656-68.

# 重度精神運動発達遅滞児に発症した慢性炎症性脱髄性多発根神経炎 (CIDP)

いしかわ たかみち ふくいえ たつ き  
 石川 貴充\*1-1・福家 辰樹\*1  
 なつめ ひろむね すぎえ ひでお おおげき たけひこ  
 夏目 博宗\*1・杉江 秀夫\*2・大関 武彦\*3

## 要旨

症例は多発小奇形と重度精神運動発達遅滞を基礎疾患にもつ11歳男児。約4カ月の経過で進行する上下肢の筋力低下、歩行障害を主訴に当科入院。末梢神経伝導速度は導出不能、髄液での蛋白細胞解離を認めた。臨床経過、検査所見から慢性炎症性脱髄性多発根神経炎 (CIDP) と診断した。内服ステロイド治療が奏効し、臨床症状の著明な改善を認めた。本疾患は小児においては比較的稀であり、本例のように発達障害を基礎にもつ症例に CIDP が合併した場合の問題点について文献的考察を加えて報告する。

(小児科臨床 59:67, 2006)

**KEY WORDS** ▶ chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP), 奇形症候群, 精神運動発達遅滞, ステロイド

## はじめに

慢性炎症性脱髄性多発根神経 (chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: CIDP) は1975年に Dyck<sup>1)</sup>により提唱された名称であり、慢性・再発性経過を特徴とする炎症性の末梢性脱髄性疾患である。診断には、少なくとも2カ月以上の経過で生じる一肢以上の進行性または再燃性運動感覚性末梢神経障害、そして四肢の深部腱反射の低下または消失が必須項目となる<sup>2)</sup>。今回我々は、多発小奇形と重度精神運動発達遅滞を基礎疾患にもつ CIDP の1小児例を経験したので報告する。

## 症 例

症例：11歳，男児

主訴：上下肢の脱力，歩行障害

既往歴：平成元年3月20日在胎38週にて出生。出生体重2,400g，新生児仮死あり。多発小奇形を認めた。8歳時に独歩可能，有意語なし。言語理解は不明であるが，声かけに対して笑顔が認められた。日常生活動作は全介助。難聴なし。現在養護学校に通学中。

家族歴：特記すべき事項なし。

現病歴：平成12年5月初旬ごろ（11歳）から歩き方がおかしい（力が入らない）様子で，約1週間前から立とうとせず，ハイハイ

\*1：榛原総合病院 小児科（〒421-0493 静岡県榛原郡榛原町細江2887-1），\*2：浜松市発達医療総合センター，\*3：浜松医科大学医学部 小児科，\*1-1：現 浜松医科大学医学部 小児科（〒431-3192 静岡県浜松市半田山1丁目20-1）

するようになったため、平成12年6月2日当科外来を受診した。その後当院の整形外科、脳神経外科も受診した。頭部 CT、脊髄 MRI を施行したが異常なし。7月14日当科を再診、7月27日に検査入院した。入院後頭部 MRI 施行するも異常を認めず、末梢運動神経伝導速度導出不能、髄液蛋白615mg/dlと上昇を認めた。CIDP が疑われ、8月3日治療目的にて当科に再入院した。

入院時身体所見：身長131cm (-1.8SD)、体重15.1kg (-2.9SD)、意識清明。心肺腹部に異常所見なし。[頭部・顔面] 小頭、前額部突出、眼間開離、低い鼻梁。[四肢] 指・手・肘・足・膝関節運動制限。[筋骨格] 脊柱後側彎。独歩は不可能で起立も困難であった。

徒手筋力テストでは上腕二頭筋・三頭筋で3/5、大腿四頭筋・腓腹筋で1/5、腸腰筋・母指球筋・小指球筋は検査不能であった。深部腱反射は上・下肢とも消失、病的反射は認め

られなかった。

入院時検査所見：末梢血一般検査、検尿、血液生化学、血沈、免疫学的検査は、血沈軽度亢進、中性脂肪軽度上昇、尿中白血球陽性以外は異常なし。髄液検査は著明な蛋白細胞解離を呈した(表1)。血清中抗ガングリオシド自己抗体(GM<sub>1</sub>, GD<sub>1b</sub>, GQ<sub>1b</sub>)は陰性、myelin-associated glycoprotein (MAG), sulfoglucuronosyl paragloboside (SGPG)も陰性であった。末梢神経伝導速度は、左正中神経、左腓骨神経ともに導出不能であった(表2)。

臨床経過：上記経過および臨床症状から、米国神経学アカデミーの診断基準<sup>2)</sup>により、probable CIDP と診断した。8月4日よりプレドニゾロン30mg (2.0mg/kg/日)、ビタミンB<sub>12</sub>1,000μg/日の連日投与を開始した。投与開始5日目からズリ這いが、25日目から座位が、41日目からつかまり立ちが可能になるなど、明らかな臨床症状の改善が認められ

表1 入院時検査所見

血液一般検査		免疫学的検査	
WBC	5.8×10 <sup>3</sup> /μl	T.Chol	185mg/dl
RBC	4.36×10 <sup>4</sup> /μl	TG	155mg/dl
Hb	12.2g/dl	Na	139mEq/L
Ht	36.0%	K	4.2mEq/L
Plt	27.7×10 <sup>4</sup> /μl	Cl	96mEq/L
血液生化学検査		Ca	9.6mg/dl
TP	7.4g/dl	Glucose	92mg/dl
Alb	4.3g/dl	CRP	0.08mg/dl
AST	22IU/l	ESR	15.0mm/h
ALT	11IU/l	髄液検査	
LDH	377IU/l	細胞数	1/μl(リンパ球1)
CK	151IU/l	糖	74g/dl
ALP	287IU/l	Cl	120mEq/L
γ-GTP	11IU/l	蛋白	615mg/dl
LAP	59IU/l	糖	IgG 42.1mg/dl
BUN	12.0mg/dl	ケトン体	オリゴクロナール (-)
Cr	0.4mg/dl	潜血	バンド
UA	4.1mg/dl	白血球	(2+)
			ミエリン塩基性蛋白
			≤0.5ng/ml

表 2 運動神経伝導速度所見

Date of Exam.	Nerve	MCV (m/sec)	CMAP (mV) Dist/Prox	DL (msec)
Aug. 4, 2000	Rt. Median Rt. Ulnar Rt. Tibial	導出不能		
	Lt. Median Lt. Ulnar LRt. Tibial	導出不能		
Sep. 7, 2000	Rt. Median	14.08	0.44/0.75	39.2
	Rt. Ulnar	3.78	1.40/1.01	31.4
	Rt. Tibial	6.19	0.13/0.16	63.0
	Lt. Median	6.03	0.14/0.70	29.7
	Lt. Ulnar	3.75	0.90/0.72	29.4
	Lt. Tibial	8.42	0.15/0.16	48.2

た。治療開始71日目には手をつないで歩けるようになった。末梢神経伝導速度は、治療開始65日目で、低下しているものの導出可能になった(表2)。髄液蛋白は、治療開始63日目には111mg/dlに低下した。プレドニゾロンは投与開始36日目より漸減。経過良好にて12mg隔日投与の段階で10月18日(入院77日目)に退院した。退院後の経過も良好で、治療開始100日目には独歩可能になった。深部腱反射は、治療開始128日目ごろから認められるようになった。現在、発症以前とほぼ同等の日常生活が可能となっている。

## 考 察

本症例では、発症から治療開始までに約3カ月を要した。その理由として、患児は重度の精神運動発達遅滞を基礎にもつ発達障害児であったため、患児からの意思伝達による症状聴取が困難であり、発症当初「歩かないのか」それとも「歩けないのか」を区別することが難しかった。しかし、神経学的所見から末梢性のニューロパチーが疑われ、検査所見も含めCIDPの診断基準(“probable CIDP”)<sup>2)</sup>を満たすニューロパチーと診断した。

本邦におけるCIDPの有病率は、人口10

万人あたり1~1.5と推定されており<sup>3)</sup>、新生児、乳児を含めたあらゆる年齢層にみられると報告されている<sup>14)5)</sup>。しかしながら本邦では、15歳以下の小児についてCIDPの報告は少ない<sup>6)-19)</sup>。これについては、1991年に米国神経学アカデミーにてCIDPの診断基準が提唱されるまでは疾患概念が不明瞭であったため、CIDPの患者が見過ごされてきた可能性が指摘されている<sup>15)</sup>。

CIDPは運動、感覚系の末梢神経に起こる慢性進行性あるいは再発性の脱髄性多発根神経炎で、脱髄の機序は不明な点も多いが、免疫学的異常と考えられている<sup>20)</sup>。このため本症例に対しては副腎皮質ステロイド療法や免疫抑制剤の投与、免疫グロブリン大量投与など、免疫状態の適正化が治療法として試みられている。本症例では副腎皮質ステロイドが奏効し、ステロイド減量中に症状の再発は認められなかった。報告されている小児の治療例については、15症例中ステロイド(パルス療法を含む)療法が10例、 $\gamma$ グロブリン療法が2例、血漿交換療法が1例、自然軽快が1例であり、ステロイド療法を選択した症例が多かった(表3)。 $\gamma$ グロブリン療法、血漿交換療法の症例についても当初はステロイド

表 3 本邦における CIDP の報告例

報告者	報告年度	性	発症年齢	基礎疾患	治療内容	ステロイド反応性	MAG	SGPG	GM 1	GD 1 b
須貝ら	1986	男	2歳	なし	プレドニゾロン	有	—	—	—	—
目崎ら	1988	女	14歳	なし	血漿交換療法	無	—	—	—	—
酒井ら	1989	女	12歳	—	プレドニゾロン	有	—	—	—	—
松岡ら	1989	男	11歳	なし	プレドニゾロン	有	—	—	—	—
山本ら	1989	女	12歳	—	なし(自然軽快)	無	—	—	—	—
熊沢ら	1989	男	13歳	—	—	—	—	—	—	—
Takuら	1990	女	8歳	なし	γグロブリン	無	—	—	—	—
馬場ら	1992	男	12歳	遺伝性運動ニューロパチー	γグロブリン	無	—	—	—	—
若井ら	1992	女	13歳	—	プレドニゾロン	有	—	—	—	—
渡辺ら	1993	女	11歳	なし	プレドニゾロン	有	—	—	陰性	陰性
小林ら	1993	男	11歳	なし	プレドニゾロン	有	—	—	—	—
小林ら	1993	女	5歳	—	プレドニゾロン	有	—	—	—	—
青戸ら	1997	女	8歳	—	プレドニゾロン	有	×800	—	—	—
青戸ら	1997	男	7歳	—	プレドニゾロン	有	—	—	—	—
青戸ら	1997	女	12歳	—	プレドニゾロン	有	—	—	0.228	0.207
本症例	2002	男	11歳	重度精神運動発達遅滞	プレドニゾロン	有	陰性	陰性	陰性	陰性

