

—— 研究褒賞受賞記念報告 ——

てんかん原性大脳皮質形成異常の病理学的病態解明： 結節性硬化症皮質結節とFCD type IIbの免疫組織化学的比較検討

Unraveling the pathology and pathogenesis of epilepsy-associated malformations of cortical development: immunohistochemical comparative studies on cortical tuber of tuberous sclerosis complex and FCD type IIb

宮 田 元

要旨：Focal cortical dysplasia (FCD) type IIbは原因不明のてんかん原性脳病変である。その組織像が結節性硬化症（TSC）の皮質結節と類似することを踏まえ、FCD type IIbの病態解明を目的として、両者の病理学的異同について比較検討した。ヒト発達期剖検脳と各種てんかん原性脳病変の切除組織を対象として、1) TSC遺伝子産物とERM蛋白、2) インスリンシグナル伝達系物質、3) 線維芽細胞増殖因子（FGF-2）、および4) キヌレニン経路関連物質の発現について免疫組織化学的比較検討を行った。その結果、TSC皮質結節とFCD type IIbに共通する病態の一端を示すとともに、細胞内シグナル活性化機序やてんかん原性獲得機序が異なる可能性を示した。今後はこれらの相違点をより詳細に検討することにより、FCD type IIbの病態解明のさらなる進展が期待される。

てんかん治療研究振興財団 研究年報 2015；26：15-22

Key Words：cortical tuber of tuberous sclerosis complex (TSC), focal cortical dysplasia (FCD) type IIb, morphogenesis, insulin signaling pathway, epileptogenicity

序論

びまん性ないし限局性の大脳皮質形成障害を生じる様々な疾患を総称してmalformation of cortical development (MCD) という^{1,2)}。MCDには遺伝子異常の解明されている疾患と未だ解明されていないものが含まれている。前者では結節性硬化症（tuberous sclerosis complex：TSC）の皮質結節（cortical tuber：TSC-tuber）が、後者ではfocal cortical dysplasia (FCD)³⁾が、乳幼児のウェスト症候群（infantile spasms）や小児期の精神発達遅滞、運動発達障害や難治性てんかんの基礎疾患や責任病巣として知られている。組織学的には神経細胞層構築の著しい乱れに加え

て異常形態を示す神経細胞（dysmorphic neuron：DN）や肥胖性アストロサイト様の異常細胞（balloon cell：BC）が見られる^{1,2,4,5)}。臨床的にTSCが否定的で、かつ組織学的にDNのみが見られる皮質層構築異常はFCD type IIa、DNとBCの両者が見られる病変はFCD type IIbと分類されている⁶⁾。とくにFCD type IIbの組織像がTSC-tuberと類似することから、両者の異同をめぐり病理学的にも分子生物学的にも強い関心を集めてきた^{1,4,5,7,8)}。しかしながらFCD type IIの原因は未だ不明であり、その病態解明は遅れている。

基礎研究により、TSC遺伝子が個体発生において様々な機能を発揮することが示されてい

る^{1,4,5,7,8)}。例えば、TSC1遺伝子産物 (hamartin) はERM (Ezrin-Radixin-Moesin) 蛋白のezrinと結合してRhoA (Ras homologous member A) を活性化し、細胞の接着や移動、細胞極性を制御する⁹⁾。また、hamartinとTSC2遺伝子産物 (tuberin) は相互作用してインスリンシグナル伝達系を抑制し、細胞の大きさを規定する¹⁰⁾。一方、線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor) も神経栄養因子として個体発生において細胞増殖や移動、分化、生存などの調節といった様々な機能を有している。なかでもFGF-2は神経細胞やグリア細胞の分化¹¹⁾、皮質形成^{12,13)}、シナプス形成¹⁴⁾に重要な役割を演じるとされている。しかしながら、これらの基礎的知見のヒト脳組織や病変組織での病理学的検証はほとんど行われていない。また、病変のてんかん原性は興奮系と抑制系の不均衡により説明されることが多いが、DN自体の電気生理学的異常も指摘されている¹⁵⁾。臨床的には、患者のてんかん原性病巣が α -[¹¹C]-methyl-L-tryptophan (AMT)-PETで高取込みを示すことが報告されている^{16,17)}。AMTの取込み増加は5-HTの合成亢進を示唆し、実際に皮質異形成に隣接する大脳皮質で5-HTの発現増加が報告されている¹⁸⁾。さらに、tryptophan代謝経路であるkynurenine経路ではNMDA受容体作動物質quinolinic acid (QUIN) やNMDA受容体拮抗物質kynurenic acid (KYNA) が生成される。この代謝経路の動向はAMT高取込みを示す病巣のてんかん原性獲得機序を考察するうえで注目値する。

