

II. 分担研究報告

**厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究研究事業）
分担研究報告書**

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て結果を総合的に判断することが必要であると思われる。

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. Diagonosis 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 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 (-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) 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 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 HLA-DRB1*09:01 および-DQB1*03:03 と、糖尿病 I 型、関節リウマチおよび若年性重症筋無力症に疾患関連性が報告されている。サイトカインは血管内皮障害を起こすが、まれな壊死性血管炎で、日本人に多いとされる microscopic polyangitis においても、HLA-DRB1*09:01 および-DQB1 *03:03 の疾患関連性が指摘されているため、このハプロタイプとサイトカイン産生に何らかの関連が示唆される。

サイトカイン遺伝子の多型については、これまでに様々な疾患との関連性が報告されている。急性壊死性脳症では IL6 および IL10 のプロモーター領域の多型で正常対照群と比べ、有意にマイナーアレル頻度やホモ接合遺伝子型頻度が高いことが明らかとなった。プロモーター領域に存在するため、遺伝子発現量の変化をもたらす機能的一塩基多型として感染時のサイトカイン産生に影響する可能性が考えられる。

E . 結論

日本人急性壊死性脳症では 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

領域一塩基多型に疾患関連性があることが明らかとなった。

F . 健康危険情報

特になし

G . 研究発表

学会発表

- 1) 齋藤真木子、星野愛、久保田雅也、菊池健二郎
山中岳、廣瀬申一、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 小児神経学会学術集会 (大分)
- 2) 齋藤真木子、篠原麻由、高梨間一、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 116 回日本小児科学会学術集会 (広島)
- 3) 星野愛、齋藤真木子、久保田雅也、高梨間一、豊島光雄、宮本晶恵、奥村章久、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 回小児神経学会学術集会 (大分)

H . 知的財産権の出願・登録状況

- 1 . 特許取得
特になし
- 2 . 実用新案登録
特になし

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

難治頻回部分発作重積型急性脳炎の免疫学的解析

研究分担者 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

難治頻回部分発作重積型急性脳炎（以下 AERRPS）の原因は未だ不明である。AERRPS における免疫学的異常の関与を明らかにするため、AERRPS の臨床情報ならびに臨床検体を前方視的に集積し、血清・髄液において計 10 種類のサイトカイン・ケモカインを cytometric bead array 法により測定して炎症性及び非炎症性神経疾患との比較を試みた。その結果、AERRPS では血清・髄液中の IL-6, IL-8, IP-10, MIG が有意に高値を示し、その傾向は髄液でより顕著であった。さらに IP-10 と MIG は予後と相関が見られた。これらの結果は AERRPS において中枢神経系に比較的限局した炎症が存在し、インターフェロンを中心とした免疫系の活性化が AERRPS の病態に何らかの役割を果たすことを示唆している。この新たな知見は AERRPS に対する新規治療法の開発に向けた重要な一歩となると期待される。

A. 研究目的

難治頻回部分発作重積型急性脳炎(AERRPS)は、極めて難治かつ頻回の部分けいれんにより特徴づけられる原因不明の疾患である。けいれんは数ヶ月にわたって持続し長期間のバルビタール麻酔を要するうえに、生涯にわたり難治てんかんならびに知的障害を残し予後は不良である。近年類似の疾患概念 febrile infection-related epilepsy syndrome (FIRES)が提唱され、AERRPS と FIRES は全く同一ではないもののほぼ同等と考えてよい。

AERRPS の原因は今なお全く不明である。一部の症例において Dravet 症候群の原因遺伝子である SCN1A の変異を認めたという報告がある。AERRPS と Dravet 症候群は共に発熱によりけいれんが誘発されやすいという臨床的な共通点を認めることから、両疾患が同一スペクトラムであるという考え方が提唱された。しかし FIRES の症例では SCN1A 変異は一例も見いだされず、少なくとも

SCN1A 変異は AERRPS の主要な原因ではないと考えられる。さらに FIRES に対して難治てんかんの治療法であるケトン食療法が奏効することも、本疾患がてんかんの一種であるという考え方を支持する根拠となっている。一方で抗電位依存性カリウムチャネル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り、本疾患の背景に免疫学的異常が存在するという考え方がある。実際に白血病や血球貪食症候群に合併した AERRPS の症例が知られている。しかし免疫調整療法が多くの場合無効であり、FIRES の脳生検病理においてリンパ球浸潤が全く認められないことから、免疫系の関与を疑問視する向きもある。

