

201324125A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

炎症を介した発作重積状態を伴う
急性脳症の病態にもとづく治療法開発

平成25年度 研究報告書

研究代表者 水口 雅

平成26(2014)年 3月

目 次

I. 総括研究報告	
炎症を介した発作重積状態を伴う急性脳症の病態にもとづく 治療法開発	
水口 雅	3
II. 分担研究報告	
自己免疫性機序を介する急性脳炎における抗神経抗体の検索	
奥村彰久	15
急性壊死性脳症における遺伝的素因 —HLAタイピング及びサイトカイン多型解析—	
齋藤真木子	21
難治頻回部分発作重積型急性脳炎の免疫学的解析	
佐久間啓	25
神経画像による急性脳症の診断・病態解析に関する研究	
高梨潤一	29
患者iPS細胞を用いたてんかん性脳症の病態研究	
廣瀬伸一	33
安静時機能的MRIによる急性脳症の機能的結合に関する研究	
山内秀雄	39
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	41
IV. 研究成果の刊行物・別刷	51

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

総括研究報告書

炎症を介した発作重積状態を伴う急性脳症の病態にもとづく治療法開発

研究代表者 水口 雅（東京大学大学院医学系研究科 発達医科学 教授）

研究要旨

遅発性拡散低下を呈する急性脳症(AESD)や難治頻回部分発作重積型急性脳炎 (AERRPS) など、炎症を介した発作重積状態を伴う急性脳症 (AEIMSE)の臨床、遺伝、病態を解明するための研究を行った。テオフィリン関連脳症について、全国から症例を集積して臨床的・遺伝学的に検討し、そのほとんどがAESDの臨床像を呈すること、AESDのリスクファクターである遺伝子変異・多型を有することを明らかにした。腸管出血性大腸菌脳症について、2011年のO-111集団感染事例における臨床疫学的研究を行い、頭部CT・MRI所見の特徴を明確にするとともに、メチルプレドニゾロン・パルス療法の有効性を示唆した。

研究分担者

奥村 彰久（順天堂大学医学部准教授）

齋藤 真木子（東京大学大学院医学系研究科 助教）

佐久間 啓（東京都医学総合研究所主席研究員）

高梨 潤一（亀田総合病院部長）

廣瀬 伸一（福岡大学医学部教授）

山内 秀雄（埼玉医科大学医学部教授）

研究協力者

後藤 正英（東京都立小児総合医療センター 医長）

種市 尋宙（富山大学医学部助教）

三牧 正和（東京大学医学部附属病院講師）

A. 研究の目的

炎症を介した発作重積状態を伴う急性脳症（acute encephalopathy with inflammation-mediated status epilepticus, AEIMSE）（Nabbout et al.: Lancet Neurol 2011; 10: 99）は有熱時に発症し、けいれん重積状態の後に意識障害（昏睡）をきたし、後遺症としててんかんや知的障害・運動障害を残す病態の総称である。日本人小児では遅発性拡散低下を呈する急性脳症（acute encephalopathy with biphasic seizures and late diffused diffusion, AESD）と難治頻回部分発作重積型急性脳炎（acute encephalitis with refractory, repetitive partial seizures,

AERRPS) の2つが、AEIMSEの代表的症候群である。AESDは、塩見ら(2000) が提唱した「けいれん重積型急性脳症」とほぼ同義で、高梨ら(2006)により国際的に通用する疾患概念とされた(Takanashi et al.: Neurology 2006; 66: 1304)。急性脳症に関する水口班の全国調査(平成22年度)によると、日本におけるAESDの罹病率は1年あたり100~200人で、急性脳症の症候群中で最も高頻度に見られた(Hoshino et al.: Brain Dev 2012; 34: 337)。これに対しAERRPSは、はじめ福山・栗屋が提唱し、佐久間が再定義・確立した症候群であり(佐久間啓: 脳と発達 2001;33:385)、欧州で後から提唱されたFIRESなる疾患概念とほぼ同義である。水口班調査により1年当たり数人と稀な症候群であることが確認された(Hoshino et al.: Brain Dev 2012; 34: 337)。AESD、AERRPSとも急性期には抗てんかん薬大量静注や脳低体温など、慢性期には抗てんかん薬内服による治療が試みられるが、現状では確立した方法がなく、治療成績も不良で、革新的治療法が待望されている。

平成22~24年度の難治性疾患克服研究で水口班はAESDについて、佐久間班はAERRPSについて、疫学的・遺伝学的研究を行った。その成果として、中枢神経系のイオンチャネル遺伝子*SCN1A*や*SCN2A*の変異がAESDおよびAERRPSの危険因子、ミトコンドリア酵素CPT2やアデノシン受容体ADORA2Aの多型がAESDの危険因子として同定された。また炎症性サイトカイ

ンIL-1βとそのアンタゴニストIL-1RAの多型も危険因子である可能性が指摘された。

平成25年度、水口班と佐久間班は統合して、遺伝子解析(ヒト症例の試料)と機能解析(in vitro細胞レベル)に集中して研究を推進することとした。本研究はAESDとAERRPSの概念確立に貢献した日本の小児神経学研究者が結集して、日本小児神経学会の支援する全国共同研究として展開された。本年度は、下記のような役割分担にもとづいて、研究を遂行した。

