

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 11 月 24 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08893

研究課題名（和文）死後髄液から死亡前発症のけいれん発作の有無を検出する法医診断技術の基盤的研究

研究課題名（英文）Study on forensic diagnosis to detect premortem seizure from postmortem cerebrospinal fluid

研究代表者

金涌 佳雅（Kanawaku, Yoshimasa）

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80465343

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ペンチレンテトラゾールkindlingモデルラットを、けいれん誘発後に安楽死させ、その髄液を採取し、NMR分析を行ない、けいれんモデルと対照群の死体髄液NMR計測値を信号解析技術を用いて解析し、死亡前のけいれん発作の有無を識別できるか否かを検討した。けいれん群ラットと対照群のラットについて部分最小二乗判別分析（PLS-DA）を実施したところ、両群の識別の可能性が示唆された。ただし、一部のデータは解析手法の工夫・改善により、より良好な解析結果を得られる可能性も考えられた。髄液のNMR解析データと行動解析・病理形態所見の、より適切な関連づけのために、今後の研究課題として挙げられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

てんかん患者は、予期せぬ突然死として異状死扱いとなったり、交通事故、入浴あるいは労働事故とてんかん発作との関連性を調査することを目的に解剖されることも多い。このような症例で法医学者が解剖で明らかにできることは、てんかん原性病変を確認するにとどまり、死亡前にてんかん性けいれんが生じたか否かを病理学的に判別することは不可能なのが現状である。本研究は、動物を用いた基礎実験の域をでないものの、死亡前のてんかん性けいれんの有無を検出する法医学的診断法の基礎として、高い学術的意義を有すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, pentylenetetrazole kindling model rats were euthanized after induction of seizure and their cerebrospinal fluid was collected. We performed NMR analysis of these samples and analyzed NMR measurement data of the postmortem spinal fluid to diagnose between seizure and the control group. We examined whether we could identify the presence or absence of seizures before death. Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) was performed on rats in the convulsive group and in the control group, suggesting the possibility of distinguishing between the two groups. However, some data could possibly be better analysis results by devising and improving analysis methods. It is mentioned as a future research subject for more appropriate correlation among NMR analysis data of cerebrospinal fluid, behavior analysis, and pathological morphology findings.

研究分野：法医学

キーワード：てんかん てんかん突然死 NMR 死後髄液

1. 研究開始当初の背景

日本全国で 60～100 万人と推定されるてんかん患者は、予期せぬ突然死として異状死扱いになることがある。また、「交通事故、入浴あるいは労働事故」と「てんかん発作」との関連性を調査することを目的に司法解剖が囑託されることも多い。

このような症例で法医学者が解剖で明らかにできることは、海馬硬化症や限局性皮質異形成のような形態学的所見を観察するにとどまり、死亡前にてんかん性けいれんが生じたか否かを病理学的に判別することは不可能なのが現状である。

一方、てんかん患者の交通事故が社会的に問題となったように、てんかんを病歴として有する者が死亡前に発作を生じたか否かを明らかにするという社会的要請は強く、特に法医学領域では、死亡前のけいれん発作の有無を死後診断できる技術の確立が待ち望まれている。

2. 研究の目的

本研究は、ペンチレンテトラゾール(以下、PTZ) kindling モデルラットを、けいれん誘発後に安楽死させ、その髄液を採取し、NMR 分析を行ない、けいれんモデルと対照群の死体髄液 NMR 計測値を、我々が独自に開発した信号解析技術を用いて解析することで、死亡前のけいれん発作の有無を識別できるか否かを検討すると共に、全ラットの行動を定量化し、脳の病理所見を詳細に検討し、けいれん症状・病理所見と NMR データとの関連性を調べることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) PTZ 誘発 kindling 実験

使用動物

週齢 7 週前後の SD 雄ラット(体重約 220g)。

薬物の投与とモデルの作製(図 1)

けいれん誘発作用のある PTZ を反復投与し、動物のけいれん閾値は低下させ、けいれん誘発性が亢進した動物モデルである kindling モデルを作製した。

本研究では、PTZ による kindling の有無と、安楽死直前投与の薬物により、ラットを 4 群にわけた。

(a)群(n=30) : PTZ(15 mg/mL)の事前投与×8 回 + PTZ(15 mg/mL)