AERRPS における詳細な免疫学的検討はこれまで行われていないことから、我々は AERRPS が脳炎の一種であるという仮説を立てて検証を行った。AERRPS の症例を前方視的に集積し、血清・髄液等のサンプルを用いて免疫学的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) 炎症性神経疾患：抗 NMDA レセプター脳炎・辺縁系脳炎等の自己免疫性脳炎、急性散在性脳脊髄炎等

C) 非炎症性神経疾患：てんかん、発達障害等

2010年4月から2013年7月までに集積されたAERRPS27例、炎症性神経疾患16例、非炎症性神経疾患27例を対象とした。炎症性神経疾患の内訳は急性散在性脳脊髄炎(n=3)、辺縁系脳炎(n=3)、NMDAR脳炎(n=3)、オプソクローヌス-ミオクローヌス症候群(n=2)、PANDAS(n=2)、亜急性硬化性全脳炎(n=2)、Rasmussen脳炎(n=1)、非炎症性神経疾患の内訳はてんかん(n=22)、末梢神経障害(n=2)、脳性麻痺(n=2)、発達障害(n=1)であった。三群間で患者年齢・性別に有意差を認めなかった。

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 interferon (IFN) γ , interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p70, tumor necrosis factor (TNF) α , IL-8, interferon gamma-induced protein (IP)-10 (CXCL10), monocyte chemotactic protein (MCP)-1 (CCL2), and monokine induced by interferon gamma (MIG, CXCL9) の10種類を測定した。血清及び髄液 50 μ 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, Kruskal-Wallis 検定, Spearman 順位相関係数検定を用い $P < 0.05$ をもって有意とした。解析は StatCel 4 ソフトウェアにより行った。

(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)。被験者からは文書による同意を取得した。血清・髄液は診療機関で検体を採取した後匿名化して研究所に送付された。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

AERRPS の27症例中14例で臨床的特徴を詳細に解析した。全例発熱に伴うけいれんで発症し、けいれんの発作型は眼球偏位(n=9)、顔面間代(n=8)、片側四肢間代(n=7)、無呼吸(n=7)が多かった。脳波所見は高振幅徐波(n=4)、てんかん性異常波(n=10)が認められた。MRIは9例で異常を認め、大脳基底核(n=4)、大脳皮質(n=4)、視床(n=3)、and 海馬(n=3)などに信号異常が見られた。治療としてはメチルプレドニゾロンパルス療法(n=13)、IVIg療法(n=10)等が行われた。予後は様々で、完全回復(n=2)、軽度~中等度後遺症(n=5)、重度後遺症(n=6)であった。

血清・髄液中サイトカイン解析に関しては、血清では AERRPS において IL-6 ($P < 0.01$), IL-8 ($P < 0.05$), IP-10 ($P < 0.01$), MIG ($P < 0.05$) が非炎症性神経疾患と比較して有意に高値を示した。IP-10 ($P < 0.01$) と MIG ($P < 0.01$) は炎症性神経疾患と比較しても高値であった。髄液では AERRPS において IL-6 ($P < 0.01$), IL-8 ($P < 0.01$), IP-10 ($P < 0.01$), MIG ($P < 0.01$) IL-6 が炎症性・非炎症性神経疾患のいずれに対しても有意に高値であった。髄液 IL-6 と IL-8 ($R = 0.82, P = 0.0005$) および髄液 IP-10 と MIG ($R = 0.71, P = 0.00$)の間には有意の相関が認められた。さらに髄液細胞数は髄液 IL-6 ($R = 0.46, P = 0.03$) ならびに髄液 IL-8 ($R = 0.52, P = 0.01$)

と有意に相関し、小児の神経学的予後評価スケールである PCPC スコアは髄液 IP-10 ($R = 0.55, P = 0.01$) ならびに髄液 MIG ($R = 0.49, P = 0.03$) と有意に相関した。

D. 考察

本研究は AERRPS 患者の血清および髄液において一部のサイトカイン・ケモカインが増加していることを初めて明らかにした。これは AERRPS の病態に炎症が関与することを強く示唆している。てんかんや虚血性脳障害など従来は非炎症性疾患とされてきた疾患の病態にも免疫反応が関与することは既に知られている。しかし AERRPS で認められるサイトカイン・ケモカインの異常は炎症性神経疾患と比較してもより顕著であり、上記の非炎症性疾患で認められる変化とは程度が全く異なる。またけいれん重積の結果として IL-1 や IL-6 等のサイトカインが上昇するが、IL-8, IP-10, MIG 等のケモカインの異常はこれまで全く指摘されていなかった。