- ・ 研究の統括: 水口雅(研究代表者)
- ・ AESD、テオフィリン関連脳症: 齋藤真木子、高梨潤一(研究分担者)
- ・ AERRPS: 佐久間啓(研究分担者)
- ・ 急性壊死性脳症: 齋藤真木子、奥村彰久(研究分担者)
- ・ *SCN1A*遺伝子変異にもとづく急性脳症: 齋藤真木子、廣瀬伸一(研究分担者)
- ・ 腸管出血性大腸菌脳症: 高梨潤一(研究分担者)、種市尋宙(研究協力者)
- ・ 急性脳症の後遺症: 山内秀雄(研究分担者)
- ・ 急性脳症の症例登録: 後藤知英(研究協力者)

この総括研究報告書では、今年度に成果のまとめができた2疾患、テオフィリン関連脳症と腸管出血性大腸菌脳症に関する研究に関して報告する。他の疾患に関する研究については、分担研究報告書を参照されたい。

ア. テオフィリン関連脳症

テオフィリンは気管支拡張作用を有する

メチルキササンチンで、日本では小児の気管支喘息治療薬として2005年まで広く使用されてきた。テオフィリンの副作用として、血中濃度が有効範囲内にある場合でも有熱時痙攣を遷延、難治化することがあり、テオフィリン関連けいれんと呼ばれる。テオフィリン関連けいれんの重症例では急性期に発作後昏睡が数日から数週にわたり遷延して急性脳症の診断基準を満たし、回復期に知的障害、運動障害、てんかんなどの神経学的後遺症が出現することが多い。テオフィリン関連脳症が多くの場合AESDの経過を辿ることは、2000年にけいれん重積型が提唱されて以来繰り返し指摘されてきた事実である。しかしこれらの指摘は単一施設の経験にもとづいたものであり、全国規模の多施設共同研究は行われていなかった。また従来、テオフィリン関連脳症の遺伝的背景に関する研究もなかった。そこで本研究では、日本全国の施設の共同研究によりテオフィリン関連脳症の症例を集積し、その臨床経過、画像所見を検討してAESDと比較した。また遺伝子解析を行って、テオフィリン関連脳症におけるAESD関連遺伝子変異・多型の有無を検討した。

イ. 腸管出血性大腸菌脳症

腸管出血性大腸菌（志賀毒素産生性大腸菌）にはO-157、O-111、O-26などの菌株があり、下痢ないし出血性大腸炎を生じる。重症化すると溶血性尿毒症症候群（hemolytic uremic syndrome、HUS）、さらには急性脳症を生じる。腸管出血性大腸菌は汚染された食品や水を通じて集団感染

を起こすことが多く、日本でも浦和市(1990年)、邑久町、堺市（1996年）などでO-157感染患者が多発した。現在、HUSに対しては血液透析その他の治療があり救命可能であるが、脳症に対しては確立した治療がない。このため腸管出血性大腸菌による死亡例の大多数で、脳症が直接死因となっている。2011年4～5月にかけて、ある焼肉チェーン店が出した生肉が原因となりO-111の集団感染事例が富山県を中心に発生した。そこで当研究班は厚生労働科学研究特別研究（平成23年度）EHEC/O111食中毒事例における疫学・細菌学・臨床的研究（佐多班）の研究を引き継ぎ、脳症に的を絞った臨床的研究を行って腸管出血性大腸菌脳症の臨床像を明らかにし、治療の効果を検討した。

B. 研究方法

ア. テオフィリン関連脳症

テオフィリン内服またはアミノフィリン静注から数時間以内にてんかん重積状態で発症した急性脳症の症例を対象とした。日本小児神経学会の支援する共同研究として指定を受け、2008～2012年、日本各地の小児神経専門医から16症例の提供を受けた。症例の臨床経過については、家族歴、既往歴、先行感染、テオフィリン血中濃度、てんかん重積状態の持続時間、二相性けいれんの有無、頭部CT・MRI所見、治療、予後に関する情報を得た。AESDの診断は、臨床経過と頭部CT・MRI所見の両方にAESDの特徴がある場合は「確実」、一方にある場合は「ほぼ確実」、非特異的所見のみだが他

疾患に合わない場合は「可能性あり」とした。

症例の遺伝的背景に関しては、症例の末梢血からゲノムDNAを抽出し、従来の水口班研究でAESDとの関連が明らかにされた数種類の変化、すなわち(1) carnitine palmitoyltransferase 2 (*CPT2*)の熱感受性多型(F352C)、(2) adenosine A2A receptor (*ADORA2A*)の機能亢進をきたす多型の組み合わせ (haplotype A)、(3) sodium channel 1A (*SCN1A*)および2A (*SCN2A*)遺伝子変異に的を絞った候補遺伝子解析を行った。