以上のことを踏まえ、筆者を含む共同研究チームはTSC-tuberとFCD type IIbの病理学的異同を明らかにすることによりFCD type IIbの病態解明に寄与することを目的として、ヒト剖検脳と手術検体を用いて免疫組織化学的検討を行った。

方法

本稿で紹介する研究成果は筆者らが2002年以降に報告した6論文^{1,19-23)}の概略²⁴⁾であるが、各論文で使用した皮質異形成の組織分類や用語が年代により異なる^{6,25,26)}。そこで、これらを総

説するにあたり用語の統一を図るのが望ましいと考え、各論文で検討した症例をILAE分類⁶⁾にしたがって組織学的に再評価した。その結果、FCD with BCとFCD without BCの全例がそれぞれFCD type IIbとFCD type IIaと分類され、Palmini分類²⁶⁾のFCD type IBと分類された3例²³⁾も再検討の結果、FCD type IIaと診断した。このことによる各論文における図・表の数値に変更は生じなかった。また、本報告では便宜上、TSC-tuberに認められる異常神経細胞 (dysplastic neuron) と肥大型アストロサイト様細胞 (giant cell) もFCD type IIと同様にそれぞれDNとBCと呼称する。

実験1 細胞形態異常の病理学的機序に関する検討^{1,19)}

対象：ヒト発達期剖検脳7例 (妊娠20, 21, 30週、生後3ヶ月, 8, 10, 33歳), TSC-tuber 5例, FCD type IIb 9例, および側頭葉てんかん海馬硬化症 (29歳, 女性) の切除側頭葉。

方法：パラフィン切片を用いて、ABC法による免疫組織化学により、ezrin, moesin, vimentin, GFAP, tuberin²⁷⁾, hamartin²⁷⁾の発現を検討した (Tab. 1)。なお、全ての実験において免疫反応はDABで可視化し、ヘマトキシリンで対比染色を行った。

実験2 インスリンシグナル伝達系の恒常的活性化に関する検討²⁰⁾

対象：難治性てんかん患者63例 (TSC-tuber 8例, FCD type IIb 22例, FCD type IIa 9例, 側頭葉てんかん等の組織学的に正常な大脳新皮質 (N-CTX) 24例, TSC-tuberとFCD type IIbに隣接する組織学的に比較的正常な大脳新皮質 (Ad-CTX) 12例) の切除組織。

方法：各症例のパラフィンブロックから直径0.6 mmの組織円柱を無作為に9箇所採取し、組織マイクロアレイパラフィンブロックを作製した²⁸⁾。ポリマー標識法による免疫組織化学により、p-Akt, p-mTOR, p-p70 S6K, p-S6, p-eIF4Gの発現を検討した (Tab. 1)。

実験3 線維芽細胞増殖因子の発現とその病理学的意義に関する検討^{22,23)}

対象：ヒト発達期剖検脳30例 (妊娠12週—生後15歳) および実験2と同一症例を含む難治性て

Tab. 1 Primary antibodies used in this study

Antibody	Clone	Specificity	Dilution	Source
Ezrin	18	Ezrin (80kDa)	1:70	Transduction Laboratories
Moesin	38	Moesin (78kDa)	1:150	Transduction Laboratories
Moesin Ab-1	38/87	Moesin (78kDa), Radixin (80kDa)	1:500	NeoMarkers
Tuberin	polyclonal	α p1 tuberin	1:300	Johnson MW et al, 1999 ²⁷⁾
Hamartin	polyclonal	C-term hamartin	1:800	Johnson MW et al, 1999 ²⁷⁾
GFAP	polyclonal	Glial fibrillary acidic protein	1:300	DAKO
Vimentin	V9	Vmentin	1:75	DAKO
p-Akt	polyclonal	Phospho-Akt (Ser473)	1:50	Cell Signaling Technology
p-mTOR	polyclonal	Phospho-mTOR (Ser2448)	1:50	Cell Signaling Technology
p-S6	polyclonal	Phospho-S6 (Ser240/244)	1:50	Cell Signaling Technology
p-S6	polyclonal	Phospho-S6 (Ser235/236)	1:50	Cell Signaling Technology
p-eIF4G	polyclonal	Phospho-eIF4G (Ser1108)	1:50	Cell Signaling Technology
p-p70 S6K	1A5	Phospho-p70 S6 kinase (Thr389)	1:50	Cell Signaling Technology
FGF-2	polyclonal	Fibroblast growth factor-2	1:50	Santa Cruz Biotechnology
QUIN	polyclonal	Quinolinic acid	undiluted	CHEMICON
KYNA	polyclonal	Kynurenic acid	undiluted	QED Bioscience Inc.
IDO	10.1	Indoleamine 2,3-Dioxygenase	1:50	CHEMICON
5-HT	5HT-H209	Serotonin (5-HT)	1:25	DAKO

