

20123/086A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）

難治頻回部分発作重積型急性脳炎の病態解明のための包括的研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐久間 啓

平成25（2013）年 5月

## 目 次

### I. 総括研究報告

難治頻回部分発作重積型急性脳炎の病態解明のための包括的研究 佐久間啓	-----	1
---------------------------------------	-------	---

### II. 分担研究報告

1. 急性脳炎・脳症の髄液バイオマーカー解析 田沼直之	-----	6
2. 難治頻回部分発作重積型急性脳炎におけるネオプテリンの解析 九鬼一郎	-----	9

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	13
---------------------	-------	----

難治頻回部分発作重積型急性脳炎の病態解明のための包括的研究

研究代表者 佐久間 啓（公益財団法人東京都医学総合研究所  
脳発達・神経再生研究分野 主席研究員）

研究要旨

我々は難治頻回部分発作重積型急性脳炎（以下 AERRPS）の臨床的特徴を明らかにし、その診断基準を作成してきたが、本研究では本疾患の病態を明らかにすることを目的として、血清・髄液等のサンプルを用いて免疫学的な観点からバイオマーカーの検索を行った。一部の症例で抗神経抗体の存在が同定され、これらは疾患発症の直接的な原因ではないにせよ AERRPS の発症に免疫学的異常が関与することを示す証拠と考えられた。また髄液中の一部の炎症性サイトカインが対象と比較して高値を示し、AERRPS において中枢神経系の炎症が存在することが明らかとなった。これらの知見は中枢神経系の免疫学的異常が、AERRPS というけいれんを主徴とする病態における重要な治療標的となることを示唆している。

研究分担者

氏名	所属機関名	職名
田沼 直之	東京都立府中療育センター	医長
九鬼 一郎	大阪市立総合医療センター	医長

A. 研究目的

難治頻回部分発作重積型急性脳炎 (AERRPS) は、主に学齢期の小児に見られる原因不明の脳炎である。極めて難治かつ頻回の部分けいれんが数ヶ月にわたって持続し、長期間のバルビタール麻酔によるけいれん抑制を要する。難治てんかん・知的障害を残し予後は不良である。我々は 2001 年に両者を包括した概念として AERRPS を提唱し、最近は国際的にも認知されつつある。

従来本疾患に関する報告は我が国と台湾に限られていたが、最近になってヨーロッパ諸国より AERRPS に類似した病態が febrile

infection-related epilepsy syndrome (FIRES) という名称で相次いで報告されている。FIRES と AERRPS が真に同一の疾患であるかどうかは不明であり、両者の比較検討を通じて疾患概念を国際的に統一する必要がある。

AERRPS の原因は全く不明であり、てんかんであるのか脳炎であるのかという基本的な疑問すら解決されていない。このことが有効な治療法開発の妨げとなっているのは自明であり、病態解明が急務である。抗 VGKC 複合体抗体をはじめとする抗神経抗体の関与を示唆する報告があるが、多数例での検討は行われていない。本疾患の動物モデルは知られていないことから、その病態を解明するためには症例をベースとした臨床志向型研究が必須である。本疾患は比較的稀な疾患であり、検討に十分なサンプルサイズを確保するためには全国規模の大規模臨床研究を実施する必要がある。

そこで本研究は AERRPS の症例を前方視

的に全国から集積し、血清・髄液等のサンプルを用いて主に免疫学的な観点からバイオマーカーの検索を行い、本疾患の病態を明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

以下の疾患に罹患し本研究への参加に同意が得られた患者を対象とした。

A) AERRPS：診断基準を満たす症例

B) AERRPS 類縁疾患：抗 NMDA レセプター脳炎、自己免疫性辺縁系脳炎、嗜眠性脳炎、高次脳機能障害を伴う亜急性脳症

研究は前方視的に行った。研究期間中に上記 A) B) に該当する対象患者が発生した場合は、診療した医師が研究代表者に連絡し、同時に患者に本研究への参加の意思を確認し、同意を取得した。同意が得られた場合、研究代表者は臨床情報調査のためのアンケートを診療医師に送付した。なお臨床症状や治療内容は診療医師がカルテ等の記録を元に調べて記載した。

血清・髄液のバイオマーカー測定に同意が得られた場合には、診療機関で検体を採取した後に匿名化して送付された。

2010年4月から2013年1月までに14例のAERRPS症例が登録された。このうち基礎疾患として白血病を合併した1例を除外した。残る13例のうち、11例で急性期の血清及び髄液が検索可能であり、今回はこれらの11例を対象とした。また非炎症性のてんかん患者24例（うち11例で髄液が検索可能）およびAERRPS以外の炎症性神経疾患11例（前例で髄液が検索可能）を対照とした。

抗神経抗体は免疫組織化学法および免疫細胞化学法により検討した。ラット脳凍結切片に固定・内因性ペルオキシダーゼ不活化処理を施した後、血清(1:500)ならびに脳脊髄液(1:10)と反応させた。続いてビオチン化抗ヒトIgG, Streptavidin-HRP（いずれも Jackson