本研究は、東京大学医学部倫理委員会の審査、承認を受け、患者の保護者に十分な説明を行い、文書による承諾を得たうえで施行した。

イ. 腸管出血性大腸菌脳症

2011年4～5月、富山県を中心として発生した腸管出血性大腸菌O-111感染症の86症例(小児21例、成人65例)の臨床的・細菌学的データを得て、臨床的検討を加えた。このうち21症例(小児10例、成人11例)が急性脳症を合併したので、治療を行った各施設の協力を得て、臨床および頭部CT・MRIのデータを収集し、後方視的に解析した。

本研究は、亀田メディカルセンターと国立感染症研究所の倫理委員会の審査、承認を受けたうえで施行した。

C. 研究結果

ア. テオフィリン関連脳症

16例の日本人患者(男:女=11:5、年齢6か月～4歳)が集積された。臨床データは患者間で似通っていた。家族歴は2例に熱性けいれん、既往歴も2例に熱性けいれんがあったが、他には特記すべきものがなかった。全例が気管支喘息発作または急性気管支炎の治療目的で一時的なテオフィリンないしアミノフィリン投与を受けていた。テオフィリン血中濃度は5例で測定され、いずれも治療域内(3.9～11.8 μg/ml)であった。全例が気道感染により発熱していた。初発のけいれんは発熱から24時間以内に生じ、ほとんどの例で重積状態であった。けいれんが15分以上続いた13例のうち、7例がバルビツール薬の持続静注(2～11日間)、2例が脳低体温療法を受けた。11例はAESDの特徴である二相性けいれんを呈した。

急性期～亜急性期の頭部CT・MRI所見は15症例で得られた。10症例はAESDの特徴である遅発性大脳皮質浮腫、脳葉ないし半球におよぶ病変分布、bright tree appearance(皮質下白質の樹枝状の拡散低下)の少なくともひとつを呈した。残る5例中1例は回復期に、AESDのもうひとつの特徴である「病変のRoland周囲領域回避」を呈した。回復期のCT・MRIでは11症例に広汎な脳萎縮が見られた。

遺伝子解析では16症例中8例に*CPT2*遺伝子のF352C多型があった。*ADORA2A*遺伝子のhaplotype Aは3例でホモ接合、11例でヘテロ接合であった。*SCN1A*遺伝子変異(V982L)と*SCN2A*遺伝子変異(F328V)が各々1例に見いだされた。

イ. 腸管出血性大腸菌脳症

急性脳症21例の全例がHUSを発症していた。HUSの小児11例中では10例が、成人23例中では11例が脳症を発症した。生肉喫食から脳症発症までは7～15日、HUS診断から脳症発症までは0～7日であった。治療として体液・電解質管理、輸血、降圧剤などの支持療法に加え、血液透析（17例）、血漿交換（12例）などの血液浄化療法が行われた。脳症に対する治療として、2011年4月中は支持療法のみであったが、5月に入ってメチルプレドニゾロン・パルス療法（11例）、免疫グロブリン静注（13例）、脳低体温（1例）などインフルエンザ脳症に準じた治療が導入された。脳症の予後は死亡が5例（うち4例は脳症の1～5病日）、神経学的後遺症（知的障害）が1例、治癒が15例であった。生存16例全例において、腎機能はほぼ正常まで回復した。

頭部CTないしMRIが、脳症の急性期に21症例全例で撮像された。死亡した5例中4例でびまん性脳浮腫が急速かつ高度に進行した。15例に脳実質内の病変が認められ、その分布は両側性で、視床、大脳基底核（被殻または淡蒼球）、外包、脳幹被蓋、小脳など症例により異なった。脳症の6～27病日に5症例の大脳白質や基底核にラクナ梗塞が出現した。

予後不良（死亡ないし神経学的後遺症）の6症例と予後良好（治癒）の15症例を比較すると、HUSから脳症までの時間間隔、血清クレアチニン値、メチルプレドニゾロン・パルス療法の施行に関して有意差があ

ったが、他の属性については差がなかった。

D. 考察

ア. テオフィリン関連脳症

テオフィリン関連脳症16例のうち、AESDの診断は11例において確実、1例においてほぼ確実、3例において可能性ありで、否定的なのは1例のみだった。このようにテオフィリン関連脳症の症例の大半は、予想どおりAESDの臨床像を呈していた。

テオフィリン関連脳症の症例の大多数は、従来からAESDの遺伝的素因として知られている遺伝子型、すなわち*CPT2*遺伝子の熱感受性多型、*ADORA2A*遺伝子のhaplotype A、*SCN1A*遺伝子変異または*SCN2A*遺伝子変異のうちひとつ以上を有していた。テオフィリン関連脳症がAESDと共通の遺伝的背景を有していることが明らかとなった。

イ. 腸管出血性大腸菌脳症

2011年のO-111集団感染事例では、HUS患者の中で脳症を発症する率が高いことが特徴的であった。ことに小児では11例中10例ときわめて高かった。脳症21例の予後は死亡5例、治癒15例と両極端に二分した。予後良好例には予後不良例に比し、メチルプレドニゾロン・パルス療法を施行した例が有意に多く、本治療法の有効性が示唆された。ただし両者間にはHUSから脳症までの時間間隔、血清クレアチニン値についても有意差があり、予後不良例の方が元々、より重症であったことは疑いない。このため本研究の結果のみにもとづいて、メチルプレドニゾロン・パルス療法の有効性が確実