んかん患者70例（TSC-tuber 12例, FCD type IIb 24例, FCD type IIa 11例, N-CTX 23例, Ad-CTX 14例）の切除組織。

方法：剖検脳のパラフィン切片およびてんかん患者70例の組織マイクロアレイパラフィンブロックから切片を作製し、ポリマー標識法による免疫組織化学により、FGF-2の発現を検討した（Tab. 1）。

実験4 てんかん原性獲得機序における興奮性神経毒の関与に関する検討²¹⁾

対象：難治性てんかん患者63例（実験2と同一症例）の組織マイクロアレイパラフィン切片と、これらの症例には含まれないTSC-tuber 2例およびFCD type IIb 2例の新鮮凍結切片

方法：パラフィン切片はポリマー標識法、凍結切片はABC法による免疫組織化学により、QUIN, KYNA, IDO, 5-HTの発現を検討した（Tab. 1）。

結果

実験1 ヒト発達期脳におけるERM蛋白の発現は主としてezrinが胎児期ではgerminal matrixのグリオblastと放射状グリアおよび中間帯を移動中と考えられる未熟細胞に強く発現し、生後脳ではアストロサイトに発現して

いた。Moesinは全ての年齢において主として血管内皮細胞に発現していた。TSC-tuberとFCD type IIbでは主としてBCで、GFAP発現の有無にかかわらずtuberin, hamartin, ezrin およびmoesinの発現増強が認められ、これらが同一細胞内に共存していた。

実験2 TSC-tuberではDNとBCにmTOR以下のリン酸化分子が全て発現していたが、FCD type IIbでは異常細胞の胞体にp-p70 S6Kの発現が認められないにもかかわらず下流のp-S6とp-eIF4Gが発現していた（Fig. 1）。

実験3 発達期脳におけるFGF-2の発現は経時的にマトリックス細胞や神経芽細胞からグリオblastや幼若アストロサイト、最終的に成熟アストロサイトに移行していき、大脳皮質の幼若神経細胞にはFGF-2の発現は認められなかった。TSC-tuberとFCD type IIbではDNとBCがFGF-2を発現し、FCD type IIaや対照群に比してFGF-2陽性細胞率が有意に高かった。FCD type IIaや対照群では反応性および正常アストロサイトにFGF-2の発現が見られ、DNや神経細胞にその発現はほとんど認められなかった。

