

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592116

研究課題名(和文) ヒト脳組織スライスの検討によるてんかん原性の発現・獲得過程の解明

研究課題名(英文) Investigation for early epileptogenetic features of human cortical tissues

研究代表者

大石 誠(OISHI, Makoto)

新潟大学・脳研究所・非常勤講師

研究者番号：00422593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：脳組織において「てんかん原性」がいかに発現し獲得されるかは、いまなお解明されていない。本研究では、脳神経外科手術摘出直後の生きた大脳組織標本を実験に活用し、当施設で開発された蛍光イメージング(フラビン傾向反応)による組織の生理学的反応、特に刺激の易伝播性と、免疫組織学的所見・病理組織検索による抑制ニューロンの脱失所見が相関すること、しかもてんかん発症初期にすでにこの所見が見られていることを明らかにすることに成功し、てんかん原性の発現と獲得の過程の一部を視覚化し得ることができた。

研究成果の概要(英文)：To characterize the physiological condition of human epileptic neocortex, we employed flavoprotein fluorescence imaging (FFI) and immunohistologically studied human cortical specimens. We found that correlations between specific FFI findings and decreases in parvalbumin positive neurons may represent an imbalance between excitatory and inhibitory systems in the epileptic neocortex. We believed that the characteristics of human cortical tissues in the early epileptogenetic stage have been visualized by this study.

研究分野：てんかん

キーワード：てんかん原性 神経生理 大脳皮質 神経ネットワーク

1. 研究開始当初の背景

(1) 「てんかん」に対して薬物治療や手術治療など取り組まれているが、いまだに脳に何が起きると「てんかん」を発病するかというメカニズムが明らかでなく、現在の医療を持ってその予防や根治には至っていない。

(2) 私達の施設(新潟大学脳研究所)では、日本で最古から「てんかん」の手術治療を行っており、また神経に関わる基礎的研究も積極的に行われているため、臨床と基礎の両面から「てんかん」の獲得に関する研究が行える環境があった。

(3) 特に**フラビン蛍光法**という神経組織の活動を特殊波長で直接可視化できる内因性イメージング法は、施設内(システム神経生理部門、渋谷克栄教授)で開発された方法であり、まとまった神経活動を直接観察することができる画期的方法であった。

2. 研究の目的

(1) 脳腫瘍などで手術切除が行われる脳標本を生きた状態の下で用い、「てんかん」の有無による脳組織の刺激に対する反応の違いを調べる。

(2) 特にフラビン蛍光法を用いた生理学的実験により、「てんかん」を発病する脳組織内に持っているであろう易興奮性・易伝播性を視覚的に証明し、「てんかん」のない組織との差を明らかにする。

(3) 実験に使用した組織の病理学的検索を行い、てんかん性組織の実態を生理学的所見を病理学的に裏付けを取り、最終的に脳組織が「てんかん」を獲得してゆく過程を明らかにしたい。

3. 研究の方法

(1) 新潟大学医歯学総合病院で、脳腫瘍や血管奇形などの摘出手術に際し、近隣の脳実質の一部を摘出する症例を対象とした。手術室で組織摘出前に脳表での脳波記録を行い、てんかん波の見られる部にはマーキングを行った。一塊にして摘出した標本は、摘出直後から人工髄液に浸し酸素投与を行い、組織が死滅しない状態を保ちながら、病院直結の脳研究所実験室へ移送した。

(2) 実験室にて、摘出組織から細胞の生存状態が維持されている部を切り出した。特殊波長の青色光照射に対するフラビン蛍光反応を観察するために、CCDカメラを搭載した顕微鏡下で、切り出した切片の脳皮質に相当する部を電気刺激した際の活動の伝播する範囲、方向、強さなどのフラビン蛍光反応の観察を行い記録した。同時に組織の微小電位

変化の記録も行った。実験は組織の生存時間、約6時間程度の間で可能であった。

(3) 後日、実験後の標本に対して診断に必要な一般的な病理学的検索と、今回の実験用の免疫組織学的検索を行った。免疫組織学的検索では、抑制系ニューロンの存在を反映する数種類のカルシウム結合タンパク受容体抗体存在を調べ、これにより組織のもつ過剰興奮に対する抑制力の評価を行った。

(4) 組織のてんかんの有無やその程度と、実験で得られた結果を比較し、そこに何らかの傾向が見られるかどうかの検証を行い、てんかん原性の獲得機序に関する考察を行った。