とまで結論することはできない。

頭部CT・MRI所見は、病変分布について患者間に差が見られたが、患者全体を見るとひとつのスペクトラムに収まるものと考えられた。死亡例ではびまん性脳浮腫が急速かつ高度に進行することが特徴的であった。

E. 結論

テオフィリン関連脳症は、臨床的にも遺伝学的にも、AESDと高度にオーバーラップする。腸管出血性大腸菌脳症では脳浮腫の急速な進行が死亡に直結する。メチルプレドニゾン・パルス療法は脳症の治療法として有望である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakai E, Yamanaka G, Kawashima H, Morishima Y, Ishida Y, Oana S, Miyajima T, Shinohara M, Saitoh M, Mizuguchi M. A case of recurrent acute encephalopathy with febrile convulsive status epilepticus with carnitine palmitoyltransferase II variation. *Neuropediatrics* 2013; 44(4): 218-221.
- 2) Tumurkhuu M, Saitoh M, Takita J, Mizuno Y, Mizuguchi M. A novel *SOS1* mutation in Costello/CFC

syndrome affects signaling in both RAS and PI3K pathways. *J Recept Sig Transd Res* 2013; 33(2): 124-128.

- 3) Iwasa M, Yamagata T, Mizuguchi M, Itoh M, Matsumoto A, Hironaka M, Honda A, Momoi MY, Shimozawa N. Contiguous *ABCD1 DXS1357E* deletion syndrome: Report of an autopsy case. *Neuropathology* 2013; 33(3): 292-298.
- 4) Shinohara M, Saitoh M, Nishizawa D, Ikeda K, Hirose S, Takanashi JI, Takita J, Kikuchi K, Kubota M, Yamanaka G, Shiihara T, Kumakura A, Kikuchi M, Toyoshima M, Goto T, Yamanouchi H, Mizuguchi M. *ADORA2A* polymorphism predisposes children to encephalopathy with febrile status epilepticus. *Neurology* 2013; 80(17): 1571-1576.
- 5) Okitsu S, Khamrin P, Thongprachum A, Kongkaew A, Maneekarn N, Mizuguchi M, Hayakawa S, Ushijima H. Whole-genomic analysis of G3P[23], G9P[23] and G3P[13] rotavirus strains isolated from piglets with diarrhea in Thailand, 2006-2008. *Infection, Genet Evol* 2013; 18C: 74-86.
- 6) Thongprachum A, Khamrin P, Chan-It W, Malasao R,

- Chaimongkol N, Okitsu S, Mizuguchi M, Maneekarn N, Hayakawa S, Ushijima H. Emergence of norovirus GII/4 2006a and 2006b variants in hospitalized children with acute gastroenteritis in Thailand. *Clin Lab* 2013; 59(3-4): 271-276.
- 7) Miyazaki C, Saitoh M, Itoh M, Yamashita S, Miyagishi M, Takashima S, Moser AB, Iwamori M, Mizuguchi M. Altered phospholipid molecular species and glycolipid composition in brain, liver and fibroblasts of Zellweger syndrome. *Neurosci Lett* 2013; 552(1): 71-75.
- 8) Mizuguchi M. Influenza encephalopathy and related neuropsychiatric syndromes. *Influenza Other Resp Virus* 2013; 7(Suppl3): 67-71.
- 9) Chan-It W, Thongprachum A, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H. Genetic analysis and homology modeling of capsid protein of norovirus GII.14. *J Med Virol* 2014; 86(2):329-324.
- 10) Tran DN, Nguyen TQ, Nguyen TA, Hayakawa S, Mizuguchi M, Ushijima H. Human bocavirus in children with acute respiratory infections in Vietnam. *J Med Virol* 2013 Oct 12. doi: 10.1002/jmv.23789.
- 11) Takanashi JI, Taneichi H, Misaki T, Yahata Y, Okumura A, Ishida YI, Miyawaki T, Okabe N, Sata T, Mizuguchi M. Clinical and radiologic features of encephalopathy during 2011 E coli O111 outbreak in Japan. *Neurology* 2014; 82(7): 564-572.
- 12) Thongprachum A, Chan-It W, Khamrin P, Saparpakorn P, Okitsu S, Takanashi S, Mizuguchi M, Hayakawa S, Maneekarn N, Ushijima H. Molecular epidemiology of norovirus associated with gastroenteritis and emergence of norovirus GII.4 variant 2012 in Japanese pediatric patients. *Infect Genet Evol* in press.
- 13) 水口雅. 急性脳症—発症の遺伝的背景—。 *Neuroinfection* 2013; 18(1): 54-59.
- 14) 水口雅. [感染症症候群]急性脳症, ライ症候群. 別冊日本臨牀, 新領域別症候群シリーズ, No. 25, 感染症症候群 (第2版) —症候群から感染性単一疾患までを含めて—, 日本臨牀社, 東京, 2013; pp. 148-152.
- 15) 水口雅. [感染性疾患]ウイルス性脳炎・脊髄炎・髄膜炎概論. 別冊日本臨牀, 新領域別症候群シリーズ, No. 26, 神経症候群 (第2版) —その他の神経