実験4 TSC-tuberでは8例中4例（50%）の、FCD type IIbでは22例中1例（4.5%）のDNやBCにIDOの発現が認められ、その他の症例に

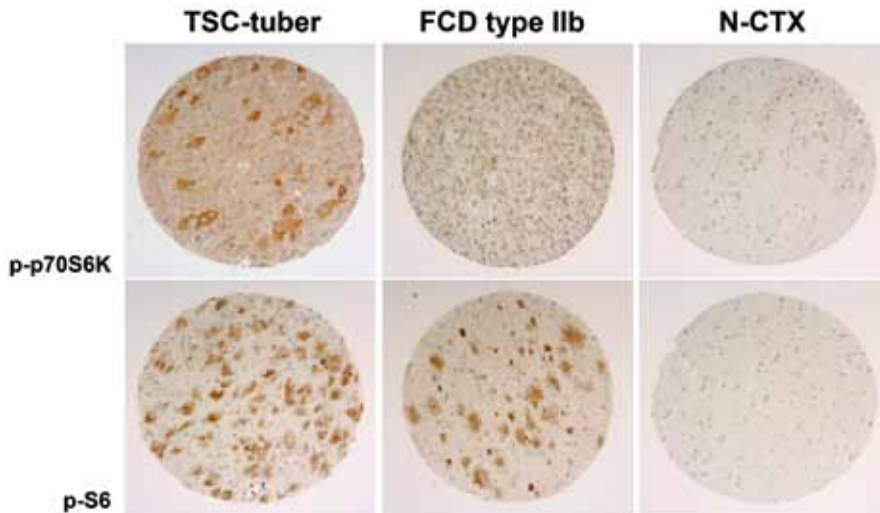


Fig. 1 Representative immunohistochemical results from samples in the tissue microarray. The left column represents samples from cortical tuber of tuberous sclerosis complex (TSC-tuber), middle column, focal cortical dysplasia (FCD) type IIb, and the right column, histologically normal cerebral cortex (N-CTX), stained with p-p70S6K (upper row) and p-S6-Ser240/244 (lower row), performed on consecutive serial sections. Each core has a 0.6 mm diameter. The expression of p-p70S6K appears to be specific to TSC-tuber. Note the population of abnormal neuroglial cells in TSC-tuber expressing p-S6 despite negative expression of p-p70S6K, similar immunohistochemical characteristics of abnormal neuroglial cells observed in FCD type IIb. Photographs are modified from Miyata H et al, 2004²⁰⁾.

IDOの発現は認められなかった。未固定凍結切片の検討ではFCD type IIb 2例中2例 (100%) の反応性アストロサイトやBCでQUINが検出された。

考察

ヒト発達期脳におけるERM蛋白が主としてezrinが胎児脳では神経グリア前駆細胞に、生後脳では成熟アストロサイトに見られ神経細胞には発現が認められないことから、ERM蛋白はグリア細胞の成熟過程に関与している可能性がある。また、FGF-2の発現も経時的にマトリックス細胞や神経芽細胞からグリオblastや幼若アストロサイト、最終的に成熟アストロサイトに移行していき、大脳皮質の幼若神経細胞にはFGF-2の発現は認められなかった。このことから、FGF-2も主としてグリア発生過程に関与している可能性が示唆される。一方、TSC-tuberとFCD type IIbでは異常細胞とくにBCにおいてTSC1/2遺伝子産物とともにezrinと

moesinが同一細胞の胞体で発現増強し、FGF-2の発現はDNとBCの両者で増強していた。以上のことからTSC-tuberとFCD type IIbの異常細胞ではTSC遺伝子機能不全やこれに類似する何らかの異常によってhamartinとERM蛋白の相互作用が不十分となり、これらの蛋白の発現が増強している可能性が考えられる。また、生後脳ではezrinとFGF-2が成熟アストロサイトに発現し、神経細胞には発現が認められないことを併せて考慮すれば、BCはグリア発生過程の障害に関連して生じた細胞であることが示唆される。さらに、ezrinやFGF-2の発現がDNに遺残していることは、DNが神経芽細胞の成熟過程の障害に関連して生じた細胞である可能性を示唆する。FGF-2陽性細胞率はBCの有無と相関し、発達期脳における病理機序の生じた時期を反映する可能性も示唆される。以上のことから、TSC-tuberとFCD type IIbは、発達期脳において病理機序が生じたと想定される時期、および異常細胞 (DNとBC) の発生由来と形態形成機

序を示唆する各種蛋白の発現が類似しているといえる。

一方、本研究ではTSC-tuberとFCD type IIbでは細胞内シグナル活性化機序が異なる可能性も示された。このことはp70S6K非依存性S6活性化がFCD type IIbの病理機序に重要な役割を演じていることを強く示唆し、今後その機序が明らかになればFCD type IIbの病態解明に大きな進展が期待される。また、てんかん原性獲得機序に関する検討では、皮質異形成の少なくとも一部では病変組織におけるIDOの発現増強とこれによる興奮性神経毒QUINの産生・蓄積がてんかん原性獲得機序に関与している可能性と、病変部のアストロサイトやBCが発作活動に重要な役割を演じている可能性が示唆される。さらに、IDO発現率の差異から興奮性神経毒によるてんかん原性獲得機序がTSC-tuberに比較的多く関与している可能性が示唆される。

結論

TSC-tuberとFCD type IIbは、発達期脳における病理機序の発生時期、および異常細胞の発生由来と形態形成機序を示唆する各種蛋白の発現状態が類似している。しかしながら、mTORシグナル活性化機序やてんかん原性獲得機序におけるトリプトファン代謝と興奮性神経毒の関与については相違点が示唆される。

謝辞

本稿を終えるにあたり、ご指導とご鞭撻をいただきました堀智勝先生（東京女子医科大学名誉教授）、大浜栄作先生（鳥取大学名誉教授）、Harry V. Vinters先生（UCLA教授）に深い謝意を表します。また、本研究の遂行にご支援、ご協力いただきました共同研究者各位、鳥取大学医学部（旧）附属脳幹性疾患研究施設脳神経病理部門、UCLA神経病理部門ならびに秋田県立脳血管研究センター脳神経病理学研究部の関係者各位に厚くお礼申し上げます。

文献

1) Crino PB, Miyata H, Vinters HV. Neurodevelopmental disorders as a cause of seizures: Neuropathologic,

genetic, and mechanistic considerations. *Brain Pathol* 2002 ; **12** : 212-233.