Immunoresearch）と順次反応させた後にDAB（Vector Lab）で発色した。抗NMDA受容体抗体、抗LGI1抗体、抗GABA-B受容体抗体の測定にはEuroimmun社製キットを使用し、Alexa Fluor488標識抗ヒトIgG（Jackson Immunoresearch）を二次抗体として用いた。

血清および髄液中のサイトカインの測定はcytometric bead array法（BD Biosciences）により行った。炎症性サイトカインとしてIFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12p70, TNF $\alpha$ の6種類を測定した。血清及び髄液50 $\mu$ Lを各サイトカイン特異的抗体結合ビーズと反応させた後、PE標識二次抗体と反応させ、フローサイトメーターで蛍光強度を解析した。

統計学的解析はMann-Whitney検定, Student t検定を用い、P<0.05をもって有意とした。解析はStatCel4ソフトウェアにより行った。

本研究の広報のため、研究内容と実施方法が日本小児神経学会学会の機関誌「脳と発達」ならびにウェブサイトに掲載された。また本研究の一般公開ホームページ（<http://square.umin.ac.jp/AERRPS/>）を作成し活用した。

（倫理面への配慮）

本研究は国立精神・神経医療研究センター倫理委員会に疫学研究として審査を申請し承認を得た（「難治頻回部分発作重積型急性脳炎の診断基準作成のための疫学研究」、承認番号：21-9-事2，平成22年1月22日承認）。さらに東京都医学総合研究所倫理審査を受審し承認を得た（「小児神経疾患における免疫系の異常に関する研究」、承認番号12-34，平成24年8月6日承認）。また本研究は多施設共同臨床研究として日本小児神経学会共同研究支援委員会による支援を受けた（No.10-01）。

## C. 研究結果

先行研究「難治頻回部分発作重積型急性脳炎の診断基準作成のための疫学研究」を含め、

研究期間中に集まった症例は34例で、内訳はAERRPS14例、自己免疫性辺縁系脳炎6例、抗NMDA受容体脳炎4例、その他の自己免疫性脳炎10例であった。

AERRPS症例13例のうち12例が男児で、年齢は3～15歳（中央値5歳）であった。11例で先行感染を認め、マイコプラズマ感染症・咽頭炎が各1例で証明された以外は発熱の原因は不明であった。先行感染後2～6日で神経症状を発症した。けいれんの発作型は眼球偏位（9例）、顔面間代（7例）、無呼吸（7例）、片側間代（5例）が多く認められた。二次性全般化発作は3例で認められた。けいれん以外の神経症状として精神症状（3例）、口部ジスキネジア（3例）が認められた。脳波所見ではてんかん性放電（9例）、全般性高振幅徐波（5例）、周期性放電（2例）が認められた。MRI上異常信号を認めた部位として大脳基底核（4例）、大脳皮質（3例）、海馬（2例）、視床（2例）などがあった。髄液では検索された11例全てで細胞数増加（ $5/\mu\text{L}$ 以上）を認めたが、ほとんどの例でその程度は軽度であった。治療として多く行われたのはバルビタール酸によるburst-suppression coma（10例）、副腎皮質ステロイド（12例）、ガンマグロブリン静注療法（9例）などであった。

AERRPS14例のうち、11例の血清と髄液が集積され、免疫学的解析に用いられた。ラット脳を用いた免疫組織化学法では、11例中2例の血清で神経細胞が陽性に染色され、抗神経抗体の存在が示唆された。うち1例では免疫細胞化学法により自己抗体は抗NMDA受容体抗体であることが確認された。残る1例では既知の抗神経抗体はいずれも陰性であり、未知の抗神経抗体であると考えられた。なおAERRPS以外のでんかんでは抗神経抗体は検出されなかった。

血清・髄液中サイトカイン解析では、血清ではいずれの測定項目においても三群間に有

意差を認めなかった。髄液ではIL-6がてんかん群<炎症性神経疾患群<AERRPS群の傾向を示し、てんかん群とAERRPS群との間に有意差を認めた（ $P<0.05$ ）。IFN $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-10、IL-12p70、TNF $\alpha$ に関しては三群間で差を認めなかった。

#### D. 考察

AERRPS症例の血清において神経細胞に対する自己抗体が比較的高頻度に認められた。標的抗原は単一ではなく、これらの自己抗体が疾患の発症の直接的な原因ではないと考えられるが、AERRPSの発症に免疫学的異常が関与することを示す証拠と解釈できる。また髄液中IL-6が高値を示したことも、中枢神経系の炎症の存在を示唆し、本疾患の病態を考える上で重要な所見である。

本研究を通じてAERRPS症例の登録から臨床情報の収集、炎症メディエーターや抗神経抗体の解析から基礎研究まで系統的に行う体制が確立されたと考えている。臨床サイドからは症例や検体を提供し、基礎研究サイドからは検査データや病態に関する新たな知見を提供するという、互いにメリットとなる関係が築かれたことは、今後の本疾患への取り組みにおいて大きなプラスとなることは疑いない。今後は小児神経学に限らず、成人神経学の領域にもネットワークを広げていきたい。

