

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 29 日現在

機関番号：32666

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26670359

研究課題名(和文) 死亡直前のけいれんの有無を死体髄液の核磁気共鳴分析を用いて診断する試み

研究課題名(英文) An experimental trial to determine the presence and absence of antemortem seizure using nuclear magnetic resonance analysis of rat postmortem cerebrospinal fluid

研究代表者

平川 慶子 (HIRAKAWA, KEIKO)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：30165162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ラットの死後髄液についてNMR計測を行い、生前のけいれんの有無を髄液で識別できるか検討した。ラットをけいれん誘発群(ペンテトラゾール(PTZ))、抗けいれん薬単独投与群(ペントバルビタール(PB))、けいれん抑制群(PTZ+PB)、対照群に分け、各薬物を腹腔内投与した。炭酸ガス暴露による安楽死後、髄液を採取し、プロトンNMR測定を行った。得られたNMRデータを数値化し、多変量解析を行った。主成分法による解析では、各群のスコアは群ごとに異なる領域に分布した。

研究成果の概要(英文)：We performed nuclear magnetic resonance (NMR) analysis for rat postmortem cerebrospinal fluid (CSF) and ascertained if presence and absence of antemortem seizure could be detected. Male Sprague-Dawley rats (9 weeks, 220 g) were randomized into four groups. 1) seizure group (n=13); saline (12mL/kg) ip + pentylentetrazole (PTZ) (70 mg/kg) ip 6 hrs later, 2) seizure suppression group (n=10); pentobarbital (PB) (90mg/kg) ip + PTZ ip 6 hrs later, 3) anticonvulsant alone group (n=13); PB ip + saline (1.75mL/kg) ip 6 hrs later, 4) control group (n=9); saline + saline ip 6 hrs later. After animals were euthanized by CO2 gas, CSF samples collected in the cisternal compartment were analyzed by proton NMR spectroscopy. The NMR spectral profile of 4 groups showed separation and clustering on a PCA score plot.

研究分野：法医学

キーワード：けいれん 死後髄液 核磁気共鳴法 パターン認識 死体検案

## 1. 研究開始当初の背景

死体検案時、髄液検査は日常的に行われているが、その用途は頭蓋内出血の有無の確認に限られる。一方、髄液が肉眼的に透明な場合でも、髄液中には多くの情報が含まれると考えられる。我々は、死体の髄液・血清等の NMR 分析により、死因や生前情報が検出できるのではないかと考え、「試料に含まれる情報を精度よく検出する、NMR 信号処理とデータ解析法」の開発を進めてきた。

てんかん等のけいれん性疾患のある人が溺没や交通事故等で発見された場合、内・外因死の鑑別は法医診断における重要な事案のひとつであるが、死亡前のけいれん発作の有無を決定することは難しい。死亡前のけいれん発作の有無を死体所見から確認する方法を開発できれば、法医学者にとって大きな福音となる。

死亡前のけいれん発作の有無を髄液検査所見で判断できるかどうかは、未だ検討されていない。我々は以前、小児科医と共同研究を行い、発病直後には鑑別の難しい 2 疾患、①重篤な後遺症を残す「急性脳症」と②良好な経過をたどる「複雑性熱性けいれん」において、発症直後に採取した患児髄液を NMR 分析し、両者を鑑別することに成功した (引用文献欄に記載)。

## 2. 研究の目的

ヒトへの応用に向けた基礎的知見を得るため、本研究ではラットを用いたけいれん誘発実験を行い、死体髄液を NMR 分析すると、死亡前のけいれんの有無を確認できるかどうかを検討した。

## 3. 研究の方法

### ①ペンテトラゾール単回投与けいれん誘発実験

#### (1) 使用動物

9 週齢 SD 雄ラット (体重 約 220g) を使用した。

#### (2) 薬物投与によるけいれん誘発実験

ペンテトラゾール (PTZ) 投与によるけいれん誘発を行なった。PTZ 自体の薬理学的影響も考慮する必要があるため、PTZ が誘発するけいれんを抑制する目的で、抗けいれん薬の (ペントバルビタール (PB)) の投与も行なった。本研究では、PTZ と PB の投与の有無により、ラットを以下の 4 群に分けた。