- 2) Miyata H, Hori T, Vinters HV. Surgical pathology of epilepsy-associated non-neoplastic cerebral lesions: A brief introduction with special reference to hippocampal sclerosis and focal cortical dysplasia. *Neuropathology* 2013 ; **33** : 442-458.
- 3) Taylor DC, Falconer MA, Bruton CJ, Corsellis JA. Focal dysplasia of the cerebral cortex in epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1971 ; **34** : 369-387.
- 4) Miyata H, Vinters HV. Pathology of childhood epilepsies. In: Wallace SJ, Farrell K, eds. *Epilepsy in Children*. 2nd ed. London: Edward Arnold, 2004 : 81-94.
- 5) Vinters HV, Salamon N, Miyata H, Khanlou N, Mathern GW. Neuropathology of developmental disorders associated with epilepsy. In: Engel J Jr., Pedley TA, eds. *Epilepsy: a comprehensive textbook*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2008 : 137-160.
- 6) Blümcke I, Thom M, Aronica E, Armstrong DD, Vinters HV, Palmini A, et al. The clinicopathologic spectrum of focal cortical dysplasias: a consensus classification proposed by an ad hoc Task Force of the ILAE Diagnostic Methods Commission. *Epilepsia* 2011 ; **52** : 158-174.
- 7) Vinters HV, Miyata H. Tuberous sclerosis. In: Golden JA, Harding BN, eds. *Pathology & Genetics. Developmental Neuropathology*. Basel: ISN Neuropath Press, 2004 : 79-87.
- 8) Vinters HV, Miyata H. Neuropathologic features of tuberous sclerosis. In: McLendon RE, Rosenblum MK, Bigner DD, eds. *Russell & Rubinstein's Pathology of Tumors of the Nervous System*. 7th ed. London: Hodder Arnold, 2006 : 955-969.
- 9) Lamb RF, Roy C, Diefenbach TJ, Vinters HV, Johnson MW, Jay DG, et al. The TSC1 tumour suppressor hamartin regulates cell adhesion through ERM proteins and the GTPase Rho.