AERRPSの症例を集積し、その臨床像を明らかにすることについては、目標に近い数の症例を集めることができ、目的はほぼ達成されたと考えた。抗神経抗体やサイトカインの解析を通じて、本疾患の病態に炎症機転が関与する証拠を得たことは重要な進歩である。

ただしバイオマーカーの解析サンプル数はエビデンスレベルの高いデータを得るには十分な数とは言えなかった。AERRPSのように極めて希少な疾患においては短期間の研究で得られる成果には限度があり、継続的な研究

の重要性を再認識させられた。また登録された症例の中にも検体が保存されていなかったケースが数多くあり、バイオマーカー解析に対する臨床サイドの認識を高める必要があることがわかった。今回の研究では疾患の真の原因を同定するには至らず、治療法の開発も今後の課題として残った。

今後は髄液中の IL-6 がどのような機序で産生されているかを明らかにする必要があり、このためには炎症性メディエーターの解析項目をさらに増やして病態への関与が最も深いと考えられる因子を明らかにしなければならない。一部の症例で検出された抗神経抗体の意義についても検討する必要がある。

中枢神経系の炎症を治療のターゲットと考え、これに対する有効な抑制方法を確立することは、本研究の成果を臨床現場に還元するという意味で重要である。AERRPS の病態に中枢神経系の炎症が関与することが示唆されたことは、本疾患の治療戦略に少なからぬ影響を与えた。近年 AERRPS に対する治療として、けいれんの抑制に加えて早期から積極的な免疫療法が行われる事例が少しずつ増加している。これが予後の改善につながるかどうかは今後の研究成果を待たなければわからないが、多くの臨床医が指摘している通り AERRPS の予後は徐々に改善していると推定される。さらに髄液中 IL-6 の高値は AERRPS 診断根拠の一つとなる可能性があり、カットオフレベルなどを検討して本項目を診断基準に含めることも検討したい。さらに治療前後のサイトカインの動態や、免疫調整療法の有無による長期予後の違い等について、引き続き臨床的な検討を行っていきたい。

#### E. 結論

AERRPS において中枢神経系の炎症が存在することが明らかとなった。これらの知見は中枢神経系の免疫学的異常が、AERRPS とい

うけいれんを主徴とする病態における重要な治療標的となることを示唆している。

#### F. 健康危険情報

特記すべき事項なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 佐久間啓. 抗 NMDA 受容体脳炎. 小児科学レクチャー. 2012;2:872-7.
- 2) 松岡貴子, 佐久間啓. 神経疾患と免疫. 小児内科 2012;44:1416-20.
- 3) 佐久間啓. 難治頻回部分発作重積型急性脳炎をめぐる最近の話題. 脳と発達. 2013;45:110-4.

##### 2. 学会発表

- 1) 佐久間啓. シンポジウム「自己免疫性脳炎 Up-to-date」: 難治頻回部分発作重積型急性脳炎. 第 54 回日本小児神経学会総会. 2012.5.18. 札幌
- 2) Sakuma H. Symposium “Encephalitis” Acute encephalitis with refractory, repetitive partial seizures (AERRPS) and limbic encephalitis in Japan. 12<sup>th</sup> International Child Neurology Congress and 11<sup>th</sup> Asian and Oceanian Congress of Child Neurology. 2012.5.28. Brisbane, Australia.
- 3) 佐久間啓. NMDA シンポジウム: 難治頻回部分発作重積型急性脳炎: 抗 NMDA 受容体脳炎との鑑別を中心に. 第 24 回日本神経免疫学会学術集会. 2012.9.21. 軽井沢.
- 4) 佐久間啓. シンポジウム「自己免疫性脳炎とてんかん」: Limbic encephalitis in children and its association with epilepsy. 第 46 回日本てんかん学会. 2012.10.12. 東京.

##### 3. その他の発表

- 1) 佐久間啓. 難治頻回部分発作重積型急性脳炎. 第2回西三河 pediatric neurologist meeting. 2012.7.4. 知立.
- 2) 佐久間啓. ウイルス関連急性脳症. 第2回茨城小児神経懇話会. 2013.1.27.

H. 知的財産権の出願・登録情報

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

研究課題「難治頻回部分発作重積型急性脳炎の病態解明のための包括的研究」

急性脳炎・脳症のバイオマーカー解析

研究要旨

急性脳症とは、「急性発症の意識障害を主徴とする症候群」の総称であり、てんかんや熱性けいれんとの鑑別が困難なことも多い。急性脳症の予後は熱性けいれん重積に比べて悪く、治療開始が遅れば死亡あるいは重篤な神経学的後遺症を呈するため、早期診断、早期治療は重要である。本研究は難治頻回部分発作重積型急性脳炎の病態解明のために有用なバイオマーカーの開発を目的とし、今年度は自己免疫が関与する脳炎・脳症にも対象を広げ解析を行った。