#### けいれん誘発群 (n=13)

生食 (12mL/kg) を腹腔内投与 6 時間後、PTZ (70mg/kg) を腹腔内投与。

#### けいれん抑制群 (n=10)

PB (90mg/kg) を腹腔内投与 6 時間後、PTZ (70mg/kg) を腹腔内投与。

#### 抗けいれん薬単独群 (n=13)

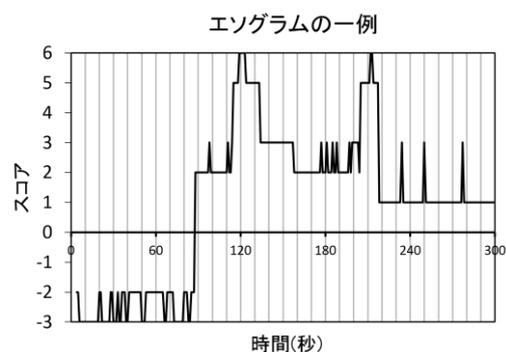
PB (90mg/kg) を腹腔内投与 6 時間後、生食 (1.75mL/kg) を腹腔内投与。

#### 対照群 (n=9)

生食 (12mL/kg) を腹腔内投与 6 時間後、生食 (1.75mL/kg) を腹腔内投与。

#### (3) けいれん症状の観察・記録

実験中、各個体の行動を観察し、下表に定めるスコアに従って、けいれんの有無・程度等を記録した。また、観察期間中はビデオ撮影を行い、再生録画を用いて、行動観察記録の確認、修正等を行った。実験終了後、各個体について、単位時間ごとのスコアを、エソグラムとして可視化した。



## 行動観察に使用したスコア

### 【けいれん誘発群】

6	側臥位での間代性もしくは強直-間代性けいれん and/or けいれん性跳躍
5	腹臥位での間代性もしくは強直-間代性けいれん and/or 純強直性けいれん
4	座位での間代性けいれん
3	頸部攣縮
2	鼻もしくは鼻・口部の顔面攣縮
1	突然の行動停止 and/or 不動凝視
0	通常の静穏
-1	毛づくろい
-2	探索行動
-3	立ち上がり

### 【けいれん抑制群・抗けいれん薬単独群】

a6	呼吸数の低下
a4	麻酔
a3	正向反射の停止・不動
a1	よろめき歩行・立ち上がり時のふらつき
0	通常の静穏
-1	毛づくろい
-2	探索歩行
-3	立ち上がり

### 【対照群】

0	通常の静穏
-1	毛づくろい
-2	探索歩行
-3	立ち上がり

### (4) 髄液の採取

PTZ 投与の3分後、二酸化炭素ガスの暴露により安楽死させた。心停止確認後、ただちにラット後頭部正中を皮切し、皮下組織・筋肉を剥離後、環椎後頭膜を露出してから、トンボ針を大槽に刺入し、髄液を100-200 $\mu$ L採取した。

### ②NMR 計測およびデータ解析

#### (1) 検体の前処理・保存など

採取した髄液は、遠心分離により不溶成分を除去し、-80 $^{\circ}$ Cに保存した。NMR 計測時に解凍して使用した。

#### (2) NMR 測定試料の調整

解凍した髄液に、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。

#### (3) NMR 計測およびデータ処理

NMR 装置は7テスラ(300MHz)FT-NMR 装置(JEOL)を使用した。測定核種はプロトン( $^1$ H)について行った。多検体の連続自動測定が可能なケモメトリクス用データ収集プログラムを用いて、CPMG 測定を行った。Alice2 ver5.5(JEOL)を使って、通常の NMR データ処理を行ってスペクトルを確認し、Alice2 for metabolome ver1.0 (JEOL) の bucket 積分機能を用いて各スペクトルの数値化処理を行った。

#### (4) ケモメトリクスによる解析

数値化した各個体の NMR スペクトルデータをひとつのデータセットとして、Unscrambler<sup>®</sup>ver10.3(CAMO)に読み込み、主成分分析(PCA)による解析を行った。

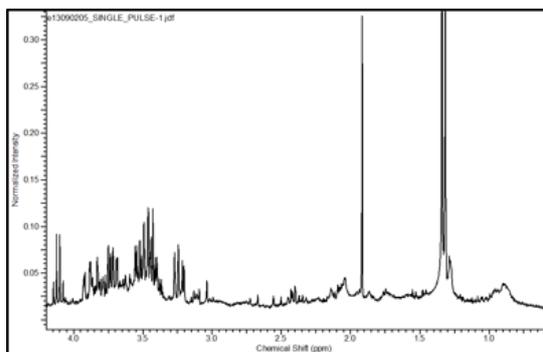
## 4. 研究成果

### ①けいれん症状について(行動観察)

観察を行った薬物投与開始後から安楽死までの各個体の行動について、1秒ごとのスコアで作成したエソグラムを使って、各個体のけいれん症状等についての評価を行った。

本実験では、薬物投与のみで死亡した個体はなかった。けいれん誘発群では、明らかにけいれん発作（スコア〇以上）が確認された個体は〇例、軽度のけいれん様発作（スコア〇～〇）を示した個体は〇例で、観察中けいれん発作が全く確認されなかった個体は〇例であった。けいれん抑制群では、全例においてけいれん発作は全く確認されず、観察中は昏睡状態（スコア〇以上）であった。抗けいれん薬単独群は、全例で観察中は昏睡状態を示し、対照群は全例、通常の平穏状態であった。