- Nat Cell Biol 2000 ; **2** : 281-287.
- 10) Potter CJ, Huang H, Xu T. *Drosophila Tsc1* functions with *Tsc2* to antagonize insulin signaling in regulating cell growth, cell proliferation, and organ size. Cell 2001 ; **105** : 357-368.
 - 11) Qian X, Davis AA, Goderie SK, Temple S. FGF2 concentration regulates the generation of neurons and glia from multipotent cortical stem cells. Neuron 1997 ; **18** : 81-93.
 - 12) Dono R, Texido G, Dussel R, Ehmke H, Zeller R. Impaired cerebral cortex development and blood pressure regulation in FGF-2-deficient mice. EMBO J 1998 ; **17** : 4213-4225.
 - 13) Ortega S, Ittmann M, Tsang SH, Ehrlich M, Basilico C. Neuronal defects and delayed wound healing in mice lacking fibroblast growth factor 2. Proc Natl Acad Sci USA 1998 ; **95** : 5672-5677.
 - 14) Li AJ, Suzuki S, Suzuki M, Mizukoshi E, Imamura T. Fibroblast growth factor-2 increases functional excitatory synapses on hippocampal neurons. Eur J Neurosci 2002 ; **16** : 1313-1324.
 - 15) Cepeda C, André VM, Levine MS, Salamon N, Miyata H, Vinters HV, et al. Epileptogenesis in pediatric cortical dysplasia: the dysmature cerebral developmental hypothesis. Epilepsy Behav 2006 ; **9** : 219-235.
 - 16) Chugani DC, Chugani HT, Muzik O, Shah JR, Shah AK, Canady A, et al. Imaging epileptogenic tubers in children with tuberous sclerosis complex using α -[^{11}C]-methyl-L-tryptophan positron emission tomography. Ann Neurol 1998 ; **44** : 858-866.
 - 17) Fedi M, Reutens D, Okazawa H, Andermann F, Boling W, Dubeau F, et al. Localizing value of α -methyl-L-tryptophan PET in intractable epilepsy of neocortical origin. Neurology 2001 ; **57** : 1629-1636.
 - 18) Trottier S, Evrard B, Vignal JP, Scarabin JM, Chauvel P. The serotonergic innervation of the cerebral cortex in man and its changes in focal cortical dysplasia. Epilepsy Res 1996 ; **25** : 79-106.
 - 19) Johnson MW, Miyata H, Vinters HV. Ezrin and moesin expression within the developing human cerebrum and tuberous sclerosis-associated cortical tubers. Acta Neuropathol 2002 ; **104** : 188-196.
 - 20) Miyata H, Chiang ACY, Vinters HV. Insulin signaling pathways in cortical dysplasia and TSC-tubers: Tissue microarray analysis. Ann Neurol 2004 ; **56** : 510-519.
 - 21) 宮田 元, Harry V. Vinters, 柿田明美, 大浜栄作. 大脳皮質形成異常におけるトリプトファン代謝とてんかん原性との関連: キヌレニン経路関連物質の発現に関する組織マイクロアレイ免疫組織化学的検討. てんかん治療研究振興財団研究年報 2007 ; **18** : 37-42.
 - 22) Sugiura C, Miyata H, Ueda M, Ohama E, Vinters HV, Ohno K. Immunohistochemical expression of fibroblast growth factor (FGF)-2 in epilepsy-associated malformations of cortical development (MCDs). Neuropathology 2008 ; **28** : 372-381.
 - 23) Ueda M, Sugiura C, Ohno K, Kakita A, Hori A, Ohama E, et al. Immunohistochemical expression of fibroblast growth factor-2 in developing human cerebrum and epilepsy-associated malformations of cortical development. Neuropathology 2011 ; **31** : 589-598.
 - 24) 宮田 元. てんかん原性大脳皮質形成異常の外科病理と病理学的研究手法. 秋田県医師会雑誌 2011 ; **61** : 22-33.
 - 25) Mischel PS, Nguyen LP, Vinters HV. Cerebral cortical dysplasia associated with pediatric epilepsy. Review of neuropathologic features and proposal for a grading system. J Neuropathol Exp Neurol 1995 ; **54** : 137-153.
 - 26) Palmini A, Najm I, Avanzini G, Babb T, Guerrini R, Foldvary-Schaefer N, et al. Terminology and classification of the cortical dysplasias. Neurology 2004 ; **62** (Suppl 3) : S2-S8.
 - 27) Johnson MW, Emelin JK, Park SH, Vinters HV. Co-localization of TSC1 and TSC2 gene

products in tubers of patients with tuberous sclerosis. *Brain Pathol* 1999 ; **9** : 45-54.

non-neoplastic disease of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002 ; **61** : 653-662.

28) Goldstine J, Seligson DB, Beizai P, Miyata H, Vinters HV. Tissue microarrays in the study of

Summary

Unraveling the pathology and pathogenesis of epilepsy-associated malformations of cortical development: immunohistochemical comparative studies on cortical tuber of tuberous sclerosis complex and FCD type IIb

Hajime Miyata

To elucidate the pathology and pathogenesis of epilepsy-associated malformations of cortical development, immunohistochemical comparative studies were performed on corticectomy specimens from patients with intractable epilepsy including cortical tuber of tuberous sclerosis complex (TSC-tuber) and focal cortical dysplasia (FCD) type II, along with developing human cerebral mantles obtained from autopsy cases of fetuses, stillborn infants and children. These studies showed 1) developmentally-regulated expressions of ERM protein (ezrin) and FGF-2, in glioneuronal progenitor and astrocytic lineage, 2) upregulation and co-localization of TSC gene products (hamartin and tuberin) and ERM proteins (ezrin and moesin) in abnormal neuroglial cells in TSC-tuber and FCD type IIb, 3) FGF-2 upregulation in TSC-tuber and FCD type IIb but not FCD type IIa, 4) distinct expression pattern of insulin signaling pathways between TSC-tuber and FCD type II, and 3) frequent upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase in TSC-tuber but rare in FCD type IIb, and accumulation of quinolinic acid, a tryptophan metabolite produced by kynurenine pathway, in reactive astrocytes and balloon cells in FCD type IIb. These results suggest the similarities in the morphogenesis and differentiation of abnormal neuroglial cells, and difference in the mechanism of insulin signaling pathway activation and epileptogenicity between TSC-tuber and FCD type IIb.

Ann.Rep.Jpn.Epi.Res.Found. 2015 ; 26 : 15-22