研究分担者 田沼直之（都立府中療育センター・小児科医長）

A. 研究目的

急性脳炎・脳症は、急激な経過で意識障害、けいれんなどの中枢神経症状が出現し、重篤な神経学的後遺症を呈することも多い疾患群である。近年、急性壊死性脳症（acute necrotizing encephalopathy, ANE）(1995)、けいれん重積型急性脳症(2000)ないし二相性けいれんと遅発性拡散能低下を呈する急性脳症（acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion, AESD）(2006)、難治頻回部分発作重積型急性脳炎（acute encephalitis with refractory, repetitive partial seizures, AERRPS）(2001)、可逆性脳梁膨大部病変を有する軽症脳炎・脳症（clinically mild encephalitis/encephalopathy with a reversal splenial lesion, MERS）(2004)などの新しい疾患概念がわが国の小児神経科医から記載・確立され、急性脳症の病態解析も進歩しつつある。

本研究は、AERRPSの病態解明のために有用なバイオマーカーの開発を目的とし、昨年度に引き続き急性脳症の病態解析、治療効果判定、予後予測などに応用可能なバイオマーカーについて解析を行うとともに、今年度は自己免疫関連重積型急性脳炎についての解析も行った。

B. 研究方法

(1) 生体試料を用いたバイオマーカー測定

急性脳炎・脳症の患者から脳脊髄液（髄液）、血清、尿などの生体試料を採取し、各種バイオマーカーの測定を行った。DNA に対する 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)、脂質の過酸化マーカー Hexanoyl lysine adduct (HEL) の 2 種類の酸化ストレスマーカー濃度を、日本老化学研究所社製 ELISA キット（血清・髄液 8-OHdG 測定では高感度キット）と Bio-Rad 社製モデル 680 マイクロプレートリーダーを用いて測定した。

尿検体では同時にクレアチニンを測定し酸化ストレスマーカー濃度をクレアチニン濃度で除した値を測定値とした。また、血清・髄液検体での 8-OHdG・HEL の測定では、あらかじめミリポア社製マイクロコンチューブによる透析処理を行った。さらに酸化ストレスとサイトカイン動態との関係を検討するため、サスペンションビーズアレイテクノロジーの応用により、微量試料（約 50 $\mu$ l）で Bio-Rad 社製 Bio-Plex 200 システムを用いて多種類サイトカイン・ケモカイン（Bio-Rad 社製 8-Plex A panel：IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ）を同時定量した。さらに軸索障害マーカーとして total tau protein の測定を Invitrogen 社製 ELISA キットにて行った。

(2) 自己免疫関連重積型急性脳炎の抗神経抗体のスクリーニング

対象は、大脳皮質・基底核に限局性の神経画像異常（MRI、SPECT、FDG-PET）とそれに対応した言語障害などの高次脳機能障害やジストニアなどの不随意運動がみられ、既存の抗神経抗体（抗 GluR 抗体など）の存在が否定された急性脳炎症例。ガンマグロブリン大量療法前後などの患者血清を用いて、対照脳組織での免疫組織化学染色（二次抗体は抗ヒト IgG、IgM 抗体）を行い、ヒト脳組織と結合する抗神経抗体を同定した。

（倫理面への配慮）

本研究は府中療育センターと協力医療機関の倫理委員会から承認され実施した。生体試料の収集にあたっては十分な説明の上での書面による同意を患者家族から受けた。

C. 研究結果

(1) Hemiconvulsion-hemiplegia-epilepsy (HHE) 症候群様のけいれん重積症状を繰り返した限局性脳症の一例

症例は 9 歳男児。生後 3 カ月時に West 症候群を発症し ACTH 療法を行ったが、難治性てんかんに移行し 2 歳時に脳梁離断術を実施された。6



歳時に水痘に罹患後、左半身優位のけいれん重積あり。頭部 MRI/T2 強調画像にて右頭頂側頭部の皮質下白質に高信号域を認め、髄液バイオマーカー解析にて 8-OHdG と tau protein の上昇を認めた。gabapentin によりけいれんは徐々におさまったが、右大脳半球の萎縮を残した。このエピソードの 1 年 3 カ月後に再び左半身けいれんと麻痺が出現、さらに 3 カ月後には右半身けいれんが出現した。3 回目のエピソード時の頭部 MRI/T2 強調画像にて左側頭後頭部に高信号域を認め、髄液 total tau protein と IL-6 の上昇を認めた。2 回目のエピソード時の患者血清を用いた抗神経抗体のスクリーニングでは側頭後頭葉の大脳皮質ニューロンに陽性所見を認め、寛解期の血清ではこの所見は消失した。以上のことから、本症例の発症に自己免疫機序が関与している可能性が示唆された。

(2) SPECT で hyperperfusion を呈した急性辺縁系脳炎の一例

症例は 11 歳男児。発熱、嘔吐から意識障害をきたし、髄液細胞数と蛋白の増多、脳波上後頭部優位高振幅徐波を認め、急性脳炎と診断され、メチルプレドニゾロンパルス療法が開始された。頭部 MRI では異常を認めなかったが、第 8 病日に行った SPECT にて両側前頭葉、側頭葉内側部、基底核に hyperperfusion を認めた。患者血清を用いた抗神経抗体のスクリーニングではパルス療法前、治療後 2 カ月のいずれも陰性であった。髄液サイトカインは IL-4 と TNF- $\alpha$  が上昇していた。以上の所見から、急性脳炎の診断に SPECT が有用であること、本症例の発症には自己免疫機序より自然免疫機序が関与していることが考えられた。