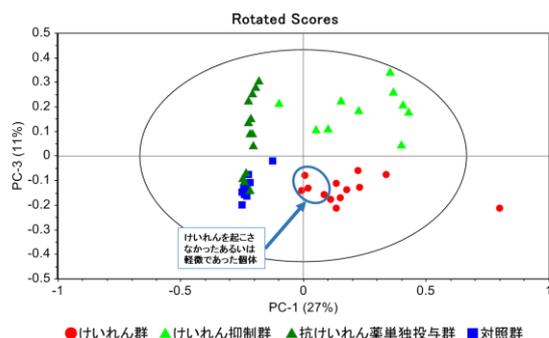
### ②ラット死後髄液の<sup>1</sup>H-NMR スペクトル



CPMG 測定後、フーリエ変換処理によって得られたラット死後髄液の<sup>1</sup>H-NMR スペクトルである。

### ③ケモメトリクスによる解析結果

「けいれん誘発群」「けいれん抑制群」「抗けいれん薬単独群」「対照群」の髄液 NMR データについて、主成分分析を行った。



主成分 1 (Pc1) と主成分 3 (Pc3) によるスコアプロットでは、各群は 4 領域に分かれて分布した。各個体のスコア値と、エソグラムデータを比較検討したところ、「けいれん誘発群」のなかで、観察中けいれん発作を起こさなかった 2 個体、あるいは軽微な症状であった 2 個体が、対照群に近いスコア値となったことがわかり、これは症例とスコア値の関連性を考えるうえで興味深い知見であった。

今回、予備的実験ではあるが、ラット死後髄液の NMR データをケモメトリクスの手法によって解析することで、薬物投与によるけいれんの誘発およびけいれんの抑制を死後に識別できる可能性が示唆された

今後さらに詳細な解析を行うことにより、死亡前のラットの行動様態と死後髄液成分との関連付けを進める予定である。

### <引用文献>

Visualization of different characteristics of cerebrospinal fluid with acute encephalopathy and febrile seizures using pattern recognition analysis of <sup>1</sup>H NMR. Asano, K., Hirakawa, K., Koike, K., Ohno, Y., and Fujino, O. Pediatric Research 77 (1) 70-74 (2015)

### 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 2 件)

(1) Profiling of postmortem cerebrospinal fluid in rats with pentylentetrazole-induced seizures using nuclear magnetic resonance spectroscopy

KANAWAKU Y, HATANAKA N, HIRAKAWA K, KOIKE K, OHNO Y, KONTA T, HARADA K, KANETAKE J  
9 t h International Symposium on ADVANCES IN LEGAL MEDICINE / 第 98 次日本法医学会学術全国集会 2014 年 6 月 福岡

(2) 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  
金涌佳雅, 平川慶子, 小池 薫, 原田一樹,  
大野曜吉, 金武 潤 第99次日本法医学会学術全国集会 2015年6月 高知

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称:

混合物試料に由来する電磁波信号を処理する方法及び混合物試料の属性を識別する方法

発明者:

小池薫、平川慶子、大野曜吉、森山剛、森川秀行、村木秀樹

権利者:

国立大学法人京都大学、学校法人日本医科大学、学校法人東京工芸大学、株式会社ニユフローズ

種類: 特許権

番号: PCT/JP2014/082616

出願年月日: 2014年12月10日

国内外の別: 国外 (PCT 出願)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平川 慶子 (HIRAKAWA KEIKO)

日本医科大学 医学部

助教

研究者番号: 30165162

### (2) 研究分担者

小池 薫 (KOIKE KAORU)

京都大学 医学(系) 研究科(研究院)

教授

研究者番号: 10267164

### (3) 連携研究者

金涌 佳雅 (Kanawaku Yoshimasa)

日本医科大学 医学(系) 研究科(研究院)

講師

研究者番号: 80465343

### (4) 連携研究者

森山 剛 (MORIYAMA TSUYOSHI)

東京工芸大学 工学部

准教授

研究者番号: 80449032

### (5) 連携研究者

大野 曜吉 (Ohno Youkichi)

日本医科大学 医学(系) 研究科(研究院)

教授

研究者番号: 70152220

### (6) 連携研究者

金武 潤 (MORIYAMA TSUYOSHI)

防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究 / 医学教育部医学科専門課程

教授

研究者番号: 90326661