(b)群(n=10) : 生食水の 8 回事前投与 + PTZ(15 mg/mL)

(c)群(n=30) : PTZ(15 mg/mL)の事前投与×8 回 + 生食水

(d)群(n=10) : 生食水の 8 回事前投与 + 生食水

投与方法はいずれも腹腔内投与、事前投与は 1 日毎に行った。8 回目の投与後、様子を観察し、異常がないことを確認した。最終投与は、8 回目の投与の 2 日後とした。

行動観察～髄液採取

各群とも最終投与から 5 分間、行動を観察しつつビデオ録画した。観察後、全個体を炭酸ガスで安楽死させ、大槽から死体髄液を採取し、最後に抜脳した。

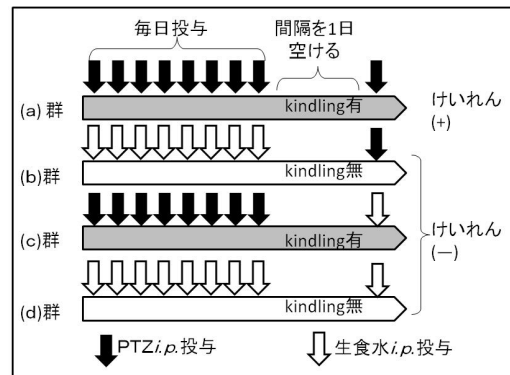


図 1 . kindling モデルの作製方法

(2) 症状の定量化

PTZ によるけいれん症状を客観的に数値化するための revised Racine スケール¹⁾に、新規環境下でのラット行動の経時変化の知見も反映させて、我々は新規に以下のスケール(表1)を開発し、先行研究でも活用しているところであった²⁾。

本研究でもこのスケールを用いて症状を秒単位で定量し、時間変化をグラフ化した。

6:	側臥位での間代-強直間代性発作
5:	腹臥位での間代-強直間代性発作
4:	座位での間代性発作
3:	頸部れん縮
2:	鼻・口部を含む顔面れん縮
1:	突発性行動停止, 一点凝視
0:	平穩
-1:	身繕い
-2:	探索行動
-3:	立ち上がり

表1. けいれん評価スケール

(3) 病理形態解析

Fujikawa らの方法³⁾に準じ、HE 染色による acidophilic neurons ならび、TUNEL 染色によるアポトーシスの検出を行い、脳の23領域について、ニューロン傷害のレベルを4段階に評価した。

(4) NMR分析

検体の前処理・保存・NMR測定試料の調整

採取髄液を遠心分離後、-80 に保存する。NMR計測時に解凍し、内部ロック用重水などを加え、ガラス製NMR試料管に入れた。

NMR測定およびデータ収集

NMR装置は7テスラ(300MHz)FT-NMR装置(JEOL)を使用し、¹H測定を行った。多検体の連続自動測定が可能なプログラムを用いて測定を行った。

NMR計測値の数値化処理

NMR装置本体のPCよりrawデータ(FIDデータ)を数値化処理専用のPCに転送し、我々が独自に開発したアルゴリズムを実施できるプログラムを用いてNMRの数値化処理を行った。

NMRデータ解析

多変量解析を実施できるソフトウェアのUnscrambler®(CAMO)を使用して、主成分分析(PCA)、PLS-DA法を中心に、種々の解析アルゴリズムに基づいて解析を行い、4群の髄液データの特性を評価した。またクロスバリデーションによる検証・評価を行った。

データの統合および総合解析

髄液のNMRデータ、けいれんスコア、病理形態所見を統合し、データマイニングを行い、髄液のNMR解析データと行動解析・病理形態所見の関連づけが可能か否かを検討した。NMRデータによる識別が可能と判断された場合は、更にモデルのブラッシュアップを行った。