(3) A 群  $\beta$  溶連菌感染に関連した自己免疫性神経障害における抗神経抗体の解析

A 群  $\beta$  溶連菌感染に関連した自己免疫性神経障害として、急性散在性脳脊髄炎 (ADEM)、Pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococci (PANDAS)、亜急性脳炎の症例を各一例ずつ解析した。ADEM は 10 歳女児で、発熱、意識障害で発症し頭部 MRI で両側基底核に信号異常を認めた。髄液バイオマーカー解析では急性期に tau protein と IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$  が上昇し、寛解期に減少した。患者血清を用いた解析では急性期に淡蒼球ニューロンに陽性を示したが、回復期には染色性が消失した。PANDAS 症例は 7 歳女児で、溶連菌感染後 6 日に行動異常で発症、頭部 MRI は異常なし。髄液バイオマーカー解析では急性期に IL-10 と TNF- $\alpha$  が上昇、患者血清を用いた抗神経抗体スクリーニングでは急性期に淡蒼球ニューロンに染色性を示した。亜急性脳炎は 9 歳女児で、異常興奮と行動異常にて発症し錐体外路症状もみられた。ASO、ASK の上昇あり、溶連菌感染関連亜急性脳炎が疑われ

IVIG 治療を行った。治療後症状は消失したが、失声症、幻視、反響言語が出現し、IVIG 治療無効にて、メチルプレドニゾロンパルス療法にて症状が次第に改善した。髄液サイトカインは急性期、回復期とも正常、患者血清を用いた脳組織染色では急性期に側頭葉ニューロンに陽性、回復期は染色性が消失した。以上の結果、患者血清を用いた免疫染色は溶連菌感染後の自己免疫性神経障害における抗神経抗体のスクリーニングに有用であることが示唆された。

#### D. 考察

急性脳炎・脳症の発症にはウイルス感染などの自然免疫が関与するほか、自己免疫機序が関与する場合がある。近年抗 NMDA 受容体抗体による自己免疫性脳炎が注目されているが、それ以外の抗神経抗体の関与も示唆されている。特に限局性脳炎の場合には、SPECT、MRI などの画像所見と合わせて、患者血清を用いた免疫染色で急性期に特異染色が得られ、回復期に染色性が消失すれば抗神経抗体が病態に関与している可能性があり、診断的に有用と考えられる。さらに生体試料を用いたバイオマーカー解析と組み合わせることにより、脳炎・脳症の発症機序を多角的に分析することが可能であった。

#### E. 結論

急性脳炎・脳症発症の機序として、抗神経抗体をはじめとする自己免疫機序が関与している場合がある。患者血清を用いた脳組織免疫染色は抗神経抗体スクリーニングに有用であった。今後さらに症例数を重ね、解析を続けることにより、一層の病態解明が期待される。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 田沼直之. 小児急性脳症とバイオマーカー. 日本臨牀 70: 887-892, 2012.
- 2) 田沼直之. 神経疾患とバイオマーカー. 小児内科 44: 1421-1424, 2012.
- 3) 田沼直之, 林雅晴. エダラボン. 小児内科 45: 253-256, 2013.
- 4) Miyata R, Tanuma N, Hayashi M, et al. Oxidative stress in patients with clinically mild encephalitis/encephalopathy with a reversible splenic lesion (MERS). Brain Dev. 34: 124-127, 2012.
- 5) Miyata R, Tanuma N, Hayashi M, et al. Focal encephalopathy with recurrent episodes of epileptic status and cluster mimicking hemiconvulsion-hemiplegia-epilepsy syndrome. Brain Dev. 34: 360-367, 2012.
- 6) Igarashi A, Okumura A, Kitamura Y, Jinbo K,

Akatsuka S, Tanuma N, Shimizu T, Hayashi M. Acute limbic encephalitis with focal hyperperfusion on single photon emission computed tomography. Brain Dev. 35: 181-184, 2013.

## 2. 学会発表

1) Tanuma N, Miyata R, Nakajima K, Okumura A, Kubota M, Hamano S-I, Hayashi M. Oxidative stress in acute encephalopathy associated with HHV-6 and influenza virus infection. The 12th International Child Neurology Congress and the 11th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology. Brisbane, Australia. May 2012.

2) 田沼直之ら. Rett 症候群における尿中メラトニン代謝物測と睡眠覚醒リズム. 第54回日本小児神経学会総会, 札幌(2012.5.18).

3) 田沼直之. 発達障害と酸化ストレス. シンポジウム 2 精神疾患と脳機能病態と薬物応答反応指標 第34回日本生物学的精神医学会, 神戸(2012.9.28).

4) 田沼直之ら. Dentato-olivary-dysplasia と診断された一卵性双胎の男児例. 第46回日本てんかん学会, 東京(2012.10.11).