4. 研究成果

(1) 代表的な実験結果を(図1)に提示する(発表論文より抜粋)。

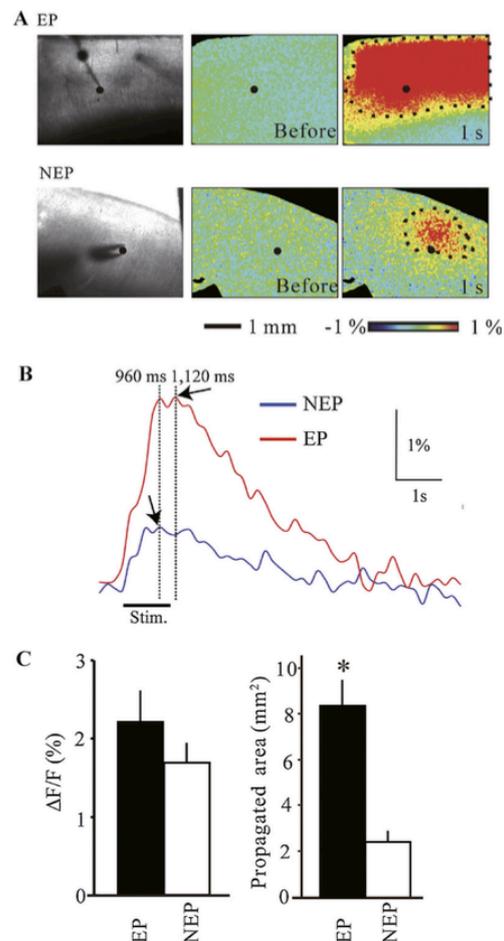


図1. てんかん性組織と非てんかん性組織での電気刺激に対するフラビン蛍光反応の差異

図中の上段 A では、EP がてんかん性組織、NEP が非てんかん性組織である。真ん中の黒点部で微小電極刺激を行った際に、組織の電気活動的な興奮を証明するフラビン蛍光反応を呈した部分が赤く示されており、EPの方が明らかに広範囲に及んでいることが分

かる。

中段Bは反応のピークが見られた部位で計測した反応強度の経時的データであり、EPでは反応強度もNEPより高いことが分かる。

下段Cのデータは、実験を行った全てのEP群とNEP群において、反応強度（左側）と反応の伝播範囲の広さ（右側）を比較したものである。このデータから、EP群とNEP群ではとりわけ反応の伝播範囲に顕著な差があり、てんかん性組織においては、その興奮性が高いこともさることながら、大脳皮質の組織内における電気活動の伝播性が高いことを明らかにすることができた。

(2) 図1のような、各組織のフラビン反応の伝播範囲と反応強度に対し、免疫染色で得たカルシウム結合タンパク受容体抗体の存在状況（PV陽性細胞）を関連づけた結果が図2である（発表論文より抜粋）。

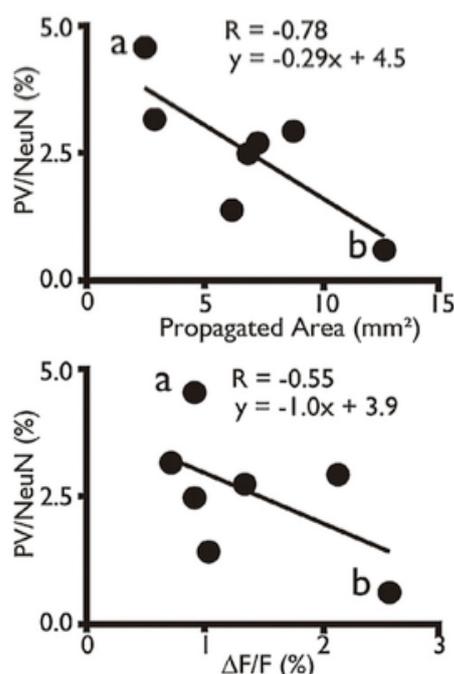


図2. PV陽性細胞の存在とフラビン反応の相関

全体の細胞の中でのPV陽性細胞率を縦軸に比較すると、伝播範囲とは明らかな逆相関が得られ、PV陽性細胞の脱失が激しいほど、組織内の伝播所見も広範囲に及ぶことがデータを持って明らかにできた。つまりてんかん性組織のもち易伝播性は抑制ニューロンが脱失して行くことで起こって行くのではないか、ということを改めて視覚的に明らかにすることができたと言える。

(3) 臨床所見と合わせて検討をすると、今回の症例群は基礎疾患がすべて脳腫瘍や脳血管奇形などの後天性の病態であり、てんかん性組織としても、それぞれ数回の発作を起こしたという程度であり、「てんかん」という