最後に、盲検法的に実施した動物実験により採取した死体髄液のNMRデータを、ブラッシュアップした識別モデルに適用し、けいれん群を識別できるか評価した。

4. 研究成果

(1) PTZ誘発 kindling 実験

SD雄ラットに対して計画どおりPTZを腹腔内投与し、kindlingモデルラットを作成させた。kindlingモデルラットと対照ラットに対して、腹腔内投与する薬物の種別に応じて分類した4

群について薬物を投与し、5 分間、ゲージ内で行動やけいれん症状を観察し、ビデオでも撮影し、いずれも成功裏に終了した。

5 分間の観察後、ラットを専用保定器に入れ密封後、炭酸ガスを急速注入し、安楽死させた。いずれも数分後に死亡が確認され、後頭部皮膚を切開後に後頭下から髄液を 50-100 μ L 採取し、遠心分離した。また、灌流固定させた後に、断頭し全脳を摘出することに成功した。

(2) 症状の定量化

けいれん誘発実験において撮影した複数方向のビデオ動画を編集し、全てのラット個体の行動やけいれん症状を秒単位で視聴・観察し、事前に定めたスコアに基づき点数化させた。横軸を時間、縦軸を点数としたエソグラム(行動目録、**図 2**)を作成し、けいれん潜時やけいれん発現時間などを集計した。

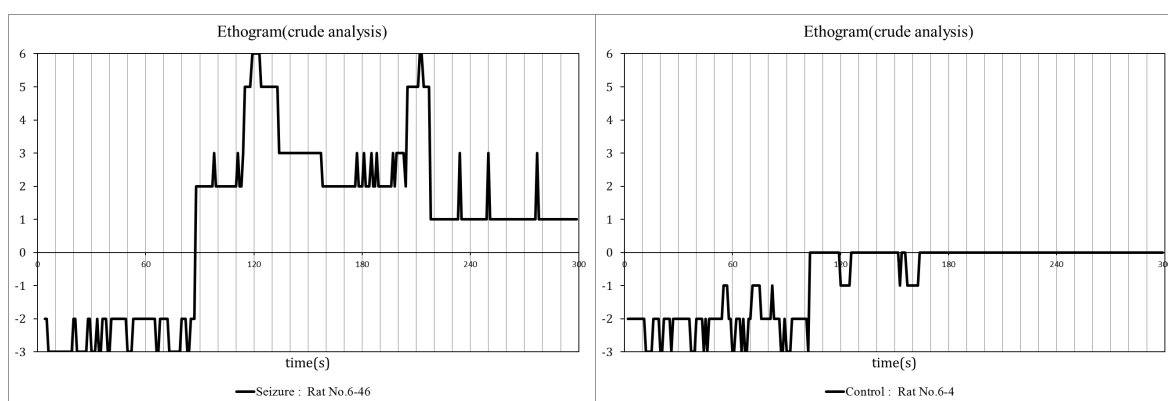


図 2 . 薬物投与後 5 分間のけいれん・行動に関するエソグラム

左 - けいれん誘発ラット。表 1 のスケール 6 の強直間代性発作が、観察中に 2 回発現している。

右 - 生食投与ラット。行動は全般に平穏である。

(3) 病理形態解析

海馬領域の病理組織標本を鏡検したところ、kindling モデルラットと対照モデルラットのいずれも、あきらかな神経細胞 (ニューロン) のアポトーシスは観察されなかった。

本研究で作成された kindling モデルラットは、海馬領域のニューロンの傷害が組織学的に可視化されるものではなく、kindling モデルラットと対照モデルラットの鑑別には、病理形態解析以外の手法が必要であることが結論づけられた。

(4) NMR分析

スペクトルデータの取得

けいれん誘発実験により採取したラット死後髄液の NMR 計測を開始し、計測が完了したサンプルした分から解析をはじめ、スペクトルデータを取得した。各群のスペクトルデータは目視上、直ちに識別が可能なピークの特徴が認識することはできず、多変量解析の必要性が認められた。

多変量解析

本研究では、NMR 計測スペクトルデータについて多変量解析を実施した。けいれん群ラットと対照群のラットについて部分最小二乗判別分析 (PLS-DA) を実施したところ (図3)、両群の識別の可能性が示唆された。