## H. 知的所有権の出願・取得状況

(予定を含む)

該当するものは無い。

分担研究報告書

難治頻回部分発作重積型急性脳炎におけるネオプテリンの解析

研究分担者 九鬼 一郎(大阪市立総合医療センター 小児科医長)

研究要旨: 難治頻回部分発作重積型急性脳炎 (Acute encephalitis with refractory repetitive partial seizures :以下AERRPS)においてネオプテリン (Neopterin: Ne) 測定の有用性について、他の小児急性中枢神経疾患と比較検討を行った。対象はAERRPS11例、その他急性脳炎6例、急性脳症20例、熱性けいれん6例、正常コントロール6例であった。AERRPSでは、髄液Ne (82.4-1154:ave 423.3)、血清Ne (17.7-97:ave 53.2)、髄液Ne/血清Ne比 (4.0-11.8:ave 8.8)であり、3例で髄液細胞数が正常範囲であった。髄液Ne、髄液Ne/血清Neに関しては、AERRPSでは急性脳症や熱性けいれんと比較して有意に上昇しており ( $p<0.01$ )、小児急性中枢神経疾患を鑑別する際に有用な手段であった。AERRPS1例で経時的に評価でき、髄空内デキサメサゾンにより髄液Neの低下傾向を示し、発作抑制効果を認めた。AERRPSの病態に関しては不明点が多いが、少なくとも急性期には中枢神経系にTh1細胞-単球系細胞の活性化が関与していた。

研究分担者 九鬼 一郎

(大阪市立総合医療センター 小児科医長)

A. 研究目的

小児救急医療現場において、感染を契機とする中枢神経疾患には、熱性けいれんなど予後のよいものから、急性脳炎・脳症など重篤な後遺症を免れないものまで幅が広い。難治頻回部分発作重積型急性脳炎 (Acute encephalitis with refractory repetitive partial seizures :以下AERRPS) は、発熱と反復するけいれんで急性発症し、けいれん抑制にバルビツレートによるSuppression-Burstパターンの維持が必要で、難治な部分てんかんに移行する脳炎である。AERRPSの一部では、急性期に複雑型熱性けいれんや他の脳炎・脳症との鑑別を必要とする場合がある。

一方でネオプテリン (Neopterin: Ne) は、活性化T細胞からのINF- $\gamma$ の刺激で産生され単球系細胞の活性化の指標とされている。NeはGTPからテトラヒドロピオプテリンの生合成系の中間生成物であり、ウイルス等の感染により、活性化T細胞からのINF- $\gamma$ の刺激で、マクロファージ、樹状細胞、または中枢神経においてはミクログリアで産生される。今回、AERRPS症例において髄液Ne、血清Ne測定の有用性について、他の小児急性

中枢神経疾患と比較検討を行った。

B. 研究方法

対象は2000~2012年までに、当院でAERRPSと診断し、Ne測定を実施した症例。診断は、佐久間らの提唱した診断基準 (Sakuma 2009) をもとに、急性期は脳炎所見とバルビタール療法を必要とする頻回部分発作の存在、急性期以降の難治性てんかんへの移行などの臨床症状から行った。対象期間中にNeを測定できたAERRPS以外の小児急性中枢神経疾患は、急性脳炎として抗NMDA受容体抗体脳炎 (NMDARE)、急性脱髄性脳脊髄炎 (ADEM)、急性脳症として出血性ショック脳症 (HSES)、けいれん重積型急性脳症 (AEFCSE)、その他複雑型熱性けいれん (FS)、正常対象 (NC:頭痛など) であった。測定は高速液体クロマトグラフィーを用いて、急性期の髄液および血清検体を使用した。髄液Ne、血清Ne、髄液/血清Ne値を測定し、各病型において比較検討を行い、複数回測定できた症例では経時的に評価した。2群間の比較には、Mann-Whitney検定を用いた。(血清Ne・髄液Ne 正常値:20nmol/L以下)

(倫理面への配慮) Ne測定をはじめ各種検査実施に関しては、患者もしくは患者家族にインフォームドコンセントを得た。

C. 研究結果

該当症例はAERRPS 11例(男女9:2)、その他の中枢神経疾患は、急性脳炎が6例(NMDARE 2例、ADEM 4例)、急性脳症20例(HSES 7例、AEFCSE 13例)、その他としてFS 6例、NC 6例であった。

AERRPSにおいて各測定結果を示す(図1-3)。髄液Ne (82.4-1154 : ave 423.3)、血清Ne (17.7-97 : ave 53.2)、髄液Ne/血清Ne比(4.0-11.8 : ave 8.8)。髄液細胞数(0-256 : ave 16)、髄液細胞数が正常範囲であった症例は3例。経時的に測定できた症例は1例であった。Neの推移(髄液Ne・血清Ne)は、259.8・60.9(第1病日)、1034.2・270.2(第7病日)、436.1・138.5(第20病日)、179.9・250.7(第27病日)、181.8・326.8(第29病日)、151.5・244.1(第31病日)、134.2・267.1(第34病日)。治療経過はステロイドパルス療法3クール、大量ガンマグロブリン療法2回を第1病日から第18病日までに行い、髄腔内デキサメサゾン(2.6mg-4mg/回)を第20、27、29、31、34病日に実施したが、重度の後遺症を残した。