注 — : 報告なし

療法が選択されている。このように小児 CIDP の治療について、現時点では副腎皮質ステロイド療法が主体となっている。しかし、CIDP は病状も経過も症例ごとに様々で、各治療法の効果も完全とはいえず、副作用、費用の問題もあることから、症例ごとに適切な治療法の選択が必要であろう。

近年、脱髄性末梢神経疾患において、髄鞘に対する抗体が各種検出され、病態解明の手掛かりとして注目されている。そのひとつに血清抗 GM<sub>1</sub> 抗体がある。末梢神経の髄鞘は、主に蛋白質と脂質から構成されている。脂質の主体性分であるガングリオシドは主として GM<sub>1</sub> および GD<sub>1a</sub> から構成されており、その GM<sub>1</sub> に対する抗体が M 蛋白血症ともなうニューロパチーや、運動神経障害を主体とするニューロパチーで認められることが報告されている<sup>21)22)</sup>。CIDP に関しては、抗 GM<sub>1</sub> 抗体が検出された報告が散見されては

いるが、運動ニューロン疾患や多巣性運動ニューロパチー例と比べ陽性頻度は低い<sup>23)</sup>。本症例においても、抗 GM<sub>1</sub> 抗体は陰性であった。

最近では、ガングリオシド抗体以外の酸性糖脂質に対する血清中の自己抗体が注目されている。ひとつは myelin-associated glycoprotein (MAG) であり、もうひとつは sulfoglucuronosyl paragloboside (SGPG) である。MAG が中枢神経系にも多量に含まれるのに対し、SGPG は末梢神経に特異的な糖脂質であり、多発神経炎患者の血中抗体の標的抗原である可能性が議論されている。SGPG は強い免疫原性を持ち、末梢神経炎の標的になり得るため、抗 SGPG 抗体陽性の症例ではステロイド治療抵抗性を呈する例もある<sup>24)</sup>。本症例では MAG、抗 SGPG 抗体とも陰性であり、ステロイド治療奏効との関連性も示唆された。

## 結 語

CIDP の11歳男児例を報告した。本症例はステロイド内服治療が奏効した。小児期発症のCIDPの報告を比較し、ステロイド反応性は本症例も含めた14例中13例(92.9%)に認められた。患児は多発小奇形と重度精神運動発達遅滞を基礎にもっており、他覚的な神経学的所見の重要性をあらためて考えさせる貴重な症例と思われた。

## 文 献

- 1) Dyck PJ et al: Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Mayo Clin Proc* 50: 621~637, 1975
- 2) Ad Hoc Subcommittee of the American Academy of Neurology AIDS Task Force: Research criteria for diagnosis of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP). *Neurology* 41: 617~618, 1991
- 3) 馬場正之: Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy - multifocal demyelinating neuropathy -. *脳神経* 44: 709~718, 1992
- 4) McCombe PA, Pollard JD, McLeod JG: Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. A clinical and electrophysiological study of 92 cases. *Brain* 110: 1617~1630, 1987
- 5) Prineas JW, McLeod JG: Chronic relapsing polyneuritis. *J Neurol Sci* 27: 427~458, 1976
- 6) 若井周治: Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy の1 女児例. *臨床小児医学* 40: 181~184, 1992.
- 7) 須貝研司: 慢性再発性多発神経炎. *小児科* 27: 1367~1379, 1986
- 8) 目崎高広: 血漿交換療法が劇的な効果を示した慢性再発性多発神経炎. *神経内科* 29: 167~171, 1988
- 9) 酒井規雄: 慢性脱髄性脳脊髄末梢神経炎. *神経内科* 30: 30~37, 1989
- 10) 松岡幸彦: Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy の臨床特徴. *神経内科* 31: 1~7, 1989
- 11) 山本辰紀: Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy における腓腹神経の組織学的所見. *神経内科* 31: 8~14, 1989
- 12) 熊沢和彦: 慢性再発性・進行性多発根神経炎の自律神経障害. *臨床神経* 29: 994~999, 1989
- 13) Taku T, Tamura T, Miike T: Gammaglobulin therapy in a case of chronic relapsing dysimmune polyneuropathy. *Brain Dev* 12: 247~249, 1990
- 14) 馬場正之: 小児の慢性炎症性脱髄性根神経炎 (CIDP): 遺伝性ニューロパチーとの症候学的類似点とその臨床的問題点. ニューロパチーの臨床と病態に関する研究班平成3年度研究報告書, p.121~124, 1992
- 15) 小林由美子: 慢性炎症性脱髄性根神経炎 (CIDP) の1 小児例. *東女医大誌* 63(臨時増刊): 285~292, 1993
- 16) 永富文子: 乳児期発症の慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチーの1 例. *日本内科学会雑誌* 88: 704~706, 1999
- 17) 織田雅也: 著明な onion bulb 様の病理変化を呈し遺伝性末梢神経障害に類似した慢性再発性脱髄性多発根神経炎の若年発症例. *脳神経* 51: 1075~1079, 1999
- 18) 渡辺幸恵: 慢性炎症性脱髄性多発根神経炎を合併した多発性硬化症. *脳と発達* 25: 70~75, 1993
- 19) 青戸和子: 小児期発症の慢性脱髄性多発ニューロパチーの長期治療における臨床的検討. *北里医学* 27: 45~51, 1997
- 20) Dyck PJ, Prineas J, Pollard J: Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. In *peripheral neuropathy*, 3rd ed, ed by Dyck PJ, Thomas PK, Griffin JW, et al, W.B. Saunders, Philadelphia, p.1498~1571, 1993
- 21) Pestronk A, Chaudhry V, Feldman E L: Lower motor neuron syndromes defined by patterns of weakness, nerve conduction abnormalities, and high titers of antiglycolipid antibodies. *Annals of Neurology* 27: 316, 1990
- 22) Sadiq S A, Thomas F P, Kilidireas K: The spectrum of neurologic disease associated with anti-GM1 antibodies. *Neurology* 40: 1067, 1990
- 23) 西尾建資, 梶 龍児: 抗 GM1 ガングリオシド抗体と神経系. *診断と治療* 81: 715~719, 1993
- 24) 山脇正永, 水澤英洋: 硫酸化グルクロン酸含有糖脂質 (SGPG) と末梢神経疾患. *脳の科学* 20: 1129~1134, 1998

# Histopathological and Behavioral Improvement of Murine Mucopolysaccharidosis Type VII by Intracerebral Transplantation of Neural Stem Cells

Yasuyuki Fukuhara,<sup>1,2</sup> Xiao-Kang Li,<sup>3</sup> Yusuke Kitazawa,<sup>3</sup> Masumi Inagaki,<sup>4</sup> Kentaro Matsuoka,<sup>5</sup> Motomichi Kosuga,<sup>1</sup> Rika Kosaki,<sup>1,2</sup> Takuya Shimazaki,<sup>6</sup> Hitoshi Endo,<sup>7</sup> Akihiro Umezawa,<sup>8</sup> Hideyuki Okano,<sup>6</sup> Takao Takahashi,<sup>2</sup> and Torayuki Okuyama<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Clinical Genetics and Molecular Medicine, <sup>2</sup>Department of Innovative Surgery, <sup>3</sup>Department of Reproductive Biology, and

<sup>5</sup>Department of Pathology, National Center for Child Health and Development, 2-10-1 Okura, Setagaya-ku, Tokyo 157-8535, Japan

<sup>2</sup>Department of Pediatrics and <sup>6</sup>Department of Physiology, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan

<sup>4</sup>National Center of Neurology and Psychiatry, 1-7-1 Koumodai, Ichikawa-shi, Chiba 272-8516, Japan

<sup>7</sup>Biochemistry of Experimental Medicine, Jichi Medical School, Minamikawachi-machi, Kawachi-gun, Tochigi 329-0498, Japan

\*To whom correspondence and reprint requests should be addressed. Fax: +81 3 3416 2222. E-mail: okuyama-t@ncchd.go.jp.

Available online 28 November 2005

The therapeutic efficacy of neural stem cell transplantation for central nervous system (CNS) lesions in lysosomal storage disorders was explored using a murine model of mucopolysaccharidosis type VII (MPS VII). We used fetal neural stem cells derived from embryonic mouse striata and expanded *in vitro* by neurosphere formation as the source of graft materials. We transplanted neurospheres into the lateral ventricles of newborn MPS VII mice and found that donor cells migrated far beyond the site of injection within 24 h, and some of them could reach the olfactory bulb. A quantitative measurement indicated that the GUSB activity in the brain was 12.5 to 42.3% and 5.5 to 6.3% of normal activity at 24 h and 3 weeks after transplantation. In addition, histological analysis revealed a widespread decrease in lysosomal storage in the recipient's hippocampus, cortex, and ependyma. A functional assessment with novel-object recognition tests confirmed improvements in behavioral patterns. These results suggest that intracerebral transplantation of neural stem cells is feasible for treatment of CNS lesions associated with lysosomal storage disorders.

**Key Words:** neurosphere, mucopolysaccharidosis type VII, intracerebral transplantation

## INTRODUCTION

Mucopolysaccharidosis type VII (MPS VII), or Sly syndrome, is a congenital lysosomal storage disorder (LSD) characterized by a systemic deficiency of  $\beta$ -glucuronidase (GUSB) activity [1]. This defect results in a progressive accumulation of undegraded glycosaminoglycans and subsequent lysosomal distension in multiple tissues, including the central nervous system (CNS). Enzyme replacement therapy and bone marrow transplantation are effective for correcting visceral manifestations of the disorder [2,3]. However, effective treatment of the CNS in patients with LSDs remains a major challenge.

With respect to cell therapy directed to the CNS in an MPS VII mouse, there are reports that the intracerebral transplantation of a genetically engineered neural pro-

genitor [4] and retrovirally transduced syngeneic fibroblasts [5] corrected the lysosomal storage of the recipient's brain tissues. We also previously reported that adenovirally transduced rat amniotic epithelial cells injected into adult MPSVII mouse brains survived at the injection point for more than 9 weeks and the subsequent supply of enzyme resulted in pathological improvement in multiple areas of the MPS VII mouse brains [6].

In this study, we used fetal neural stem cells derived from embryonic mouse striata and expanded *in vitro* by neurosphere formation [7,8] as the source of graft materials. Neural stem cells are considered to be good candidates for cell therapy to treat CNS dysfunction. In fact, fetal neural tissues have been successfully used in human Parkinson disease patients [9,10]; however, as many as four to eight fetuses were required to obtain a sufficient number of cells to treat a single patient. Expansion of neural stem cells *in vitro* may overcome the above practical

Abbreviations used: CNS, central nervous system; GUSB,  $\beta$ -glucuronidase; MPS VII, mucopolysaccharidosis type VII.



and ethical problems associated with fetal tissue transplantation and provide a source for graft material.