IP-10 と MIG は共にインターフェロン誘導性ケモカインとして知られており、また I 型インターフェロンの活性上昇が関与するとされる中枢神経系ループスの髄液においても同じ IL-6, IL-8, IP-10, MIG の上昇が認められることから、これらの炎症関連分子の上昇にインターフェロンの活性化が関連することが推定される。しかし AERRPS において血清・髄液中 IFN の上昇は認められなかった。この原因として IFN 測定感度の問題や他のインターフェロンの関与などの可能性が考えられる。

AERRPS で認められたこれらの免疫学的異常は、いずれも血清よりも髄液で顕著であった。これはいわゆるサイトカイン・ストーム型急性脳症とは全く逆のパターンであり、両者の病態が大きく異なることを反映していると考えられる。サイトカイン・ストーム型急性脳症は全身の強い炎症が脳の血管内皮細胞を活性化すると考えられているが、AERRPS では中枢神経系に限局した強い炎症が生じていると推定される。脳内のどのような細胞が関与しているかは不明であるが、IL-6 と IL-8 は髄液細胞数と相

関することから、中枢神経系に浸潤した白血球によって産生されている可能性がある。IP-10, MIG の産生源は不明であるが、中枢神経系の免疫担当細胞であるミクログリアはこれらのケモカインを産生することが知られている。

また AERRPS で見られた髄液中のサイトカイン・ケモカインの増加が疾患の原因なのか結果なのか問題となる。髄液中 IP-10 と MIG は予後と相関することから、これらが AERRPS における神経障害に何らかの形で関与することが示唆される。IP-10, MIG の中枢神経系に対する直接的な作用は知られていないが、神経細胞はその受容体である CXCR3 を発現している。

本疾患で認められた免疫学的異常は、AERRPS の新たな治療戦略を考える上で重要である。すなわち IL-6, IL-8, IP-10, MIG は AERRPS における治療標的となる可能性がある。既にこれらの炎症メディエーターの機能を修飾する分指標的薬が開発されており、これらは AERRPS の治療にも応用できる可能性がある。今後は AERRPS における炎症の主役となっている分子を同定し、それらが難治てんかんや神経障害とどのように結びついているかを解析する必要がある。

E. 結論

AERRPS では主に髄液中で IL-6, IL-8, IP-10, MIG が高値を示す。これは中枢神経系の炎症が存在することを示しており、インターフェロン系の活性化が病態に関与することを示唆する。これらの異常はてんかんにおいては過去に報告されていなかった新規のものであり、AERRPS の新たな治療戦略を考える上で重要な知見である。

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) Hachiya Y, Uruha A, Kasai-Yoshida E,

Shimoda K, Satoh-Shirai I, Kumada S, Kurihara E, Suzuki K, Ohba A, Hamano S, Sakuma H. Rituximab

ameliorates anti-N-methyl-d-aspartate receptor encephalitis by removal of short-lived plasmablasts. J Neuroimmunol. 2013 (in press)

2) Sakuma H and Noto D, Takahashi K, Saika R, Saga R, Yamada M, Yamamura T, Miyake S. Development of a Culture System to Induce Microglia-like Cells from Haematopoietic Cells. Neuropathol Appl Neurobiol. 2013 (in press)

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 .ラット脳切片を用いた免疫組織化学法による自己免疫性脳炎関連抗神経抗体の同定 .第 55 回日本小児神経学会総会 . 2013.5.31. 大分

2) Sakuma H. Acute encephalitis with refractory, repetitive partial seizures (AERRPS) / febrile infection-related epilepsy syndrome (FIRES): a multicenter study on 13 children. 30th International Epilepsy Congress. 2013.6.24. Montreal, Canada.

3) 佐久間啓 .亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) ウイルスは I 型インターフェロンによる抗ウイルス作用を回避する . 第 18 回日本神経感染症学会学術集会 . 2013.10.11. 宮崎 .

3 . その他の発表

なし

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

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

神経画像による急性脳症の診断・病態解析に関する研究

研究分担者 高梨 潤一 亀田メディカルセンター小児科
研究協力者 多田弘子 千葉県済生会習志野病院小児科

研究要旨

日本の小児に好発する acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion [AESD] では、急性期 MR spectroscopy (MRS) で Glutamine (Gln)+Glutamate (Glu) [Glx] が高値を呈し、興奮毒性仮説の一つの根拠となっている。脳内 Glx の上昇を MRS で検出することが可能かを検討するため、Glu transporter 1 (GLT1) CKO マウスの脳代謝を MRS で測定した。Gln の高値を認めたが、Glu は正常であった。MRS は Glx の脳内変動を検出可能である。