AERRPS以外の各疾患について髄液Ne(図1)、血清Ne(図2)、髄液Ne/血清Ne比(図3)を示す。NMDARE (173.3-348.1、20.1-28.9、13-20)、ADEM (44.7-459.8、5.9-54.6、3.2-21.9)、HSES (25.9-158、14.3-568.6、0.11-3.5)、AEFCSE (20.8-193.8、18.2-142.8、0.6-9.9)、FS (16-25.4、14.9-39.7、0.49-1.38)、NC (14-20.3、10.1-20.8、0.61-1.67)。

髄液Neに関しては、AERRPSとその他脳炎では有意差を認めなかったが、AEFCSE ( $p < 0.01$ )、HSES ( $p < 0.001$ )、FS ( $p < 0.01$ )、NC ( $p < 0.01$ )とは有意差を認めた。血清Neについては、AERRPSではNC ( $p < 0.01$ )と比較し有意に上昇していたが、それ以外とは有意差を認めなかった。髄液Ne/血清Ne比は、AERRPSとその他脳炎では有意差を認めなかったが、AEFCSE ( $p < 0.01$ )、HSES ( $p < 0.01$ )、FS ( $p < 0.01$ )、NC ( $p < 0.01$ )と比較し有意に高値を示した。

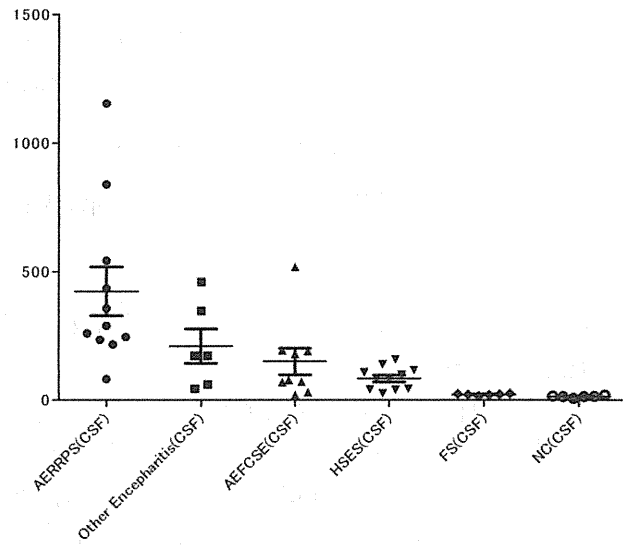


図1 髄液Neの測定値(単位: nmol/L)

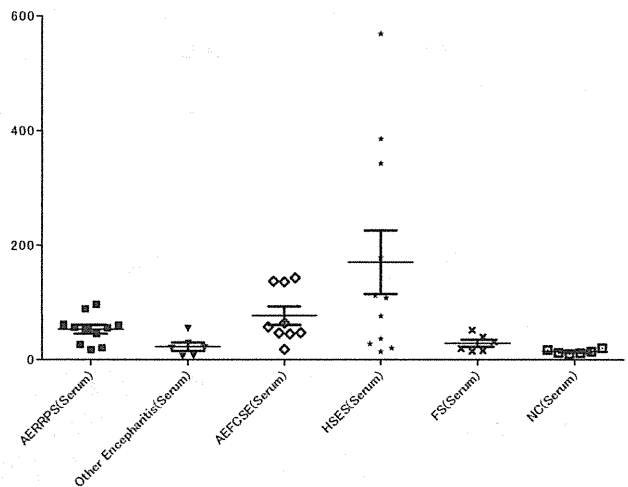


図2 血清Neの測定値(単位: nmol/L)

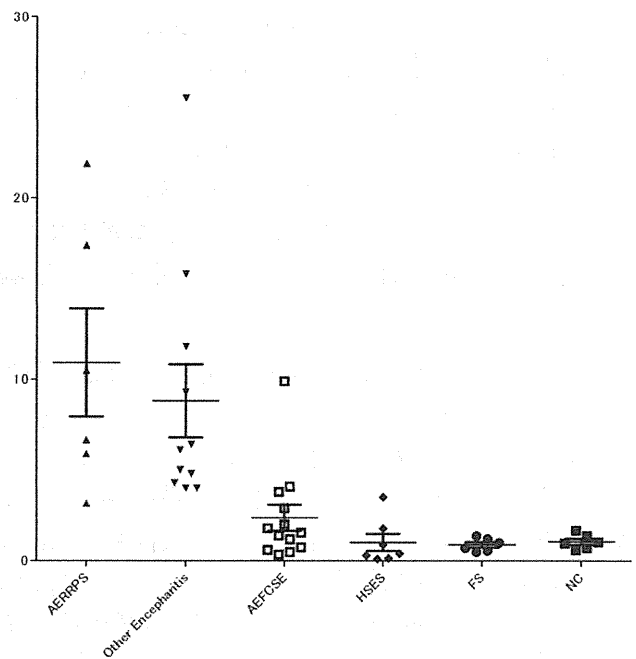


図3 髄液Ne/血清Ne比

## D. 考察

髄液Neが上昇する小児中枢神経疾患には、ヘルペス脳炎などの中枢神経感染症が有名であるが、その他免疫介在性脳炎(急性散在性脳脊髄炎やNMDAREなど)や神経代謝疾患で上昇するとの報告がある。またインフルエンザやHHV6感染に起因する急性脳症では、髄液および血清ともNeの上昇が認められる。Neの特徴として、血液脳関門の透過性が低く、半減期が短いことが挙げられ、中枢神経疾患のバイオマーカーとして注目されているが、Neに関する報告数は少ない。