Here we describe improvements in the histopathology of the hippocampus, cortex, and ependyma and in non-spatial hippocampus-dependent learning and memory evaluated in a novel-object recognition test at 2 months after transplantation. These data suggest that early transplantation of neurospheres into the CNS may prevent or delay some of the progressive mental impairment associated with this LSD.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Production and Secretion Capacity of GUSB Enzymes by Neurospheres

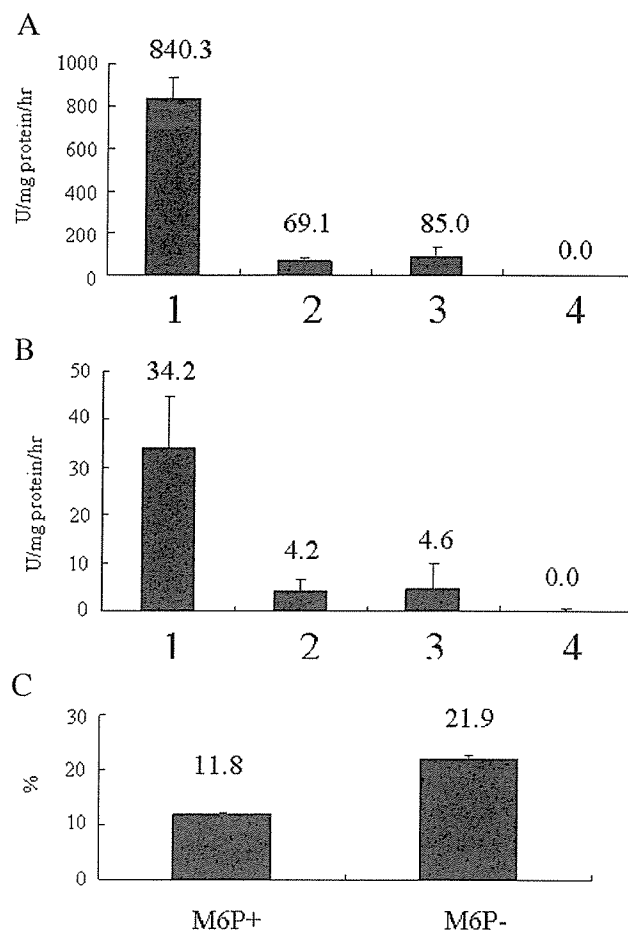
The neurosphere is a floating cell cluster containing plenty of neural stem cells and is generated from a fetal mouse brain by neurosphere formation [7,8]. Briefly, when we culture fetal corpus striatum containing neural stem cells in a serum-free medium with growth factors, only neural stem cells can survive and form floating cell clusters called neurospheres. We initially determined the endogenous GUSB activity of neurospheres obtained from normal C57BL/6 mice. The GUSB activity of the neurosphere and its culture medium proved significantly higher than that of bone marrow cells (Figs. 1A and 1B). We also evaluated the difference in GUSB activity before and after differentiation. Most neurospheres differentiate into neural cells *in vivo* according to their microenvironments after transplantation [8]. The GUSB activities in differentiated cells and their culture media were almost equivalent to those of bone marrow cells, suggesting that the GUSB activity of the neurospheres was reduced, although it was maintained to the extent necessary for a therapeutic effect even after differentiation.

### Intercellular Transport of the GUSB Enzyme

It is well known that most lysosomal enzymes can be taken up into cells by M6P receptor-mediated endocytosis, and that this process is efficiently blocked in the presence of M6P [11]. When we transferred the culture medium of neurospheres generated from C57BL/6 fetal mouse brains to dishes of the primary culture of neurons generated from C3H mice, 21.9% of the heat-stable C57BL/6 mouse-derived GUSB in the culture medium was internalized into the neurons in the absence of M6P (Fig. 1C). In contrast, it was significantly reduced in the presence of 10 mM M6P (Fig. 1C). This suggests that endocytosis by M6P receptors leads to the internalization of the GUSB enzyme secreted from the neurospheres to the neurons.

### Lysosomal Enzyme Activities of the Neurosphere

Many LSDs display CNS symptoms. Most lysosomal enzymes have common transport systems mediated by the M6P receptor, and therefore the same transplantation



**FIG. 1.** Neurosphere GUSB activities and secretion via cell-to-cell transport. Lanes 1, neurospheres; 2, differentiated cells from neurospheres; 3, bone marrow cells; 4, 3521 cells (fibroblasts that originated from an MPS VII mouse). The GUSB activities of the neurosphere and its culture medium proved significantly higher than those of bone marrow cells. The GUSB activity in differentiated cells from neurospheres and that of its culture medium were almost equivalent to those of bone marrow cells. (A) GUSB activity in cell pellets of the neurosphere, bone marrow, and 3521 cells. (B) GUSB activity in a culture medium of the neurosphere, bone marrow, and 3521 cells at the time of the first passage. (C) Cell-to-cell transport of GUSB secreted from neurospheres. The ratio of the heat-stable GUSB activity in C3H mouse neural cells to the total heat-stable GUSB activity in the culture medium was calculated. The means  $\pm$  standard errors are provided.

strategy could be available if neurospheres can produce and secrete significant amounts of lysosomal enzymes. We determined the specific activities of several lysosomal enzymes in neurospheres and compared them with those in marrow stromal cells and human granulocytes. Similar or higher activities of lysosomal enzymes were identified in the neurosphere (Table 1).

### Distribution of Donor Cells after Neonatal Transplantation

We performed a syngeneic transplantation experiment using neurospheres obtained from CAG-EGFP transgenic

**TABLE 1: Activities of lysosomal enzymes in the neurosphere and their related diseases<sup>a</sup>**

Lysosomal enzyme	Disease	Neurosphere	MSC <sup>b</sup>	Granulocytes
$\alpha$ -L-Iduronidase	MPS I	39.2	57.4	56–201 (n = 6)
Iduronate sulfatase	MPS II	40.5	20	12–26 (n = 5)
Heparan-N-sulfatase	MPS IIIA	1.1	4.3	0.2–3 (n = 4)
GalNAc-6-S-sulfatase	MPS IVA	5.3	15.2	8.1–20 (n = 5)
Arylsulfatase B	MPS VI	55.3	15.5	9–32 (n = 5)
$\beta$ -Glucosidase	Gaucher disease	3.0	6.5	0.2–0.6 (n = 100)
$\alpha$ -Galactosidase A	Fabry disease	189	68.8	49.8–116.4 (n = 48)
$\beta$ -Galactosidase	MPS IVB	501	309	37.6–230.1 (n = 100)
$\alpha$ -Mannosidase	$\alpha$ -Mannosidosis	61.0	48.0	121.1–345.1 (n = 100)
$\beta$ -Hexosaminidase	Sandhoff disease	1024	3062	401.7–1426.0 (n = 100)
$\beta$ -Hexosaminidase A	Tay-Sachs disease	527	481	251.1–607.4 (n = 48)
Arylsulfatase A	MLD	435	278	109.0–217.2 (n = 100)

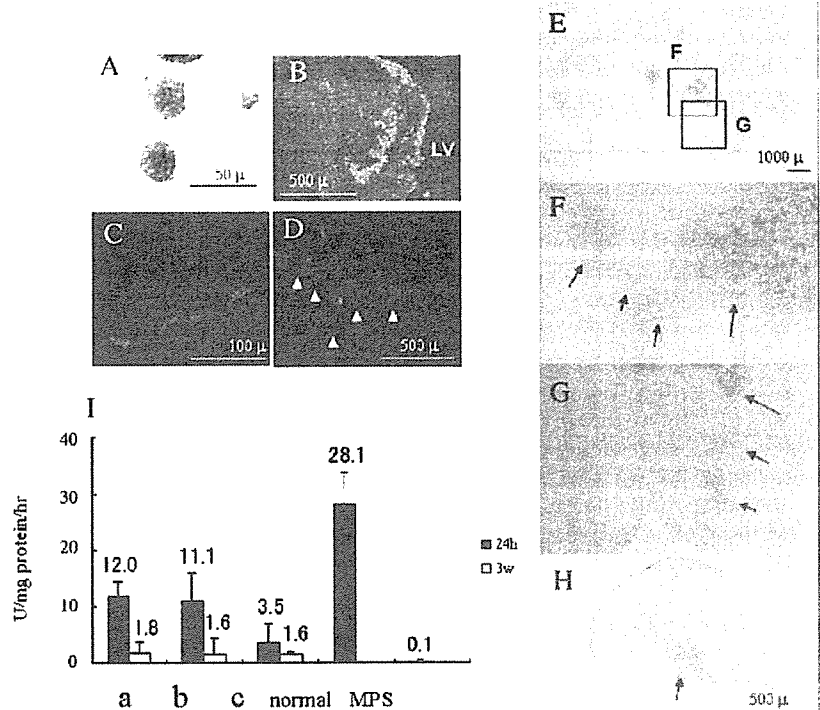
<sup>a</sup> We quantitatively assayed for a variety of lysosomal enzymes as well as GUSB. Several kinds of lysosomal enzymes were found to be high in the neurosphere. This result suggests that the neurosphere may be applied for the treatment of different types of congenital metabolic disorder. Data are given in nmol/mg protein/h. Enzyme activities in human granulocytes were measured as described elsewhere [27].

<sup>b</sup> MSC, marrow stromal cell.

mice (C57BL/6 background) as donor cells and newborn MPS VII mice as recipients. We injected  $2.5\text{--}5 \times 10^4$  neurospheres (Fig. 2A) into the lateral ventricles of neonatal MPS VII mice within 1 to 3 days after delivery. A large number of donor cells were located mainly in the periventricular area at the hippocampus level in the brain, but a small number of GFP-positive cells were observed at varying distances away from the periventricular area at 24 h (Fig. 2B). We identified some of the GFP-positive cells in a linear formation at the level of the olfactory bulb, indicating a specific manner of migration in this area that is referred to as chain migration [12] (Fig. 2C). The overall distribution of the donor cells throughout the brain was essentially identical in all mice examined histologically (n = 3), with findings similar to previous reports [4,13–15]. There was evidence of GUSB

activity in the recipient brain tissue. The recipient brain was stained red by GUSB staining in accordance with the GFP-positive area. (E–G) Coronal sections of the telencephalon at the caudal level. (H) Olfactory bulb. (I) Quantitative determination of the GUSB activity was performed at 24 h and 3 weeks after transplantation. The brains of the transplant recipients were divided coronally into three parts and quantitatively assayed for GUSB activity (n = 3). The regions used for evaluation at the designated times were defined by anatomical landmarks in the anterior-to-posterior plane: a, olfactory bulbs; b, caudal edge of the olfactory bulbs to the rostral edge of the hippocampus; c, hippocampus to the posterior colliculus. The cerebellum was dissected free and was not included in the assay.