- 疾患を含めて一, 日本臨牀社, 東京, 2013; pp. 529-535.
- 16) 水口雅. [感染性疾患]大腸菌. 別冊日本臨牀, 新領域別症候群シリーズ, No. 26, 神経症候群 (第2版) —その他の神経疾患を含めて一, 日本臨牀社, 大阪, 2013; pp. 774-778.
2. 学会発表
- 1) 高梨潤一, 水口雅, 奥村彰久, 種市尋宙, 田中朋美. 腸管出血性大腸菌 (EHEC)O111関連急性脳症の頭部画像所見の検討. 第117回日本小児科学会学術集会 広島, 2013年4月20日
- 2) 齋藤真木子, 篠原麻由, 高梨潤一, 菊池健二郎, 久保田雅也, 山中岳, 水口雅. けいれん重積型急性脳症の遺伝的素因. 第117回日本小児科学会学術集会 広島, 2013年4月20日
- 3) 星野愛, 齋藤真木子, 水口雅. 病原体及び症候群分類に基づいた急性脳症の全国実態調査. 第117回日本小児科学会学術集会 広島, 2013年4月19日
- 4) 多田弘子, 高梨潤一, 山形崇倫, 奥野英夫, 久保田雅也, 河野剛, 椎原隆, 浜野晋一郎, 廣瀬伸一, 水口雅. 二相性けいれんと遅発性拡散低下を呈する急性脳症(AESD)の予後予測に関する検討. 第55回日本小児神経学会学術集会, 大分, 2013年5月30日
- 5) 齋藤真木子, 星野愛, 久保田雅也, 菊池健二郎, 山中岳, 廣瀬伸一, 水口雅. けいれん重積型急性脳症と熱性けいれんの遺伝的素因の比較—サイトカイン遺伝子多型解析—. 第55回日本小児神経学会学術集会, 大分, 2013年5月30日
- 6) 座波清誉, 松本浩, 中村康子, 齋藤真木子, 水口雅. RSウイルス関連脳症の2例: 発症機序についての考察. 第55回日本小児神経学会学術集会, 大分, 2013年5月31日
- 7) 水口雅. [急性脳症をいかに理解するか: 今後の研究アプローチ]急性脳症の包括的遺伝子解析. 第55回日本小児神経学会学術集会, 大分, 2013年6月1日
- 8) 西村尚子, 樋口嘉久, 井口牧子, 木村暢佑, 野崎章仁, 熊田知浩, 藤井達哉, 星野愛, 齋藤真木子, 水口雅. RANBP2, CPT-II遺伝子変異を認めなかった急性脳症の兄弟例. 第55回日本小児神経学会学術集会, 大分, 2013年6月1日
- 9) 星野愛, 齋藤真木子, 久保田雅也, 高梨潤一, 豊嶋光雄, 宮本晶恵, 奥村彰久, 水口雅. 急性壊死性脳症における遺伝的素因—HLAタイピング及びサイトカイン遺伝子多型解析—. 第55回日本小児神経学会学術集会, 大分, 2013年6月1日
- 10) Mizuguchi, M. Genetics of early onset epilepsy with encephalopathy. 12th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology, Riyadh, 2013年9月16日
- 11) 水口雅. 急性脳症と遺伝子多型・変異.

第18回日本神経感染症学会学術集会,
宮崎, 2013年10月12日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他
なし。

II. 分担研究報告

自己免疫性機序を介する急性脳炎における抗神経抗体の検索

研究分担者 奥村 彰久（順天堂大学医学部小児科 准教授）

研究要旨

近年、急性脳炎・脳症における抗神経抗体の関与が注目されている。しかし、抗神経抗体の検出方法は確立されていない。我々は複数の方法で抗神経抗体の検出を試み、その結果を比較した。自己免疫性機序の関与が疑われる急性脳炎・脳症16例について、Immunoblot (IB)・ラット脳組織免疫組織染色(ラットIHC)・ヒト脳組織免疫組織染色(ヒトIHC)の3つの方法で抗神経抗体の検出を行った。IBでは5例、ラットIHCでは11例、ヒトIHCでは10例において、抗神経抗体の存在が示唆された。それぞれの結果は必ずしも一致するとは限らなかった。今回の結果では、感度ではIHCがIBに優るが、抗神経抗体の検出には複数の方法を組み合わせることで結果を総合的に判断することが必要であると思われた。

A. 研究目的

近年、急性脳炎・脳症における自己抗体（抗神経抗体）の関与が注目されている。特に精神症状・けいれん・記憶障害・不随意運動などを呈する辺縁系脳炎やその周辺疾患において抗神経抗体の解析が進んでいる。自己免疫性機序の関与が疑わしい急性脳炎・脳症はしばしば経験されるが、画像では明らかな異常を認めず血液検査における疾患マーカーも現時点では明らかでない。そのため、自己免疫性機序の関与を証明するには、自己抗体の検出が必要である。抗神経抗体の検出法として免疫組織化学法（IHC）、immunoblot（IB）、cell-based-assayなどが知られているが、複数の検出法を比較した報告は少ない。我々