急性期の髄液検査は治療方針を決定づける重要な検査である。しかし急性脳炎のうち髄液細胞増多を示すのは約65%とも言われている。今回検討したAERRPS症例では、初回髄液検査において3例(27%)で細胞増多を認めなかったが、その全例で髄液Neの上昇を確認できた。経時的に測定できた症例は重度後遺症を残したが、急性期治療として実施した経静脈的なステロイドパルス療法や大量ガンマグロブリン療法では、髄腔内Neの上昇は抑えきれなかった。本例では、バルビタール療法による敗血症のため、経静脈的なステロイド治療の実施が困難であった。そのため中枢神経系に選択的に作用させるため、デキサメサゾン髄腔内投与しところ、髄液Neが低下し、バルビタール療法中止にも関わらず頻回の発作が抑制傾向を示した。今後、重篤な後遺症が予想される場合には、早い時点で髄腔内投与をするのも治療選択肢の一つと考えられた。

AERRPSとその他の脳炎に関しては、髄液Ne、血清Ne、髄液Ne/血清Neに明らかな有意差は認められなかった。また症例数が少ないため、ADEMやNMDAREなどとの具体的な病型比較は困難であった。しかし髄液Ne、髄液Ne/血清Ne比を用いると、急性脳症および複雑型熱性けいれんとの鑑別をする際に有用であった。これにより早期から病態に応じた治療ができ、経時的に評価することで病勢に応じた治療が可能となると思われた。

## E. 結論

AERRPSの病態に関しては、少なくとも急性期

には中枢神経系にTh1細胞-単球系細胞の活性化が関与していた。重症例では、高容量のバルビタールを必要とするため全身状態が低下しており、病初期から中枢神経系により選択的な抗炎症治療を強化する必要があると思われた。Ne測定は、AERRPSを含めた小児急性中枢神経疾患を鑑別する際に、有用な手段であった。

## F. 健康危険情報

省略(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

1) 急性脳炎・脳症におけるネオプテリン測定の臨床的有用性 堀野 朝子、塩見 正司、長谷川 結子、服部 妙香、井上 岳司、温井 めぐみ、九鬼 一郎、岡崎 伸、川脇 壽 大阪市立総合医療センター 小児神経内科、感染症センター 第44回日本小児感染症学会 2012/11/24 岡山

2) ネオプテリンからみた急性脳炎・脳症の鑑別に関する検討 堀野 朝子、塩見 正司、井上 岳司、温井 めぐみ、九鬼 一郎、岡崎 伸、川脇 壽 大阪市立総合医療センター 小児神経内科、感染症センター 第55回日本小児神経学会 2013/5/31 大分

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

### 1. 特許取得 なし

### 2. 実用新案登録 なし

### 3. その他 なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

なし

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
佐久間啓	抗 NMDA 受容体脳炎	小児科学レクチャー	2	872-877	2012
松岡貴子, 佐久間啓	神経疾患と免疫	小児内科	44	1416-1420	2012
佐久間啓	難治頻回部分発作重積型急性脳炎をめぐる最近の話題	脳と発達	45	110-114	2013
田沼直之	小児急性脳症とバイオマーカー	日本臨牀	70(5)	887-892	2012
田沼直之	神経疾患とバイオマーカー	小児内科	44(9)	1421-1424	2012
田沼直之, 林雅晴	エダラボン	小児内科	45(2)	253-256	2013
Miyata R, Tanuma N, Hayashi M, Imamura T, Takanashi JI, Nagata R, Okumura A, Kashii H, Tomita S, Kumada S, Kubota M.	Oxidative stress in patients with clinically mild encephalitis/encephalopathy with a reversible splenic lesion (MERS).	Brain Dev	34	124-127	2012
Miyata R, Tanuma N, Hayashi M, Takahashi Y.	Focal encephalopathy with recurrent episodes of epileptic status and cluster mimicking hemiconvulsion-hemiplegia-epilepsy syndrome.	Brain Dev	34	360-363	2012

Igarashi A, Okumura A, Kitamura Y, Jinbo K, Akatsuka S, Tanuma N, Shimizu T, Hayashi M.	Acute limbic encephalitis with focal hyperperfusion on single photon emission computed tomography.	Brain Dev	35	181-184	2013
Hachiya Y, Miyata R, Tanuma N, Hongou K, Tanaka K, Shimoda K, Kanda S, Hoshino A, Hanafusa Y, Kumada S, Kurihara E, Hayashi M.	Autoimmune neurological disorders associated with group-A beta-hemolytic streptococcal infection.	Brain Dev		In press	2013