**FIG. 2.** Distribution of the donor cells in a mouse brain following transplantation of neurospheres. (A) Neurospheres generated from GFP transgenic mice under a fluorescence microscope. (B) A slice at the hippocampus level in the brain at 24 h after transplantation under a fluorescence microscope. GFP-positive cells were located mainly in the periventricular area. (C) A slice at the olfactory bulb level in the brain at 24 h after transplantation. GFP-positive cells were also detected under a fluorescence microscope; some of them were found to form a line (a chain migration). (D) A slice at the hippocampus level in the brain under a fluorescence microscope at 3 weeks after transplantation. GFP-positive cells were found to be branched and to form a network with the recipient brain tissue. (E–H) The brain of an MPS VII mouse at 24 h after transplantation of neurospheres. The recipient brain was stained red by GUSB staining in accordance with the GFP-positive area. (E–G) Coronal sections of the telencephalon at the caudal level. (H) Olfactory bulb. (I) Quantitative determination of the GUSB activity was performed at 24 h and 3 weeks after transplantation. The brains of the transplant recipients were divided coronally into three parts and quantitatively assayed for GUSB activity (n = 3). The regions used for evaluation at the designated times were defined by anatomical landmarks in the anterior-to-posterior plane: a, olfactory bulbs; b, caudal edge of the olfactory bulbs to the rostral edge of the hippocampus; c, hippocampus to the posterior colliculus. The cerebellum was dissected free and was not included in the assay.



staining in accordance with the GFP-positive area, indicating a rise in GUSB activity (Figs. 2E–2I).

We previously reported that neurosphere-derived donor neurons extend their processes into the host tissues and form a synaptic structure [8]. The GFP-positive cells had extended their processes and formed synaptic structures as well 3 weeks after transplantation (Fig. 2D). These data suggest that the donor cells migrated from the periventricular area and some of them reached the olfactory bulb as early as 24 h after transplantation.

### Quantitative Gusb Assay in Transplanted Mouse Brains

We divided the brains of the transplant recipients coronally into three parts and quantitatively assayed them for GUSB activity at 24 h ( $n = 3$ ) and 3 weeks ( $n = 3$ ) after transplantation (Fig. 2I). GUSB activity was 12.5 to 42.3% of normal activity at 24 h. There was 5.5 to 6.3% of normal activity at 3 weeks after transplantation. This is an amount at which that lysosomal distensions in the neuron and glia could also be reversed [16]. These

results imply that donor cells provided the recipient brain with GUSB activity to the extent that lysosomal storage in the recipient brain could be prevented for at least 3 weeks.

### Histological Analysis and Tumorigenesis Assessment of the Treated Mice

We tested the treated MPS VII mice for reduction of lysosomal distensions in the neurons and glia at 2 months after transplantation ( $n = 2$ ) (Figs. 3 and 4). We performed a histological analysis on hippocampus, cortex, and ependyma using an optical microscope (hippocampus, cortex, and ependyma) and an electron microscope (cortex). In the hippocampus of the untreated MPS VII mice, most of neurons contained marked cytoplasmic vacuolation (lysosomal storage) as well as astrocytes. In contrast, those of the treated hippocampuses were almost eliminated especially from neurons in this area. In the cortices, we also observed extensive neuronal and glial vacuolation, and the treatment reduced them remarkably as well. An electron microscope demonstrated that lysosomal storage in some neurons was completely eliminated in this area

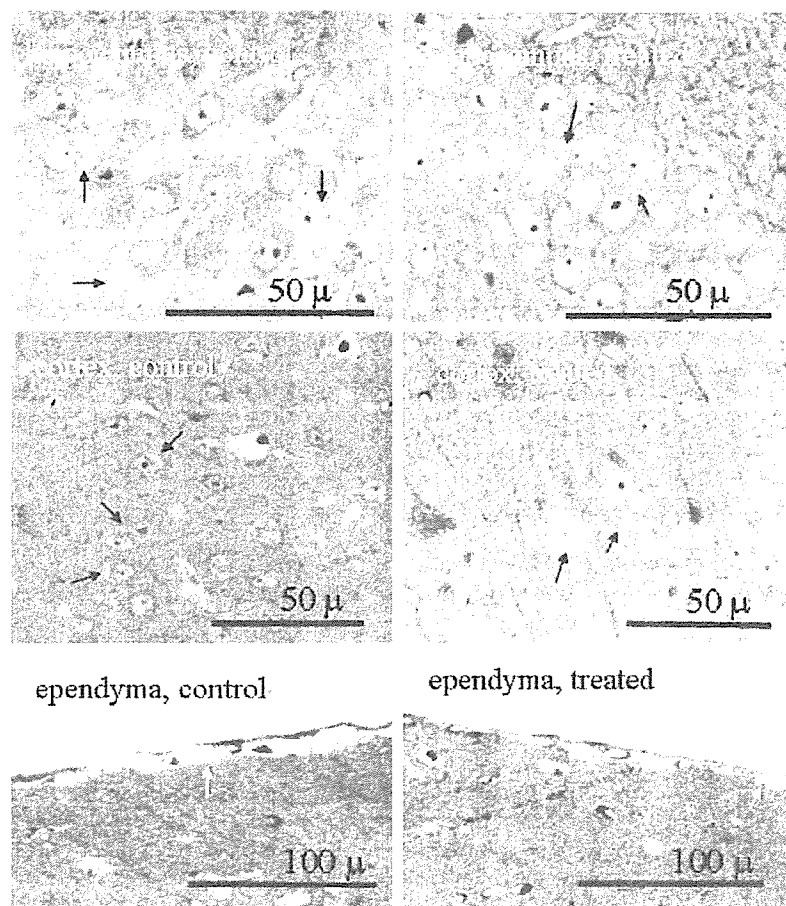
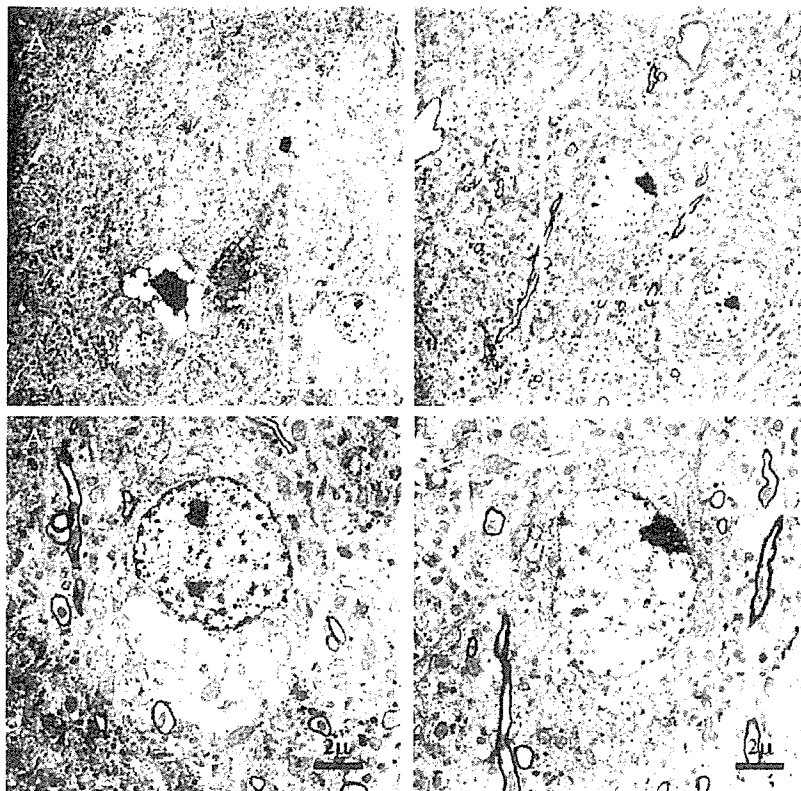


FIG. 3. Toluidine blue-stained, 0.5- $\mu$ m-thick sections from the hippocampus, cortex, and ependyma are from 2-month-old MPS VII mice ( $n = 2$ ). Intraventricular injection of neurospheres decreases lysosomal storage in the hippocampus, cortex, and ependyma. Black arrows indicate distended vacuoles in neurons; white arrows indicate storage in glia.

**FIG. 4.** Electron microscopic analysis of lysosomal storage in a mouse brain following transplantation of neurospheres. (A) Cortex of a control untreated MPS VII mouse at 2 months after transplantation. Abundant white cytoplasmic vacuoles represent distended lysosomes. (B) Cortex of a MPS VII mouse at 2 months after transplantation. Lysosomal storage granules in this area were remarkably reduced in size and number, and those in some neurons were completely eliminated. (A' and B') Magnified photographs of the circumscribed areas in (A) and (B).



(Fig. 4). In the ependyma, the amount of storage appeared to be significantly reduced in the treated mice. To evaluate quantitatively the improvement of the pathology in the treated mice, we counted neurons and glia containing apparent vacuolation in each hippocampus and cortex of the treated and the untreated mice ( $n = 2$ , total 300 cells in each area) in the HPF ( $\times 600$ ). In both areas, we observed a remarkable decrease in the number of neurons and glia with apparent lysosomal storage, and this finding was almost equal in two treated mice, indicating an improvement of the pathology in the treated mouse brains (Table 2). We carefully assessed all transplanted mice for the presence of tumorigenesis. We dissected the brains of the

dead mice during the course of the study and macroscopically analyzed them for tumor formation, but we could not identify any tumor formation among them.

#### Mouse Hearing Acuity Assessment

Measurements of the auditory brain-stem response (ABR) have been useful in assessing functional improvements after treatment [17]. We tested three treated MPS VII mice, three untreated MPS VII mice, and three C57BL/6 mice. There was no significant difference in the ABR thresholds among the treated and the untreated MPS VII mice (Fig. 5A). It is well known that malalignment and focal loss of stereocilia occur as the disease progresses, leading to a sensorineural hearing loss [18]. As the ABR was performed at 2 months, it may have been too early to assess the sensorineural hearing loss.

#### Behavioral Assessment

We used a novel-object recognition test, a tool for studying nonspatial hippocampus-dependent memory, to determine whether an improvement in mental status could be achieved by transplantation [19–21]. We carried out this test as described [19] with several modifications at 2 months after transplantation ( $n = 3$ ). We used normal siblings of the treated MPS VII mice as the control mice. In summary, after the mice were habituated to an open field, two yellow objects (A, B) were placed diagonally in

**TABLE 2:** The percentage of cells with apparent vacuolization in the brain of MPS VII mice treated with intraventricular injection of neurospheres<sup>a</sup> ( $n = 2$ )

	Untreated	Treated
Hippocampus	89.3%	17.3%
Neuron	90%	18.4%
Glia	92%	13.9%
Cortex	42%	15.3%
Neuron	37.7%	11.7%
Glia	55.6%	30%

<sup>a</sup> Toluidine blue sections of hippocampus and cortex were analyzed for lysosomal distention, and we counted neurons and glia containing much vacuolation in 300 cells in each of hippocampus and cortex in the HPF ( $\times 600$ ).