A. 研究目的

日本の小児に好発する acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion [AESD] では急性期に Glutamine (Gln)+Glutamate (Glu) [Glx] 高値が報告され、興奮毒性仮説の一つの根拠となっている。一方で脳内（髄液ないしシナプス間隙）Glu 濃度は $\mu\text{M/l}$ のスケールであり MRS で観察される mM/l 単位とは大きな隔たりがある。今回アストロサイトシナプス後膜での Glu 取り込みに重要な GLT1-CKO マウスを用い Glx 上昇が MRS で検出可能かを検討する。

B. 研究方法

対象は 20 週齢の正常マウス 1 匹と GLT-CKO マウス 1 匹である。放射線医学総合研究所にて動物実験研究承諾を得たのち、Bruker 社製 7 テスラ MR 装置を用いて T1, T2 強調画像、拡散強調画像、proton MRS (PRESS 法, TR=4000msec, TE=20msec, NEX 256, VOI=2x2x2mm or 3x3x3mm) を撮像した。MRS は LCModel を用い定量解析した。

C. 結果

GLT1 CKO マウスで wild マウスに比して Gln の高値を認めたが、Glu は正常であった。

D. 考察

AESD では Glx が急性期に高値を呈し、経時的に正常化することが報告されている。今回の GLT CKO マウスの検討から脳内 Glx 高値は MRS で検出可能であること、Gln の上昇が Glx 高値の本態と推定された。Glu は生体に有害であり、Glu を無害な Gln に変換する機構が働いていると考えられる。

E. 結論

Glu が関与すると想定される病態の検討に MRS は有用である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1) Takanashi J, Taneichi H, Misaki T, Yahata Y, Okumura A, Ishida Y, Miyawaki T, Okabe N, Sata T, Mizuguchi M. Clinical and radiological features of encephalopathy during 2011 E. coli O111 outbreak in Japan. *Neurology* in press.

- 2) Takanashi J, Osaka H, Saitsu H, Sasaki M, Mori H, Shibayama H, Tanaka M, Nomura Y, Terao Y, Matsumoto N, Barkovich AJ. Different patterns of hypomyelination and cerebellar abnormality between *POLR3A* and *POLR3B* mutations. ***Brain Dev*** in press.
- 3) Takanashi J, Nitta N, Iwasaki N, Saito S, Tanaka R, Barkovich AJ, Aoki I. Neurochemistry in Shiverer mouse depicted on MR spectroscopy. ***J Magn Reson Imaging*** in press.
- 4) Shiihara T, Miyake T, Izumi S, Sugihara S, Watanabe M, Takanashi J, Kubota M, Kato M. Serum and CSF biomarkers in acute pediatric neurological disorders. ***Brain Dev*** in press.
- 5) Kouga T, Iai M, Yamashita S, Aida N, Takanashi J, Osaka H. A child with three episodes of reversible splenial lesions. ***Neuropediatrics*** 2013; 44: 199-202.
- 6) Shinohara M, Saitoh M, Nishizawa D, Ikeda K, Hirose S, Takanashi J, 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: 1571-1576.
- 7) Yamamoto T, Sato H, Lai PS, Nurputra DK, Harahap NIF, Morikawa S, Nishimura N, Kurashige T, Tomohiko O, Nakajima H, Yamada H, Nishida Y, Toda S, Takanashi J, Takeuchi A, Tohyama Y, Kubo Y, Saito K, Takeshima Y, Matsuo M, Nishio H. Intragenic mutations in *SMN1* may contribute more significantly to clinical severity than *SMN2* copy numbers in some spinal muscular atrophy (SMA) patients. ***Brain Dev*** in press.
- 8) Lopez E, Thauvin-Robinet C, Reversade B, Khartoufi NE, Devisme L, Holder M, Ansart-Franquet H, Avila M, Lacombe D, Kleinfinger P, Kaori I, Takanashi JI, Le Merrer M, Martinovic J, Noël C, Shboul M, Ho L, Güven Y, Razavi F, Burglen L, Gigot N, Darmency-Stamboul V, Thevenon J, Aral B, Kayserili H, Huet F, Lyonnet S, Le Caignec C, Franco B, Rivière JB, Faivre L, Attié-Bitach T. *C5orf42* is the major gene responsible for OFD syndrome type VI. ***Hum Genet*** in press.
- 9) Tada H, Takanashi J. MR spectroscopy in 18q- syndrome suggesting other than hypomyelination. ***Brain Dev*** in press.
- 10) Miyake N, Koshimizu E, Okamoto N, Mizuno S, Ogata T, Nagai T, Kosho T, Ohashi H, Kato M, Sasaki G, Mabe H, Watanabe Y, Yoshino M, Matsuishi T, Takanashi J, Saitsu H, Yoshiura K, Matsumoto N, Niikawa N, et al. *MLL2* and *KDM6A* mutations in patients with Kabuki syndrome. ***Am J Med Genet*** 2013; 161: 2234-2243.
- 11) Yoneda Y, Haginoya K, Kato M, Osaka H, Yokochi K, Arai H, Kakita A, Yamamoto T, Otsuki Y, Shimizu SI, Wada T, Koyama N, Mino Y, Kondo N, Takahashi S, Hirabayashi S, Takanashi J, Okumura A, Miyatake S, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Matsumoto N, Saitsu H, et al. Phenotypic Spectrum of *COL4A1* Mutations: Porencephaly to Schizencephaly. ***Ann Neurol*** 2013; 73: 48-57.
- 12) Okumura A, Hayashi M, Shimojima K, Ikeno M, Uchida T, Takanashi J, Okamoto N, Hisata K, Shoji H, Saito A, Furukawa T, Kishida T, Shimizu T, Yamamoto T. Whole-exome sequencing of a unique brain malformation with periventricular heterotopia, cingulate polymicrogyria, and midbrain tectal