一方、kindling モデルラットと対照ラットとの鑑別、kindling モデルラットのけいれん誘発群と kindling モデルラットのけいれん非誘発群の識別はあまり良好とは言えなかった。

ただし、これらは解析手法として、NMR-FID 信号の時間周波数解析を適応することで、良好な解析結果を得られる可能性が示唆された。今後の研究として、NMR-FID 信号の時間周波数解析の手法を用いて、髄液の NMR 解析データと行動解析・病理形態所見の関連づけと、法医診断への応用について研究実験を推進していくことが望まれるだろう。

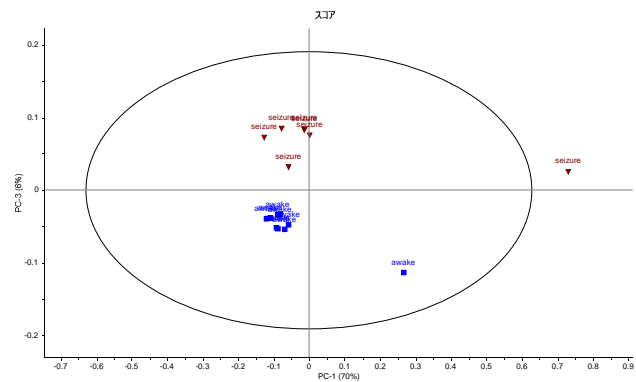


図3．多変量解析のスコアプロット

けいれんラット (茶色逆三角) と対照ラット (青色四角) をそれぞれ示す。縦軸である PC-2 の値に応じて、2 群がクラスター化している。

< 引用文献 >

1. Lüttjohann AI, Fabene PF, van Luijckelaar G, A revised Racine's scale for PTZ-induced seizures in rats, *Physiol Behav.* 2009 Dec 7;98(5):579-86. doi: 10.1016/j.physbeh.2009.09.005. Epub 2009 Sep 20.
2. Kanawaku Y, Hatanaka N, Hirakawa K, Koike K, Ohno Y, Konta T, Harada K, Kanetake J, Profiling of postmortem cerebrospinal fluid in rats with pentylentetrazole-induced seizures using nuclear magnetic resonance spectroscopy, *International Symposium on Advances in Legal Medicine*, 2014, Fukuoka
3. Fujikawa DG. The temporal evolution of neuronal damage from pilocarpine-induced status epilepticus. *Brain Res.* 1996 Jun 24;725(1):11-22. PubMed PMID: 8828581.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

・ Kanawaku Y, Hirakawa K, Koike K, Kanetake J, Ohno Y, Pattern recognition analysis of proton nuclear magnetic resonance spectra of postmortem cerebrospinal fluid from rats with drug-induced seizure or coma. *Leg Med.* 25. pp.52-58, 査読あり, <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2017.01.004>

〔学会発表〕(計1件)

・ 金涌佳雅、平川慶子、小池薫、原田一樹、大野曜吉、金武潤、ペンテトラゾール単回投与けいれん誘発ラットの死体髄液の NMR スペクトル解析、第 99 次日本法医学会学術全国集会、2015 年

〔図書〕(計0件)

〔その他〕

特になし。

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：平川 慶子
ローマ字氏名：Keiko Hirakawa
所属研究機関名：日本医科大学
部局名：医学部
職名：助手
研究者番号（8桁）：30165162

研究分担者氏名：佐藤 格夫
ローマ字氏名：Norio Sato
所属研究機関名：愛媛大学
部局名：医学系研究科
職名：寄附講座教授
研究者番号（8桁）：30409205

研究分担者氏名：小池 薫
ローマ字氏名：Kaoru Koike
所属研究機関名：京都大学,
部局名：医学研究科,
職名：教授
研究者番号（8桁）：10267164

研究分担者氏名：金武 潤
ローマ字氏名：Jun Kanetake
所属研究機関名：防衛医科大学校
部局名：医学教育部医学科専門課程
職名：教授
研究者番号（8桁）：90326661

(2)研究協力者

なし。