は、自己免疫性機序の関与を疑った急性脳炎・脳症において複数の方法で抗神経抗体の検出を試み、その結果を比較した。

B. 研究方法

16例の急性脳炎・脳症を対象とした。対象となった症例は、精神症状や難治のけいれんなどの神経症状を有し、臨床経過などから自己免疫性機序の関与が強く疑われていた。これらの症例について、以下の3つの方法で自己抗体の検出を試みた。

1. ヒト脳組織抽出蛋白メンブレンを用いた immunoblot (IB) : ヒト脳抗原を電気泳動させた市販のInsta-blot membrane (IMGENEX, IMB-124) を使用し、

患者血清を200倍希釈して反応させる。ヤギ抗ヒトIgG抗体に反応させた後、Streptavidin-HRPに反応させ、DAB発色で特定の脳抗原と結合するIgGをバンドとして描出する。

2. ラット脳組織に対する免疫組織化学染色法 (ラットIHC) : 市販のラット脳切片を使用し、患者血清を400倍希釈して反応させる。ヤギ抗ヒトIgG抗体に反応させた後、Streptavidin-HRPに反応させ、DAB発色で特定の脳切片と結合するIgGを可視化する。

3. ヒト脳組織に対する免疫組織化学染色法 (ヒトIHC) : 年齢相当対照ヒト脳切片を使用し、10000倍希釈した患者血清を反応させる。ウサギ抗ヒトIgG抗体に反応させた後、DAB発色で特定の脳切片部位と結合するIgGを可視化する。

C. 研究結果

表1に結果を示す。16例中15例でいずれかの方法により抗神経抗体の存在が示唆された。

IBでは5症例に過剰なバンドを認めた。うち4症例では複数のバンドを認めた。ラットIHCでは11例で染色を認めた。染色された構造は、核8例・ニューロピル4例・細胞体2例であった。ヒトIHCでは10例で染色を認めた。染色された部位は症例によって様々であった。

D. 考察

今回の研究では、抗神経抗体の検出法により異なった結果が得られた。この結果は、自己免疫性脳炎の診断においては、複数の抗神経抗体測定法を組み合わせる総合的に判断する必要があることを強く示唆する。

IBは感度がIHCに比べて低いことが示唆され、抗神経抗体のスクリーニングには適

さないと考えられた。IBには抗体の標的の分子量の推定や未知の抗原に対する抗体検出などの利点があるが、タンパク変性処理を伴うため細胞表面抗原に対する抗体の検出は困難になるため感度が劣る結果になったと推定された。

IHCは比較的感度が高く、信頼性がある測定法と思われた。しかし、組織の固定の過程で抗原性が失われる可能性があり、感度が低下する可能性がある。また今回の検討では、ラットの標本とヒトの標本とを用いた場合で結果が一致しなかった。したがってIHCを用いる場合に複数の動物種を用いることが妥当であると思われた。

E. 結論

自己免疫性機序の関与が推定された急性脳炎の症例において、複数の抗神経抗体の測定法の比較を行った。IHCはIBに比べて感度が高くより有用であると思われた。しかし、それぞれの結果が一致しないことも多く、抗神経抗体の検出には複数の方法を組み合わせる総合的に判断することが必要と思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okumura A, Nakagawa S, Kawashima H, Morichi S, Muguruma T, Saito O, Fujimoto JI, Toida C, Kuga S, Imamura T, Shimizu T, Kondo N, Morishima T. Severe form of encephalopathy associated with 2009 pandemic influenza A (H1N1) in Japan. *J Clin Virol* 2013; 56(1): 25-30.
- 2) Okumura A, Nakagawa S, Kawashima H, Muguruma T, Saito O, Fujimoto J, Toida C, Kuga S, Imamura T, Shimizu T, Kondo N, Morishima T. Unexpected cardiopulmonary arrest associated