hyperplasia. *Neuropathology* 2013; 33: 553-560.

- 13) 高梨潤一. インフルエンザ脳症. 小児内科 2013; 45: 273-278.
- 14) 井上健、岩城明子、黒澤健司、高梨潤一、出口貴美子、山本俊至、小坂仁. 先天性大脳白質形成不全症—ゲノム解析から診断、治療への取り組み. 脳と発達 2013; 45: 122-126.
- 15) 高梨潤一. MRI, MR spectroscopyによる先天性大脳白質形成不全症の診断、病態解明. 脳と発達 2013; 45: 132-136.
- 16) 高梨潤一. 小児急性脳症の臨床と画像. 神経感染症 2013; 18: 68-73.

H . 知的所有権の取得状況

なし。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究研究事業）

分担研究報告書

患者 iPS 細胞を用いたてんかん性脳症の病態研究

研究分担者 廣瀬 伸一（福岡大学医学部小児科 教授）

研究要旨

重症・難治性急性脳症に Na^+ チャネルの 1サブユニットの遺伝子、*SCN1A* の変異が関係することが知られている。一方、多くの *SCN1A* の変異は Dravet 症候群を来す。このため、Dravet 症候群の病態を探り、治療法の開発のために、患者より人工多能性幹細胞（iPS）細胞を樹立した。その後、神経細胞、グリア細胞に誘導分化させることに成功した。分化神経細胞の多くは GABAergic であった。分化神経細胞の電気生理学的特性を解析したところ、活動電位の発火がコントロールに比べ減弱していた。すなわち、Dravet 症候群の病態が抑制系神経細胞の異常による事が明らかとなった。

A．研究目的

重症・難治性急性脳症に Na^+ チャネルの 1サブユニットの遺伝子、*SCN1A* の変異が関係することが知られている。一方、多くの *SCN1A* の変異は Dravet 症候群を来す。このため、Dravet 症候群の病態を探り、その治療法の開発のために、患者より人工多能性幹細胞（iPS）細胞を樹立した。その後、神経細胞に分化誘導させ、その病態を解析した。

B．研究方法

対象は、29歳の女性で、*SCN1A*にR1645Xのヘテロのナンセンス変異を持つ臨床典型的なDravet症候群を呈する患者である。

この患者から線維芽細胞を樹立後、山中4因子の導入より、iPS細胞二系統を樹立することに成功した。つぎに、分化誘導を行い神経細胞とグリア細胞を得た。*SCN1A*のプロモーターで発光する蛍光を指標に、カレントパッチクランプ法を用いて、神経細胞の電気生理学的特性を、健常者より同様の方法により樹立した神経細胞と比較した。（倫理面への配慮）本研究は福岡大学倫理委員会承認を受け実施した。また、患者両親に対して書面により説明し、書面にて同意を得て実施した。

C．研究結果

樹立した iPS 細胞は未分化状態が維持さ

れており、また奇形腫形成能を有しており、iPS細胞の要件を満たしていた。また、iPS細胞分化した神経細胞のいずれも、患者のSCN1Aの変異を保持していた。我々の実験条件下では分化した神経のほとんどはGABAergicの抑制ニューロンであった。また、Na⁺チャネルはAxon Initial Segmentに位置しており、生体内の局在に一致していた。電気生理学には、患者由来の神経細胞では、活動電位の発生が減弱していることが分かった。特に刺激として与えた電流を大きくすると、健常者由来の神経細胞との差が顕著となった。