観点では歴史の浅い標本ばかりであった。しかし、そのような標本群でもフラビン反応の範囲や強度、抑制ニューロンの脱失の程度などが明らかにされ、脳組織がてんかんを獲得して行く過程では、かなり早い段階から抑制ニューロンが脱失して行っているという事実が明らかにされた。てんかんの予防や根治に至る治療法の確立において、抑制ニューロンに注目した研究が今後もっと焦点が当てられるべきであろうと考えられた。

(4) 我々は今までの臨床例での各種検査や手術による結果を通して、「てんかん原性の発現・獲得」の過程を図3の通り想定して来た。

脳組織内局所の過剰興奮①→周囲の抑制系とのバランスの破綻・抑制系の脱落②、①と②が相乗効果で組織のてんかん性を強め、易興奮性・易伝播性の獲得③→「てんかん原性」組織の確立④、という過程である。

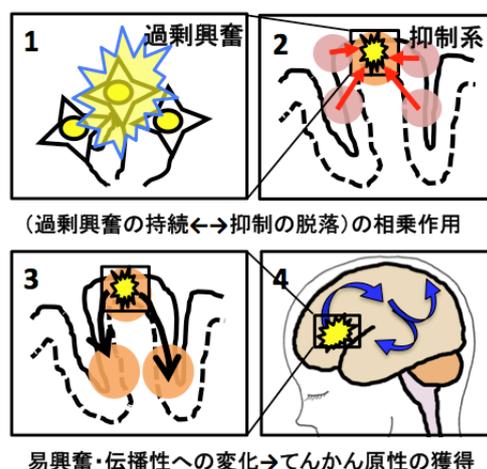


図3. 我々の考えるてんかん原性の発現と獲得の仮説

本研究での一連の結果により、上述の我々の仮説を、組織学的な視点から改めて裏付けることができた。

今後も研究を継続することで、得られたデータのファイリングを進め、最終的には脳組織のてんかん原性発現・獲得に至る「ステージ分類」を提案することが可能となるのではないかと考えている。そして、大脳に損傷を来す脳腫瘍・脳挫傷・脳卒中などにおいて、てんかんの発生を予防できる新たな治療法の発見に結び付けたいと願っている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- ① Hiraishi T, Kitaura H, Oishi M, Fukuda M, Kameyama S, Takahashi H, Kakita A, Fujii Y. Significance of horizontal

propagation of synchronized activities in human epileptic neocortex investigated by optical imaging and immunohistological study. *Epilepsy Res*, 査読有, 104 巻, 2013, 59-67.

DOI: 10.1016/j.eplesyres.

- ② Hiraishi T, Oishi M, Kitaura H, Ryufuku M, Fu YJ, Fukuda M, Takahashi H, Fujii Y, Kakita A. Epidermoid cyst involving the medial temporal lobe: surgical pathologic features of the epileptogenic lesion. *Neuropathology*, 査読有, 32 巻, 2012, 196-201.

DOI: 10.1111/j.1440-1789.

- ③ Kitaura H, Oishi M, Takei N, Fu YJ, Fukuda M, Takahashi H, Shibuki K, Fujii Y, Kakita A. Periventricular nodular heterotopia functionally couples with the overlying hippocampus. *Epilepsia*, 査読有, 53 巻, 2012, e127-31.

DOI:10.1111/j.1528-1167.2012.03509.

- ④ Oishi M, Ishida G, Morii K, Hasegawa K, Sato M, Fujii Y. Ictal focal hyperperfusion demonstrated by arterial spin-labeling perfusion MRI in partial epilepsy status. *Neuroradiology*, 査読有, 54 巻, 2012, 653-6.

DOI: 10.1007/s00234-012-1027-7.

[学会発表] (計 2 件)

- ① 大石 誠, 三橋大樹, 鈴木健司, 川口 正 第 48 回日本てんかん学会「大脳局所損傷後慢性期の非痙攣性てんかん重積」2014 年 10 月 3 日, 京王プラザ, 東京.
- ② 大石 誠, 石田 剛, 森井 研, 長谷川 顕治, 佐藤光弥, 藤井幸彦. 第 42 回日本神経放射線学会「Ictal focal hyperperfusion demonstrated by arterial spin-labeling perfusion MRI in partial epilepsy status」2013 年 2 月 16 日, 北九州国際会議場, 福岡.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
○取得状況 (計 0 件)

[その他] なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大石 誠 (OISHI, Makoto)
新潟大学・脳研究所・非常勤講師
研究者番号: 00422593

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

平石 哲也 (HIRAISHI, Tetsuya)
新潟大学・医歯学総合病院・医員
研究者番号: 80515734

北浦 弘樹 (KITAURA, Hiroki)
新潟大学・脳研究所・助教
研究者番号: 80401769

(4) 研究協力者

なし.