- with influenza: our experience during the 2009 pandemic in Japan. *Influenza Other Resp Virus* 2013; 7(5): 759-760.
- 3) 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* 2013; 35(2): 181-184.
 - 4) Suganuma H, Okumura A, Kitamura Y, Shoji H, Shimizu T. Effect of Hypoxic-Ischemic Insults on the Composition of Fatty Acids in the Brain of Neonatal Rats. *Ann Nutr Metab* 2013; 62(2): 123-128.
 - 5) Kubota T, Fukasawa T, Kitamura E, Magota M, Kato Y, Natsume J, Okumura A. Epileptic seizures induced by dexmedetomidine in a neonate. *Brain Dev* 2013; 35(4): 360-362.
 - 6) Hiraiwa-Sofue A, Ito Y, Ohta R, Kimura H, Okumura A. Human herpesvirus 6-associated encephalopathy in a child with Dravet syndrome. *Neuropediatrics* 2013; 44(3): 155-158.
 - 7) Nakazawa M, Okumura A, Nijima S, Yamashita S, Shimono K, Hirose S, Shimizu T. Oral mexiletine for lidocaine-responsive neonatal epilepsy. *Brain Dev.* 2013; 35(7): 667-669.
 - 8) Nakano T, Okumura A, Tanabe T, Niwa S, Fukushima M, Yonemochi R, Eda H, Tsutsumi H. Safety evaluation of laninamivir octanoate hydrate through analysis of adverse events reported during early post-marketing phase vigilance. *Scand J Infect Dis.* 2013; 45(6): 469-477.
 - 9) Ishii A, Shioda M, Okumura A, Kidokoro H, Sakauchi M, Shimada S, Shimizu T, Osawa M, Hirose S, Yamamoto T. A recurrent KCNT1 mutation in two sporadic cases with malignant migrating partial seizures in infancy. *Gene.* 2013; 531(2): 467-471.
2. 学会発表
- 1) Akihisa Okumura. Invited lecture: Proposal of semiological categorization of neonatal seizures. The 15th Annual Meeting of Infantile Seizure Society, Tokyo, Japan, 2013.4.13.
 - 2) 奥村彰久、中川聡、河島尚志、清水俊明、近藤直実、森島恒雄、新型インフルエンザ死亡例調査グループ。インフルエンザに伴う予期せぬ心肺停止：パンデミック2009 小児死亡例の実態調査から。第116回日本小児科学会学術集会、広島、2013.4.20
 - 3) Akihisa Okumura. Current Clinical Approach to Neonatal Seizures. Pediatric Academic Societies 2013 Annual Meeting, Washington DC, USA, 2013.5.4.
 - 4) Akihisa Okumura. EEG in term babies. Joint Scientific Meeting of 9th Asian Society of Pediatric Research Congress and 20thh Malaysia Society of Pediatrics Annual Congress, Kuching. Malaysia, 2013.5.9.
 - 5) Akihisa Okumura. EEG in preterm babies. Joint Scientific Meeting of 9th Asian Society of Pediatric Research Congress and 20thh Malaysia Society of Pediatrics Annual Congress, Kuching. Malaysia, 2013.5.9.
 - 6) Akihisa Okumura. Neonatal Seizures. Diagnosis and treatment based on

- EEG. Joint Scientific Meeting of 9th Asian Society of Pediatric Research Congress and 20th Malaysia Society of Pediatrics Annual Congress, Kuching, Malaysia, 2013.5.11.
- 7) Akihisa Okumura, Masaharu Hayashi, Keiko Shimojima, Mitsuru Ikeno, Shinpei Abe, Jun-ichi Takanashi, Nobuhiko Okamoto, Toshiaki Shimizu, Toshiyuki Yamamoto. Whole-exome sequencing identifies FLNB variant in a unique brain malformation. 第55回小児神経学会総会、大分、2013.5.30.
- 8) 奥村彰久. 新生児脳障害と中枢神経モニタリング. 第55回小児神経学会総会、大分、2013.5.31.
- 9) 奥村彰久. 急性脳症をいかに理解するか：今後の研究アプローチ 2. 脳波・aEEG 第55回小児神経学会総会、大分、2013.6.1.
- 10) Akihisa Okumura, Mika Nakazawa, Shinpei Abe, Toshiaki Shimizu. Attitude toward Epilepsy after Media Coverage of Car Accidents Related to Persons with Epilepsy in Japan. 30th International Epilepsy Congress, Montreal, Canada, 2013.6.24.
- 11) 奥村彰久、池野充、久田研、東海林宏道、清水俊明. 新生児発作に対するホスフェニトインの使用経験. 第49回日本周産期・新生児医学会学術集会、横浜、2013.7.15.
- 12) Akihisa Okumura, Mika Nakazawa, Shinpei Abe, Toshiaki Shimizu. Attitude toward Epilepsy after Media Coverage of Car Accidents Related to Persons with Epilepsy in Japan. 第47回日本てんかん学会学術集会、北九州、2013.10.11.
- 13) 奥村彰久. 新生児の脳機能研究 第43回日本臨床神経性理学会、高知、2013.11.8.
- G. 知的所有権の取得状況**
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

表1. 抗神経抗体の検出

症例	診断	IB	ラットIHC	ヒトIHC
1	辺縁系脳炎	—	ニューロピル	淡蒼球・大脳皮質
2	辺縁系脳炎	30-45kDa×2	核・ニューロピル	海馬
3	辺縁系脳炎	35kDa	核・ニューロピル	Not tested
4	辺縁系脳炎	—	核・ニューロピル	後側頭回
5	辺縁系脳炎	30-45kDa×4	—	海馬
6	辺縁系脳炎	—	細胞体	—
7	辺縁系脳炎	—	核	前頭葉
8	辺縁系脳炎	—	—	海馬傍回
9	基底核脳炎	—	細胞体・核	—
10	基底核脳炎	45kDa×2	核	被殻
11	基底核脳炎	—	核	—
12	基底核脳炎	—	核	—
13	基底核脳炎	—	核	尾状核
14	基底核脳炎	—	—	—
15	基底核脳炎	60kDa・160kDa	—	中脳灰白質
16	基底核脳炎	—	—	海馬