D . 考察

実験の結果、Dravet症候群では、GABAergicの抑制系神経細胞の機能減弱により、相対的な神経興奮が起こり激しいてんかん発作が起こるものと考えられた。この病態は、マウスの相同遺伝子*Scn1a*遺伝子のノックイン動物で得られた所見と一致していた。また、Dravet症候群の患者ではNa⁺チャネルの抑制薬で、てんかん発作が悪化するが、この現象も本研究で明らかになった抑制系のGABAergic神経細胞の機能不全の病態から容易に説明できた。

E . 結論

SCN1Aの変異はDravet症候群の病態を、患者iPS細胞から分化させたヒト神経細胞を用いて明らかにした。その本態は抑制系のGABAergic神経細胞の機能不全であり、iPS細胞を利用することにより、病態に基づい

た治療法の開発が期待された。以上より、患者由来のiPS細胞を利用した病態研究とそれに続く治療法の開発は多くの神経疾患に応用可能で有用な手法になると思われる。

F . 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sasaki M, Ishii A, Saito Y, Morisada N, Iijima K, Takada S, Araki A, Tanabe Y, Arai H, Yamashita S, Ohashi T, Oda Y, Ichiseki H, Hirabayashi S, Yasuhara A, Kawawaki H, Kimura S, Shimono M, Narumiya S, Suzuki M, Yoshida T, Oyazato Y, Tsuneishi S, Ozasa S, Yokochi K, Dejima S, Akiyama T, Kishi N, Kira R, Ikeda T, Oguni H, Zhang B, Tsuji S, Hirose S. Genotype-phenotype correlations in alternating hemiplegia of childhood. *Neurology*. 2014;82(7): 564-572.
- 2) Higurashi N, Uchida T, Hirose S, Okano H. Current Trends in Dravet syndrome Research. *J Neurol Neurophysiol*. 2013 in press.
- 3) Sugawara T, Yoshida S, Onodera N, Wada K, Hirose S, Kaneko S. Detection of SCN1A mutations in patients with severe myoclonic epilepsy in infancy by custom resequence array. *Journal of Epileptology*. 2013 21:5-13.

- 4) Yamada J, Zhu G, Okada M, Hirose S, Yoshida S, Shiba Y, Migita K, Mori F, Sugawara T, Chen L, Liu F, Yoshida S, Ueno S, Kaneko S. A novel prophylactic effect of furosemide treatment on autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy (ADNFLE). *Epilepsy Res.* 2013;107(1-2):127-37. Epub 2013/09/21.
- 5) Shinohara M, Saitoh M, Nishizawa D, Ikeda K, Hirose S, Takanashi J, 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):1571-6. Epub 2013/03/29.
- 6) Sasaki M, Ishii A, Saito Y, Hirose S. Intermediate form between alternating hemiplegia of childhood and rapid-onset dystonia-parkinsonism. *Mov Disord.* 2013. Epub 2013/10/15.
- 7) Nakazawa M, Okumura A, Niijima S, Yamashita S, Shimono K, Hirose S, Shimizu T. Oral mexiletine for lidocaine-responsive neonatal epilepsy. *Brain Dev.* 2013;35(7):667-9. Epub 2012/11/28.
- 8) Nakamura Y, Shi X, Numata T, Mori Y, Inoue R, Lossin C, Baram TZ, Hirose S. Novel HCN2 Mutation Contributes to Febrile Seizures by Shifting the Channel's Kinetics in a Temperature-Dependent Manner. *PLOS ONE.* 2013;8(12):e80376. Epub 2013/12/11.
- 9) Migita K, Yamada J, Nikaido Y, Shi X, Kaneko S, Hirose S, Ueno S. Properties of a novel GABAA receptor $\gamma 2$ subunit mutation associated with seizures. *J Pharmacol Sci.* 2013;121(1):84-7. Epub 2012/12/22.
- 10) Ishii A, Yasumoto S, Ihara Y, Inoue T, Fujita T, Nakamura N, Ohfu M, Yamashita Y, Takatsuka H, Taga T, Miyata R, Ito M, Tsuchiya H, Matsuoka T, Kitao T, Murakami K, Lee WT, Kaneko S, Hirose S. Genetic analysis of PRRT2 for benign infantile epilepsy, infantile convulsions with choreoathetosis syndrome, and benign convulsions with mild gastroenteritis. *Brain Dev.* 2013;35(6):524-30. Epub 2012/10/18.
- 11) 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):467-71. Epub 2013/09/14.
- 12) Ishii A, Saito Y, Mitsui J, Ishiura H, Yoshimura J, Arai H, Yamashita S,