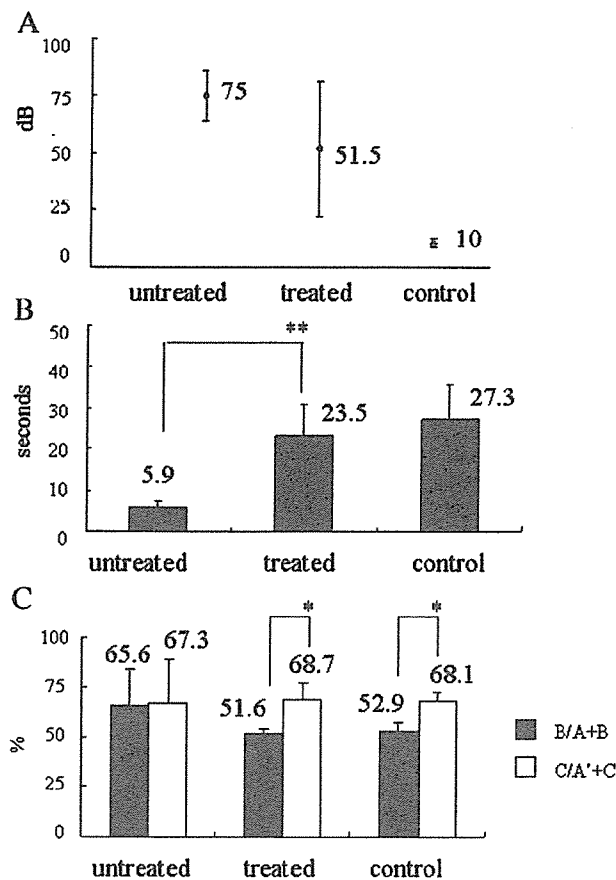


FIG. 5. Assessment of the functional recovery at 2 months after transplantation. (A) Auditory-evoked brain-stem responses. The decibels required to elicit ABR at the broadband (clicks) were evaluated among three normal mice, three treated MPS VII mice, and three untreated MPS VII mice at 2 months after transplantation. There was no significant difference in the ABR thresholds among the treated MPS VII mice and the untreated MPS VII mice. (B) The novel-object recognition test. The mice were assessed for an improvement in hippocampus-dependent nonspatial memory by a novel-object recognition test ( $n = 3$ ). The total time spent exploring objects on day 4 ( $=A + B$ ) in the treated mice was significantly longer than that for the untreated mice. (\*\* $P < 0.01$ ). (C) The novel-object recognition test (retention test). The percentage of time spent in exploring B as a portion of the total object exploration time on day 4 [ $B/(A + B)$ ] was compared with that of C (the novel object) on day 5 [ $C/(A' + C)$ ].  $C/(A' + C)$  in the C57BL/6 and the treated mice was significantly greater than  $B/(A + B)$ . This suggests that the normal mice and the treated mice spent a significantly longer time exploring the novel object, revealing that both groups had a significant preference for exploring the novel object. The means  $\pm$  standard errors are provided.

the open field on day 4, and the mice were allowed to explore them for 10 min. Object B was replaced with a novel object (C) and the other object was replaced with a replica (A') on day 5, and the mice were again allowed to explore them for 10 min. Normal animals prefer to explore the novel object more than the familiar object. From the degree of preference for exploration of the new object, it can be inferred that they retained a memory of the familiar object. The total time spent exploring object

A or B on day 4 ( $=A + B$ ) was  $27.3 \pm 8.4$  s in the normal mice,  $23.5 \pm 7.4$  s in the treated mice, and  $5.9 \pm 1.6$  s in the untreated mice (Fig. 5B), indicating that the normal and the treated mice had the same levels of motivation, curiosity, and interest in exploring objects. Next, to evaluate preferential exploration of the novel object, we compared the percentage of time spent exploring object B as a portion of the total object-exploration time on day 4 [ $=B/(A + B)$ ] with that of object C (the novel object) on day 5 [ $=C/(A' + C)$ ] (Fig. 5C).  $C/(A' + C)$  in the normal and the treated mice was significantly greater than  $B/(A + B)$  [normal mice,  $B/(A + B) = 52.9 \pm 3.9\%$ ,  $C/(A' + C) = 68.1 \pm 4.4\%$ ; treated mice,  $B/(A + B) = 51.6 \pm 2.8\%$ ,  $C/(A' + C) = 68.7 \pm 8.4\%$  of the exploration time]. This indicates that the normal mice and the treated mice spent a significantly longer time exploring the novel object, revealing that both groups exhibited a significant preference for exploring it. These results indicate that the treated mice have the same level of nonspatial hippocampus-dependent memory as the normal mice. But we cannot completely deny the possibility that the vision had an influence on this improvement of a novel object test.

To date, there are reports demonstrating an improvement in behavior of treated MPS VII mice assessed by a Morris water maze test [22,23]. We used a novel-object test because it is very easy and less of a burden on the mice than the Water maze test. Consequently, it is easily applicable to mice with motility disturbance, and we thought we could maximize mouse performance associated with visual recognition memory. The long-term effects of this treatment have not been examined in detail. The treated mice lived to 7 months of age at most. Transplantation of neurospheres did not extend the life span of MPS VII mice. Life span may be dependent on systemic lysosomal storage other than the CNS.

In summary, our results demonstrated that after transplantation of *in vitro*-expanded neurospheres into the neonatal ventricle of MPS VII mice brains, the transplant donor cells migrated along established routes and integrated into the recipient's brain. The treated mice exhibited improved cognitive functions as measured by a novel-object recognition test, which was consistent with histological evidence of reduced lysosomal storage in the brain tissue.

## MATERIALS AND METHODS

**Animals.** Syngeneic MPS VII (*mpps/mpps*) mice were obtained from a pedigree colony of B6.C-H-2<sup>bm1</sup>/ByBir-gus<sup>tm1</sup>/+ mice maintained at our facility [6]. Normal C3H mice were purchased from Shizuoka Laboratory Animal Center (Shizuoka, Japan). CAG-EGFP transgenic mice were originally generated by Endo *et al.* [24,25]. All mice were maintained and treated in accordance with the guidelines of the animal committee of the facility.

**Isolation, primary cultures, and passaging procedures of neurospheres.** Embryos were removed from CAG-EGFP transgenic mice on day 14.5 of pregnancy. The corpus striatum was dissected and prepared as described

elsewhere [7]. Neurospheres were cultured in the medium described below at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> at a concentration of  $2 \times 10^5$  cells/ml in the primary culture. The culture medium was DMEM/F12 supplemented with the hormone mixture used by Reynolds and Weiss [7]. Passages were performed once per week. Neurospheres were used for the transplantation after the second to fifth passage.

**Cell-to-cell transport of GUSB secreted from neurospheres.** We evaluated *in vitro* the uptake ratio of the GUSB enzyme secreted from neurospheres of C57BL/6 mice into neural cells of C3H mice by using the difference in the heat stability of GUSB proteins between C57BL/6 mice and C3H mice. In brief, GUSB activity of C57BL/6 mice was reduced by only 30% after a 2-h incubation at 65 °C [11]. In contrast, GUSB activity of C3H mice was decreased markedly after this procedure. We prepared a culture medium of neurospheres from C57BL/6 mice after 1 week incubation. We replaced the medium of primary neurons of C3H mice with the above medium, continued to culture in the presence or absence of M6P, and harvested 12 h later. Heat-stable GUSB activity in the homogenates of C3H mouse neurons was measured after a 2-h incubation at 65 °C.

**Quantitative analysis of GUSB activity.** GUSB activity in tissues and cell homogenates was quantified using a fluorometric assay described previously [26]. Neurospheres were quantitatively analyzed after the second to fifth passage. Differentiated cells were obtained from neurospheres by converting the culture medium into DMEM +10% FBS. We had previously demonstrated that these cells differentiated into neurons, astrocytes, and oligodendrocytes by immunological staining (data not shown). Bone marrow was isolated from C57BL/6 mice and cultured in DMEM +10% FBS. Attached cells were collected after the second to fifth passage and analyzed for GUSB activity.

**Histochemical detection of GUSB activity.** The mice were perfused with physiological saline and subsequently with 4% paraformaldehyde before preparation of the brains. The brains were equilibrated in a 30% sucrose solution (4 °C, overnight), frozen in M-1 embedding matrix (Shandon, Pittsburgh, PA, USA), and then sectioned on a cryostat. Histochemical analysis of GUSB activity was performed on 20- $\mu$ m-thick frozen sections using naphthol AS-BI  $\beta$ -D-glucuronide (Sigma) as a substrate [26].

**Lysosomal enzyme activities of the neurosphere.** Lysosomal enzyme activities in neurospheres, the marrow stromal cells, and human granulocytes were quantified using a fluorometric assay as described with some modification [27].

**Histopathological analysis of lysosomal storage.** Histopathology in neurons and glia was analyzed at 2 months after transplantation, corresponding to 2 months of age ( $n = 2$ ). Tissues were isolated from the mice and immediately immersed in cold 2% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, postfixed in 1% osmium tetroxide, dehydrated through a graded series of ethanol solutions, and embedded in Spurr's Medium (Polyscience, Warrington, PA, USA). Toluidine blue-stained, 0.5- $\mu$ m-thick sections were analyzed for evidence of lysosomal storage in hippocampus, cortex, and ependyma. Cytoplasmic lysosomal distensions in the cortex were also evaluated with an electron microscope.

**Auditory brain-stem responses.** ABR examination was performed 20 min after anesthesia in a quiet room, as described previously [28].

**Novel-object recognition tests.** Novel-object recognition tests evaluate nonspatial hippocampus-dependent learning and memory [19–21] and were performed as described [19] with several modifications. The mice were habituated in an open field over a 2-day preexposure (day 1 for 5 min and day 3 for 5 min). Two yellow objects (A and B) were placed diagonally in the open field (15 cm away from the walls) on day 4, and the mice were allowed to explore them for 10 min. Object B was replaced with the novel object (C), and the other object was replaced with a replica (A') on day 5, and the mice were again allowed to explore them for 10 min. Recognition of the familiar object was scored by preferential exploration of the novel object. A + B represents total time exploring on day 4. A' + C represents total time exploring on day 5. B/(A + B) represents the ratio of time exploring object B to total time exploring on

day 4. C/(A' + C) represents the ratio of time exploring object C to total time exploring on day 5.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from Terumo Foundation Life Science Foundation to HO, and a grant from the 21st Century COE program of the Japanese Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology Ministry to Keio University.

RECEIVED FOR PUBLICATION APRIL 27, 2005; REVISED SEPTEMBER 13, 2005; ACCEPTED SEPTEMBER 27, 2005.