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

急性壊死性脳症における遺伝的素因 —HLAタイピング及びサイトカイン遺伝子多型解析—

研究分担者 齋藤 真木子（東京大学大学院医学系研究科発達医科学 助教）

研究協力者 星野 愛（東京大学大学院医学系研究科発達医科学）

研究要旨

急性壊死性脳症ではサイトカインストームが病態として推定されており、両側対称性の視床病変が特徴的な予後不良の脳症である。発症には何らかの遺伝的素因の関与が考えられる。私たちは自然免疫系を担う分子の遺伝子多型に注目し、日本人急性壊死性脳症31例についてHLAタイピングおよびサイトカイン遺伝子多型解析を行った。その結果、HLA Class II DRB1 09:01およびDQB1 03:03が発症のリスクファクターであること、サイトカイン遺伝子IL6およびIL10のプロモーター領域一塩基多型の疾患関連性が明らかとなった。

A. 研究目的

インフルエンザなどの先行感染後に合併する急性脳症のうち、急性壊死性脳症はサイトカインストームが発症メカニズムであるとされ、依然として死亡率が30%程度で高い。急性脳症が東アジアに多く発症することから何らかの遺伝的素因が背景にあると考えられる。私たちはこれまでけいれん重積型急性脳症において発熱時の細胞エネルギー不全や過興奮性による神経毒性の観点からリスクファクターの候補遺伝子の多型・変異解析を行ってきた。急性壊死性脳症においても病態から推測される疾患関連遺伝子が判明すれば、新たな治療の標的を

設定できる可能性がある。私たちは自然免疫系の遺伝子多型に注目して急性壊死性脳症の疾患関連遺伝子であるかどうかを検討した。

B. 研究方法

日本人急性壊死性脳症患者31名を対象とした。男女比は16:15で年齢分布7ヶ月～8歳7ヶ月、平均年齢は2歳2ヶ月であった。2例は兄妹例で2例は急性脳症の反復例であった。先行感染としてはインフルエンザ、突発性発疹、ロタウイルスなどが含まれた。家族により文書による同意を得た後、末梢血からDNAを抽出し、HLAのクラスI、

II については r-SSOP:Luminex 法 (WAKFlow, LABType)によるタイピングを行った。サイトカイン遺伝子のIL-6、IL-10およびTNF α のプロモーター領域を含む一塩基多型は直接塩基配列解析により検出し、遺伝子型を同定した。正常対照群として日本人90例のDNAを用いた。

厚生労働省労働省の医学研究に関する指針を遵守し実施した。遺伝子解析については、東京大学大学院医学研究科倫理委員会の承認を得た。本研究に利益相反は存在しない。

C. 研究結果

HLA クラスI (-A, -B, C-) の各遺伝子型頻度は日本人HLAデータベースと比較して、差異はなかった。HLAクラスII (-DQB1, -DRB1, -DPB1) のタイピングでは、HLA-DRB1 *09:01を有する頻度が患者群で24%、対照群で14%であり、患者群で有意に多かった($p=0.029$)。HLA-DRB1 *04:06を有する頻度は患者群で8.1%であり、対照群の3.4%と比較して高かった($p=0.05$)。HLA-DQB1 では*03:03を有する割合が患者群で26%、対照群で15%と患者群で有意に高かった($p=0.03$)。また、クラスIIの2座の組み合わせでHLA-DQB1 *03:03及び-DRB1 *09:01をいずれも有する割合が患者群で24.2%と高率であった(p 値=0.04)。サイトカイン関連遺伝子(IL-6、IL-10、TNF α)多型ではプロモーター領域のIL-6 SNPである-572C/Gについて、患者群のマイナーアレル(G)頻度が37%で

正常群の20%より有意に高かった($p=0.016$)。さらにマイナーアレルのホモ接合G/Gの頻度が患者群で9.7%であったが、正常対照では0.5%と極めて低かった($p=0.017$)。IL-10のプロモーター領域の多型では-627A/Cのマイナーアレル(C)のホモ接合C/Cが患者の42%に認められ、対照群の約4倍の頻度であった($p<0.001$)。さらに5'側の多型では-819T/Cマイナーアレル(C)のホモ接合C/Cが患者の23%に認められ、対照群の約3倍の頻度であった($p<0.001$)。TNF α の遺伝子多型では正常対照との頻度の差は認められなかった。

D. 考察

患者群で頻度の高かったHLA-DRB1*09:01および-DQB1*03:03は連鎖不均衡を示すことが知られており、この2つを有する頻度は欧米人に比べアジア人で高い。急性壊死性脳症患者群では各々のアレル頻度が日本人データベースと比べ高く、また両者が連鎖するハプロタイプを持つ頻度も同様に有意に高かった。今回の検討で急性壊死性脳症のリスクファクターとしてHLAクラスIIの特定の遺伝子型を同定することができた。HLAクラスIIの分子はマクロファージ等がCD4(+)T細胞に外来抗原を提示する際に必要であり、特定の遺伝子型では抗原提示後に惹起される免疫反応の過剰をもたらすことが考えられ、これが急性壊死性脳症の病態であるサイトカインストームの「起り易さ」に結びつく可能性がある。これまで