- Kimura S, Oguni H, Morishita S, Tsuji S, Sasaki M, Hirose S. Identification of ATP1A3 mutations by exome sequencing as the cause of alternating hemiplegia of childhood in Japanese patients. *PLOS ONE*. 2013;8(2):e56120. Epub 2013/02/15.
- 13) Inoue T, Kawawaki H, Kuki I, Nabatame S, Tomonoh Y, Sukigara S, Horino A, Nukui M, Okazaki S, Tomiwa K, Kimura-Ohba S, Inoue T, Hirose S, Shiomi M, Itoh M. A case of severe progressive early-onset epileptic encephalopathy: unique GABAergic interneuron distribution and imaging. *J Neurol Sci*. 2013;327(1-2):65-72. Epub 2013/02/21.
- 14) Inoue T, Ihara Y, Tomonoh Y, Nakamura N, Ninomiya S, Fujita T, Ideguchi H, Yasumoto S, Zhang B, Hirose S. Early onset and focal spike discharges as indicators of poor prognosis for myoclonic-astatic epilepsy. *Brain Dev*. 2013. Epub 2013/09/24.
- 15) Hirose S, Scheffer IE, Marini C, De Jonghe P, Andermann E, Goldman AM, Kauffman M, Tan NC, Lowenstein DH, Sisodiya SM, Ottman R, Berkovic SF, Genetics Commission of the International League Against E. SCN1A testing for epilepsy: application in clinical practice. *Epilepsia*. 2013;54(5):946-52. Epub 2013/04/17.
- 16) Higurashi N, Uchida T, Lossin C, Misumi Y, Okada Y, Akamatsu W, Imaizumi Y, Zhang B, Nabeshima K, Mori MX, Katsurabayashi S, Shirasaka Y, Okano H, Hirose S. A human Dravet syndrome model from patient induced pluripotent stem cells. *Mol Brain*. 2013;6:19. Epub 2013/05/04.
- 17) Higurashi N, Okano H, Hirose S. The effect of SCN1A mutations on patient-derived GABAergic neurons: what are the implications for future Dravet syndrome therapeutics? *Future Neurol*. 2013;8(5):487-9
- 18) Higurashi N, Nakamura M, Sugai M, Ohfu M, Sakauchi M, Sugawara Y, Nakamura K, Kato M, Usui D, Mogami Y, Fujiwara Y, Ito T, Ikeda H, Imai K, Takahashi Y, Nukui M, Inoue T, Okazaki S, Kirino T, Tomonoh Y, Inoue T, Takano K, Shimakawa S, Hirose S. PCDH19-related female-limited epilepsy: further details regarding early clinical features and therapeutic efficacy. *Epilepsy Res*. 2013;106(1-2):191-9. Epub 2013/05/29.
- 2, 学会発表
- 1) Ihara Y, Ishii A, Kaneko S, Hirose S. A genetic analysis of benign neonatal epilepsy in Japan. *International Symposium on Neonatal Seizures and Related disorders (ISNS) The 15th*

- Annual Meeting 2013.4.12-14/ Tokyo, Japan
- 2) Inoue T, Fujita T, Tomonoh Y, Ninomiya S, Nakamura N, Ideguchi H, Yasumoto S, Hirose S. Effects of lamotrigine on a patient with early myoclonic encephalopathy. International Symposium on Neonatal Seizures and Related disorders (ISNS) The 16th Annual Meeting 2013.4.12-14/Tokyo, Japan
- 3) Hirose S, Ihara Y, Ishii A. Frequency of Mutations of KCNQ2 and KCNQ3 in Benign Neonatal Epilepsy in Japan. Korean Epilepsy Congress 2013. 2013.6.13-15/Soul, Korea
- 4) Uchida T, Deshimaru M, Koyama S, Yanagawa Y, Hirose S. KCNQ2 mutation enhances firing activity of gabaergic interneurons in the hippocampus of neonatal mice. Korean Epilepsy Congress 2013. 2013.6.13-15/Soul, Korea
- 5) Nakamura Y, Shi X, Numata T, Mori Y, Inoue R, Hirose S. Electrophysiological analysis of mutant HCN channels found in febrile seizure patients. Korean Epilepsy Congress 2013. 2013.6.13-15/ Soul, Korea
- 6) Hirose S. Molecular basis of benign familial infantile epilepsy and related syndromes. 30th international Epilepsy Congress. 2013.6.23-27/ Montreal, Canada
- 7) Ihara Y, Ishii A, Kaneko S, Hirose S, The Epilepsy Genetic Study Group Japan. KCNQ2 and KCNQ3 abnormalities in benign neonatal epilepsy (BNE): a genetic analysis of BNE in Japan. 30th international Epilepsy Congress. 2013.6.23-27/ Montreal, Canada
- 8) Ishii A, Saito Y, Mitsui J, Ishiura H, Yoshimura J, Arai H, Yamashita S, Kimura S, Oguni H, Morishita S, Tsuji S, Sasaki M, Hirose S. Identification of ATP1A3 mutations by exome sequencing as the cause of alternating hemiplegia of childhood in Japan. 30th international Epilepsy Congress. 2013.6.23-27/ Montreal, Canada
- 9) Nakamura Y, Shi X, Numata T, Mori Y, Inoue R, Hirose S. Novel HCN2 mutation found in febrile seizure patients affects temperature sensitivity. 2013.9.4-7/ Hamamatsu, Japan.