## REFERENCES

- Sly, W. S., Quinton, B. A., McAllister, W. H., and Rimoin, D. L. (1973).  $\beta$ -Glucuronidase deficiency: report of clinical, radiologic, and biochemical features of a new mucopolysaccharidosis. *J. Pediatr.* **82**: 249–257.
- Vogler, C., et al. (1993). Enzyme replacement with recombinant beta-glucuronidase in the newborn mucopolysaccharidosis type VII mouse. *Pediatr. Res.* **34**: 837–840.
- Birkenmeier, E. H., et al. (1991). Increased life span and correction of metabolic defects in murine mucopolysaccharidosis type VII after syngeneic bone marrow transplantation. *Blood* **78**: 3081–3092.
- Snyder, E. Y., Taylor, R. M., and Wolfe, J. H. (1995). Neural progenitor cell engraftment corrects lysosomal storage throughout the MPS VII mouse brain. *Nature* **374**: 367–370.
- Taylor, R. M., and Wolfe, J. H. (1997). Decreased lysosomal storage in the adult MPS VII mouse brain in the vicinity of grafts of retroviral vector-corrected fibroblasts secreting high levels of  $\beta$ -glucuronidase. *Nat. Med.* **3**: 771–775.
- Kosuga, M., et al. (2001). Engraftment of genetically engineered amniotic epithelial cells corrects lysosomal storage in multiple areas of the brain in mucopolysaccharidosis type VII mice. *Mol. Ther.* **3**: 139–148.
- Reynolds, B. A., and Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of adult mammalian central nervous system. *Science* **255**: 1707–1710.
- Ogawa, Y., et al. (2002). Transplantation of in vitro-expanded fetal neural progenitor cells results in neurogenesis and functional recovery after spinal cord contusion injury in adult rats. *J. Neurosci. Res.* **69**: 925–933.
- Lindvall, O., et al. (1990). Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Science* **247**: 574–577.
- Freed, C. R., et al. (1992). Survival of implanted fetal dopamine cells and neurologic improvement 12 to 46 months after transplantation for Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* **327**: 1549–1555.
- Gwynn, B., Lueders, K., Sands, M., and Birkenmeier, E. H. (1998). Intracisternal A-particle element transposition into the murine  $\beta$ -glucuronidase gene correlates with loss of enzyme activity: a new model for  $\beta$ -glucuronidase deficiency in the C3H mouse. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 6474–6481.
- Lois, C., and Alvarez-Buylla, A. (1994). Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* **264**: 1145–1148.
- Ourednik, V., et al. (2001). Segregation of human neural stem cells in the developing primate forebrain. *Science* **293**: 1820–1824.
- Meng, X. L., Shen, J. S., Ohashi, T., Maeda, H., Kim, S. U., and Eto, Y. (2003). Brain transplantation of genetically engineered human neural stem cells globally corrects brain lesions in the mucopolysaccharidosis type VII mouse. *J. Neurosci. Res.* **74**: 266–277.
- Tamaki, S., et al. (2002). Engraftment of sorted/expanded human central nervous system stem cells from fetal brain. *J. Neurosci. Res.* **69**: 976–986.
- Sierra, T. J., Backstrom, K., Wang, C., Rennard, R., Miller, M., and Hu, Y. (2004). Widespread correction of lysosomal storage following intrahepatic injection of a recombinant adeno-associated virus in the adult MPS VII mouse. *Mol. Ther.* **10**: 478–491.
- Kopen, G. C., Prockop, D. J., and Phinney, D. G. (1999). Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 10711–10716.
- Sands, M. S., Erway, L. C., Vogler, C., Sly, W. S., and Birkenmeier, E. H. (1995). Syngeneic bone marrow transplantation reduces the hearing loss associated with murine mucopolysaccharidosis type VII. *Blood* **86**: 2033–2040.
- Dulawa, S. C., Grandy, D. K., Low, M. J., Paulus, M. P., and Geyer, M. A. (1999). Dopamine D4 receptor-knock-out mice exhibit reduced exploration of novel stimuli. *J. Neurosci.* **19**: 9550–9556.
- Soderling, S. H., et al. (2003). Loss of Wave-1 causes sensorimotor retardation and reduced learning and memory in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 1723–1728.
- Rompon, C., et al. (2000). Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR-knockout mice. *Nat. Neurosci.* **3**: 238–244.
- O'Connor, L. H., et al. (1998). Enzyme replacement therapy for murine mucopolysaccharidosis type VII leads to improvements in behavior and auditory function. *J. Clin. Invest.* **101**: 1394–1400.

23. Brooks, A. I., *et al.* (2002). Functional correction of established central nervous system deficits in an animal model of lysosomal storage disease with feline immunodeficiency virus-based vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 6216 - 6221.
24. Hayakawa, M., *et al.* (2002). Muscle-specific exonic splicing silencer for exon exclusion in human ATP synthase gamma-subunit pre-mRNA. *J. Biol. Chem.* **277**: 6974 - 6984.
25. Ichida, M., *et al.* (2000). Differential regulation of exonic regulatory elements for muscle-specific alternative splicing during myogenesis and cardiogenesis. *J. Biol. Chem.* **275**: 15992 - 16001.
26. Wolfe, J. H., and Sands, M. S. (1996). Murine mucopolysaccharidosis type VII: a model system for somatic gene therapy of the central nervous system. In *Gene Transfer into Neurons: Towards Gene Therapy of Neurological Disorders* (P. Lowenstein and L. Enquist, Eds.), Wiley, Essex.
27. Den Tandt, W. R., and Scharpe, S. (1991). Characteristics of hexosaminidase A in homogenates of white blood cells using methylumbelliferyl-N-acetyl-beta-D-glucosaminide-6-sulphate as substrate. *Clin. Chim. Acta* **199**: 231 - 236.
28. Willott, J. F., Turner, J. G., Carlson, S., Ding, D., Bross, L. S., and Falls, W. A. (1998). The BALB/c mouse as an animal model for progressive sensorineural hearing loss. *Hear. Res.* **115**: 162 - 174.

## = 原著論文 =

## 刺激モダリティ別事象関連電位 N400 の発達と読字障害における特徴

—意味カテゴリー一致判断課題による検討—

小穴 信吾<sup>1,2</sup> 稲垣 真澄<sup>1</sup> 鈴木 聖子<sup>1</sup> 堀本れい子<sup>1</sup> 加我 牧子<sup>1</sup>

**要旨** 6～30歳の健常例38名と10～14歳の発達性読み書き障害8例に対して事象関連電位N400の刺激モダリティ別特徴を検討した。10歳未満の健常年少群は聴覚性N400が広汎な脳部位で記録された。10歳以上では視覚モダリティと視聴覚モダリティによる波形がほぼ同じパターンを示したことから、小学校高学年以降に視覚的な意味処理が確立することがうかがわれた。読み書き障害では視覚提示のエラーが比較的目立ち、N400波形が形成不良であった。一方、視聴覚モダリティではN400波形、潜時ともに正常化した。事象関連電位N400により、意味処理機構の刺激モダリティ別優位性や脆弱性を評価しうると考えた。

見出し語 事象関連電位, N400, 発達性読み書き障害, 意味処理, 発達の變化

## はじめに

事象関連電位N400は通常、モニター画面上に逐語的に提示された文章を黙読する際に、文末の意味的逸脱語に対して約400 msec後に出現する陰性の脳波変動をさす<sup>1)</sup>。単語の認知や意味処理に関わる事象関連電位として1980年に初めて報告<sup>2)</sup>されて以降、統合失調症など成人精神神経疾患に広く応用されてきた<sup>3)</sup>。一方、小児に適用可能なN400課題は、単語あるいは絵を視覚的に提示する「語彙判断課題」が主であり、これまで読字障害(dyslexia)例の解析が多い<sup>4)~6)</sup>。

佐田らは本邦小児用N400課題として、単語を音声または文字で提示するという「意味カテゴリー一致判断課題」を提案した<sup>7)</sup>。本課題は比較的簡便なため、平仮名を読める年齢であれば施行可能であり、読字障害例のモダリティ別意味処理の検討も可能と思われる。そこで本研究ではまず、上記課題を用いて聴覚と視覚モダリティ単独と視聴覚同時刺激という3条件のN400波形における健常発達を明らかにして、(不)一致判断時の反応時間やエラー率の発達の變化についても併せて検討した。次に、小学校高学年以降の発達性読み書き障害例で記録したN400や等電位分布から、単語認知や意味処理の障害に刺激モダリティによる共通点や特徴がみられるか

どうかについて検討を行った。

## I 対象・方法

## 1. 対象

健常対象は神経学的異常を認めない6～30歳の38名で、小児が28名(男児8名)であり、6～9歳の18例(平均±1SD, 以下同じ; 7.3±1.1歳)と10～14歳の10例(11.6±1.3歳)の2群(以下年少群, 年長群とする)に分けた。成人は22～30歳の10例(26.6±2.7歳, 男性8名)に検査を行った。

症例は小学校4年から中学2年生までの8例(12±1.3歳, 男児7例)であった。全例幼児期の単語や二語文の出現に遅れはなかった。小学校入学後、平仮名と漢字の習得が困難であることを主訴に当センター武蔵病院を受診した。最重度の読み書き障害を示した1例(表1; 症例2)は11歳時点でも平仮名一文字の読みがほとんどできなかった。中学生の3例(症例6～8)は英語のアルファベット文字の読み書きにも困難がみられた。症例2を除く7例は拗音や促音を含む平仮名单語の音読に著明な異常はなかったが、「め」を「ぬ」や「ね」に書き間違えるなど仮名書字に誤りがみられた。そして、漢字の読み書きは-2～-3学年以下の水準であり、症例5は漢字書字が小学校1年生レベルにとどまっていた。

WISC-IIIによる平均FIQは87.8(標準偏差14.1)であった(VIQ=86.9±18.2, PIQ=89.8±10.8)。また、5例のK-ABCの習得度得点は90～111を示し、ことばの読みや文の理解が比較的低得点であった。Raven Colored Progressive Matrices(RCPM)は全例で施行され、いずれも年齢相当であった。SLTA(標準失語症検査)の聞く、話すの項目に異常はなく、「漢字の書字」や「書き取り」の得点が低かった。書字の誤りとして、症例6は漢字(新聞, 鉛筆, 落ちる, 捨う)の書き取りを「親聞, 沿津, 降ちる, 投う」という音韻的あるいは形態的誤りを示した。症例2はFrostig視覚発達検査指数(PQ)が68と視覚認知機能の低下があり、Rey複雑図形の模写が健常例と比べて極めて拙劣であっ

<sup>1</sup> 国立精神・神経センター精神保健研究所知的障害部<sup>2</sup> 東京医科大学小児科

連絡先 〒187-8553 小平市小川東町4-1-1

国立精神・神経センター精神保健研究所知的障害部  
(稲垣真澄)

E-mail: inagaki@ncnp-k.go.jp

(受付日: 2005. 12. 22, 受理日: 2006. 2. 14)



表1 読字障害例の神経心理検査のまとめ

No. (性)	年齢 歳	WISC-III			K-ABC (平均得点)			SLTA (%)					RCPM 得点
		FIQ	VIQ	PIQ	ことばの読み	文の理解	習得度	漢字書字	仮名書字	漢字書取	仮名書取	単文書取	
1 (m)	10	85	81	94	60	68	74	未検査					28
2 (m)	11	63	61	72	45	56	56	0	0	0	0	0	27
3 (f)	11	93	91	97	未検査			60	100	60	100	100	33
4 (m)	12	103	110	94	103	104	111	60	80	80	100	40	36
5 (m)	12	76	80	76	61	76	67	40	80	60	100	80	30
6 (m)	13	90	85	86	65	90	94	40	80	40	100	40	34
7 (m)	13	107	115	96	117	119	127	100	100	100	100	100	36
8 (m)	14	85	72	103	65	73	73	80	100	100	100	80	36

SLTA (標準失語症検査) は5ないし10問正答の場合を100%とした

RCPM (Raven Colored Progressive Matrices) は3セットの総得点を示した (36点満点)

た。症例1と5は錯綜図の認知は可能であったが、標準高次視覚検査 (VPTA) の複雑図形の模写に誤りがみられた。4例 (症例4, 5, 7, 8) は、ReyのAVLT (Auditory Verbal Learning Test) の音声言語の記憶力は良好であった。神経心理検査でもっともよい結果であった症例7も病歴上は漢字習得が不良で、中学入学後英単語の読みが全くできなかった。以上より、発達性読み書き障害と診断した。

なお、対象全例が右利きで、末梢の視聴覚機能に異常を認めなかった。検査にあたって本人あるいは親権者にその内容を説明し、本人からの同意、および、小児では親権者からの同意も得た。

## 2. 方法

課題は単語提示による意味カテゴリー一致判断課題<sup>78)</sup>を行った。すなわち、刺激単語 (プライム: S1) として生物あるいは非生物の2カテゴリー名のいずれかを50%の確率で提示し、その後ターゲット (S2) として具体語を提示して、先行カテゴリーに属するか否かを判断させた。この際、不一致判断時には利き手の母指で、一致判断時には非利き手の母指でキー押し反応を求めた。

刺激提示は、①聴覚モダリティ条件 (スピーカーからの音声提示)、②視覚モダリティ条件 (モニター画面上の平仮名文字提示)、③視聴覚モダリティ条件 (音声と文字を同時に提示) の順で行う場合と②、①、③の順に行う場合を対象によってランダムに採用した。各刺激条件間に短時間の休憩を設けた。刺激はタキストスコープ (IS-702 system, 岩通アイセック社) で制御し、被検者は17インチのCRTモニターとスピーカーから1mの位置に配置された椅子に座った状態で記録を行った。

脳波はエレクトロキャップ (東機貿) を使用し、国際10-20法に基づく頭皮上の19部位 (Fp1, Fp2, F3, F4, F7, F8, C3, C4, P3, P4, O1, O2, T3, T4, T5, T6, Fz, Cz, Pz) から、デジタル脳波計 Alliance Works (VIASYS Healthcare 社) を用いて記録 (サンプリング周波数250 Hz) した。なお、基準電極は両耳朶連結として各電極のインピーダンスは5~10 K $\Omega$ とした。

記録脳波は脳波判読プログラムソフトウェア INSIGHT (Persyst Development Corp., USA) によってテキスト変換され、EPLYZER II-A (キッセイコムテック社) により加算処理した。一致判断、不一致判断を各々30回提示し、おてつきエラー、無

反応および瞬目行動などのアーチファクトを除いた。解析脳波のバンドパスフィルターは0.05 Hz から50 Hz に設定し、解析区間はS2トリガー信号前100 ms から後1,100 ms までとした。基線はS2提示前100 ms の平均電位とした。なお、読み書き障害の症例1と2はモニター上の平仮名单語を音読できず、視覚モダリティの加算処理から除外した。残りの6例は提示した平仮名单語60個すべて音読可能であった。

これまでの成人および6~9歳健常小児のN400所見<sup>78)</sup>から、ターゲット単語提示後300 ms から650 ms において前頭部から中心部にかけて陰性ピークを有する波をN400と判断した。N400に続く陽性電位を後期陽性成分 (LPC) とした。また、健常小児2群、成人群と症例群それぞれの総加算平均波形を作成し、関心領域の等電位分布図をATAMAP-II (キッセイコムテック社) とEP Map View Analysis 解析プログラム (NoruPro Light Systems) で解析、描出した。今回の検討では刺激モダリティごとの発達的变化や読字障害例の特徴を明らかにするために、不一致判断時のN400波形や分布について主に解析した。統計は統計解析ソフト Stat View ver4.5 (Abacus Concepts, CA, USA) を用いた。Mann-Whitney のU test, ANOVA を用いてp値が0.05以下の場合、有意差ありと判断した。

## II 結果

### 1. N400の発達的变化

#### 1) 聴覚モダリティ (図1a, d)

健常年少群18例の総加算波形では、単峰性のN400波形パターンを示し、不一致判断時のN400頂点は平均 (標準偏差) 511 (46.9) ms にあった (一致判断時は466.7 (44) ms, いずれもFz部)。N400振幅は-10~-15  $\mu$ V で、前頭から中心部、頭頂部にかけて広範囲に分布していた。LPCはピーク潜時がおおよそ900 ms であった (図1a, 上向き矢印)。

一方、年長群ではS2開始後120~140 ms に頂点を持つ陰性波に続き、二峰性N400波形を認めた。Fz部の不一致判断時N400ピーク潜時は302.4 (30.0) ms と436.4 (38.8) ms (一致判断: 294.2 (44.3) と478.6 (23.7)) であった。前頭部における二峰目の陰性ピーク振幅は不一致判断時に平均一

6.7 ~ 8.2  $\mu\text{V}$ あり、一致判断時より振幅が高かった。このように前頭領域では比較的明瞭な二峰性N400波形を形成していたが、頭頂部では二峰目のN400ピーク振幅が低下すると同時に、LPCが目立ちその陽性頂点は748 ~ 784 msにみられた。

二峰性N400パターンは成人群の前頭部~中心部でも不明瞭ながら観察され、不一致判断時のN400平均ピーク潜時はそれぞれ292 ms, 416 msであった。なお、成人群でもS2後105 ~ 115 msに最初の陰性頂点を認めた。今回の成人の聴覚性N400ピークは以前の報告<sup>9)</sup>よりも若干潜時が短縮していた。

### 2) 視覚モダリティ (図1b, e)

年少群の総加算波形は聴覚モダリティによるN400波形とは異なり、二峰性の陰性頂点を示した。この二峰性陰性波は前頭部から中心部で明瞭であった。不一致判断時のピーク潜時(平均±標準偏差)はCz部でそれぞれ368.4 ± 31.4 msと491.6 ± 39.7 msであった。二峰目のピーク潜時は聴覚モダリティの単峰性N400ピークと有意な差はなかった( $p = 0.1$ )。LPCは中心部から頭頂部に認められ、650 ~ 720 msのピーク潜時であった(図1b, 上向き矢印)。

年長群では二峰目の頂点が不明瞭となり、中心部では単峰性波形を呈した。不一致判断時のピーク潜時は平均320 msであった。頭頂部から後頭部にかけての全体的な波形の陽性偏位が年少群よりも強くみられた。LPCはPz部に明瞭で、600 ~ 650 msに認められた。

成人群では全体的な陽性偏位を示し、N400は小さいノッチを含む単峰性ピークであり、320 ~ 370 msに小さい頂点を形成していた。なお、前頭部のN400は比較的早い潜時で得られ、中心から頭頂、そして後頭部にかけてそのピーク潜時は遅延していた。LPCは潜時およそ500 msに認めた。

### 3) 視聴覚モダリティ (図1c, f)

年少群総加算波形はS2後110 msに最初の陰性波を認めたが、聴覚モダリティによるN400波形と類似したパターンを示した。Fz, F3, F4にN400が明瞭であり、ピークは450 ~ 460 msにあった。Fz部でのピークは単独モダリティ時のN400ピークよりも有意に短縮していた( $p < 0.05$ )。LPCは頭頂部優位におよそ800 msのピークで認められた(図1c, 上向き矢印)。

一方、年長群では視覚モダリティ単独の波形と似たパターンを呈した。前頭部では二峰性ピークが確認されたが、中心部では単峰性のN400が認められ、そのピーク潜時は320 ~ 330 msであった。N400は前頭部が頭頂部より目立っていた。なお、波形の陽性偏位は視覚モダリティ単独と同様で、LPCが中心部から頭頂部にかけて550 ~ 600 msのピーク潜時でみられた。

成人群では、視聴覚同時刺激時の波形と視覚単独刺激の波形はほとんど同じであった。すなわち、波形の陽性偏位があり、ピークは潜時320 ~ 340 msに同定できたが、振幅は基

線から1 ~ 2  $\mu\text{V}$ と軽度陽性電位を示した。LPCは視覚単独刺激よりも陽性度が乏しく、頭頂部優位にピーク潜時500 msを有していた。

### 2. 読み書き障害児のN400波形

加算処理が可能であった発達性読み書き障害児( $n = 8$ )のN400波形では、聴覚モダリティ単独刺激時には健常児群と同様の二峰性パターンを示した(図2a, 2b)。二峰目のピーク(463 ± 36.2 ms)はFz部で遅延していた(健常例430 ± 16.9 ms,  $p = 0.041$ )ものの、それ以外の18部位では健常児の潜時よりも遅延はなかった。

一方、視覚刺激によるN400( $n = 6$ )波形は健常児とは異なり、前頭部では二峰性波形(図2b, 黒色三角)を示した。ピーク潜時はそれぞれ平均(SD)が326 (27.6) msと458.7 (26.9) msであり、二峰目のピーク潜時には健常例よりも有意な遅延を認めた( $p = 0.01 \sim 0.04$ )。また、健常群の波形(図2a, 矢印)と比べてLPCが不明瞭な点の特徴で、頭頂部の陰性度が上昇していた(Pz部振幅は健常群6.1  $\mu\text{V}$ , 読み書き障害群4.9  $\mu\text{V}$ ,  $p = 0.03$ )。

読み書き障害例の視聴覚同時刺激時N400波形は前頭部で二峰性(ピーク潜時326 ± 45.8 msと426.5 ± 60.1 ms)、中心部で単峰性(416 ± 44.6 ms)のパターンであり、健常例の聴覚モダリティ刺激波形と似たパターンを示し、そのピーク潜時は健常例の聴覚モダリティ刺激とほぼ同じであった。

### 3. 等電位分布

年少児の聴覚刺激によりN400はS2後450 ~ 550 msまで中心部から右前頭部、頭頂部に陰性度の強い分布が広汎に認められた。視覚刺激では340 ~ 420 msに前頭部やや右側に強い陰性分布が得られた。視聴覚同時刺激に対しては400 ~ 500 msにかけて左右の前頭部優位な陰性分布があった。年長群における聴覚刺激等電位分布図(図2c)は、300 msで中心部優位、430 msで左右前頭部(F3, F4)に優位な陰性分布を認めた。600 ms以降頭頂後頭部にLPCの陽性分布を認めた。一方視覚刺激では不明瞭であるものの320 ~ 340 msに左前頭部に陰性ピークがあった。視聴覚同時刺激での等電位分布図は全体的に陽性度が強く、陰性成分の中心は不明瞭であった。LPCを頭頂後頭部に明瞭に認め、陽性成分のピークは550 ~ 700 msであった。成人の等電位分布は視覚刺激では陽性偏位が強かったが、聴覚刺激では中心部に軽度陰性分布が得られた。

読み書き障害例(図2d)の聴覚刺激時のN400は潜時およそ280 msと450 msに中心部から左右の前頭部に陰性度の強い分布を認めた。一方、視覚刺激では陰性成分が不明瞭で450 ~ 460 msに軽度の陰性分布があるのみであった。LPCの陽性成分の中心が頭頂部になく、前方に位置するという分布異常を示した。視聴覚同時刺激N400等電位分布はおよそ300 msの潜時にFz部を中心としたピークが認められ、明瞭となった。

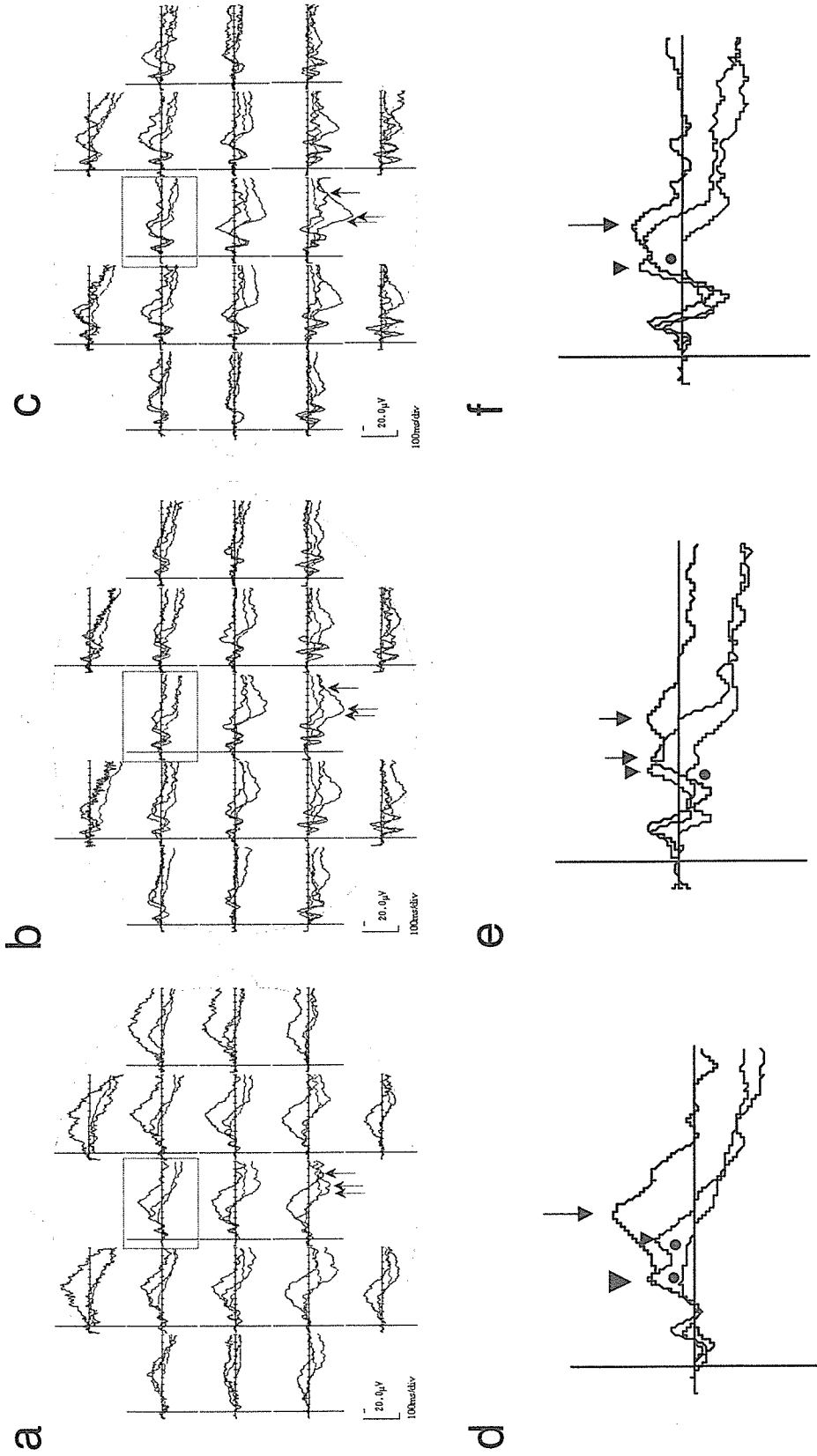


図1 N400 波形の発達の变化 (総加算平均波形)

a : 聴覚提示, b : 視覚提示, c : 視聴覚提示 (いずれも黒が年少群, 青が年長群, 赤が成人群を示す). d, e, fは各提示条件のFz部位波形の拡大図.  
 聴覚モダリティ (a) 時, 健康年少群は単峰性のN400 波形パターンを示し (d, ▼), 10 歳以上で二峰性波形に変化した (d, ▲). 成人波形は全体的に低振幅化を示した (d, ●). 視覚提示 (b) では, 年少群波形は二峰性の陰性頂点を示し (e, ▲), 前頭部から中心部で明瞭であった. 年長群, 成人群では単峰性に変化した (e, ▼と●). 視聴覚同時 (c) では, 年少群は聴覚モダリティによるN400 波形と類似したパターンを示し, 前頭部に明瞭であった (f, ▲). 一方, 年長群, 成人群では視覚モダリティ刺激時と似た波形を示した (f, ▼と●). Pz 部位のLPCのピークを上向き矢印で示す.

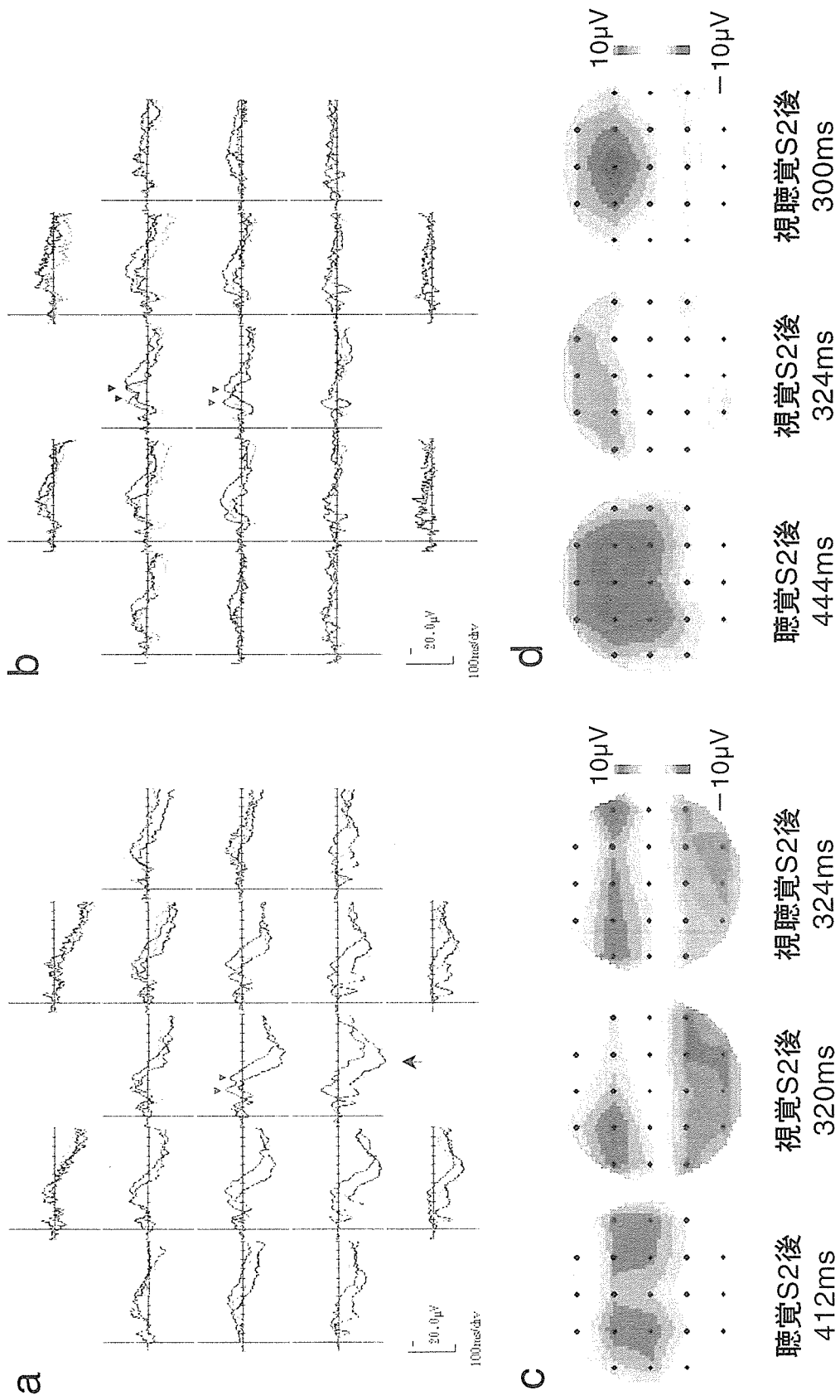


図2 年長群と読字障害群の総加算平均波形と等電位分布図

a (健常年長群) と b (読字障害群) は3刺激条件の重ね書き波形 (青: 聴覚提示, 黒: 視覚提示, 赤: 聴覚提示) を, c と d は各群の等電位分布図を示す。読字障害児の N400 波形は, 聴覚モダリティ単独刺激時には健常児と同様の陰性パターンを示した (a と b, 青三角, Cz 部), 視覚刺激による N400 は前頭部に2つのピークを示した (b, 黒三角, Fz 部)。なお, 健常例は視覚単独, 視聴覚同時刺激では左右の頭頂部から後頭部にかけて陽性成分が目立つ特徴があり (a, ↑), 等電位分布図 (c) でも確認された。読字障害児 (d) では, N400 は健常群よりも陰性度が強く, 視覚モダリティでは陰性分布が不明であった。一方, 視聴覚同時提示の場合は陰性分布が明瞭化した。