H . 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

1. 特願 2008-031002 : てんかんモデル非ヒト哺乳動物
2. 特願 2008-273446 : 変異導入遺伝子およびそれを導入したノックイン非ヒト動物
3. 特願 2009-188152 : 注意欠陥/多動

性障害診断用モデル非ヒト動物

4. 特願 2010-60019: リーシークエンス DNA チップおよび最適抗てんかん薬決定方法

寄与した指針又はガイドライン等:

1. 廣瀬伸一. 遺伝学的診断マニュアル. 稀少難治てんかん診療マニュアル. 診断と治療社 2013:109-13.
2. 日暮憲道、廣瀬伸一. 女性に発症する PCDH19 関連てんかん. 稀少難治てんかん診療マニュアル. 診断と治療社. 2013:22-4.
3. Hirose S, Scheffer IE, Marini C,

De Jonghe P, Andermann E, Goldman AM, Kauffman M, Tan NC, Lowenstein DH, Sisodiya SM, Ottman R, Berkovic SF, Genetics Commission of the International League Against E. SCN1A testing for epilepsy: application in clinical practice. *Epilepsia*. 2013;54(5):946-52. Epub 2013/04/17.

2. 実用新案登録
なし

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

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

研究分担者 山内 秀雄（埼玉医科大学小児科 教授）

研究要旨

急性脳症における神経学的後遺症として運動機能障害などの他に、知的障害・発達障害などをはじめとする高次機能障害については画像化する方法に乏しかった。急性脳症に認められる高次機能障害の評価として安静時機能的磁気共鳴画像法（RS-fMRI）が有用であるかの予備実験を行った。

A. 研究目的

安静時機能的磁気共鳴画像法（以下 RS-fMRI）は安静時脳活動のゆらぎから脳内機能的結合の抽出し画像化する方法である。現在痴呆研究領域などにおいてその有用性が報告されている。これまでのところ海内外ともに小児・成人の急性脳症を対象とした研究報告はない。本研究は小児急性脳症に RS-fMRI を施行することによって、脳内機能的結合の異常について検討することが目的である。最終的には急性期の撮像も含めた形で施行することを目指す。まずは神経学的後遺症を認めた児に対して RS-fMRI を施行し、その有用性について考察することを目的とした。

B. 研究方法

当院入院外来で診療中の急性脳症の神経学的後遺症を有するけいれん重積型急性脳

症 3 名を対象とする。標準的 MRI 終了後に追加する形で RS-fMRI を施行する。

MRI 撮像装置は 3T MRI Skyra を使用し、撮像時間は約 7 分間、データ解析は東京大学医学系研究科分子脳病態科学林俊宏博士とともにを行い、データ解析方法は US-ADNI2 および HCP を使用する。

（倫理面の配慮）

MRI データは連結可能匿名化とし院外研究施設に移送される場合は匿名化された情報のみが送られることとし、個人情報保護に努める。

C. 研究結果

予備実験として本研究の実施場所である埼玉医科大学病院放射線科 MRI 室に設置された 3T MRI Skyra を用いて本報告者自身脳の RS-fMRI を施行し良好な画像描出を確認した。

D. 考察

小児急性脳症の RS-fMRI を画像化するためには、対象脳の fMRI 画像データを取得するとともに、年齢相当の標準脳が必要であり、また画像化までの統計学的手法の自動化(現在マニュアルで施行している)が必要である。本研究期間中には急性脳症患者の RS-fMRI 画像化までには至らなかった。

E. 結論

小児急性脳症を対象とする RS-fMRI 画像化をできるだけ早急に行い評価に役立てる必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし