

(資料4)

急性脳症の病態：急性脳症初期バイオマーカーおよびミトコンドリア病の急性期病態との類似性について

研究分担者 久保田雅也 (国立成育医療研究センター 神経内科医長)
研究協力者 寺嶋宙 (国立成育医療研究センター 神経内科医員)
柏井洋文 (東京大学 大学院生)
林雅晴 (東京都医学研究所 脳発達・神経再生研究分野 分野長)
田沼直之 (東京都立府中療育センター小児科 医長)

研究要旨

急性脳症において IL-33-IL33R 経路がどの程度初期病態成立に関与しているのかは不明であるが少なくとも一部の急性脳症の初期病態には IL-33-IL33R 経路を含む免疫反応が関与した可能性がある。また乳酸/ATP 比は急性脳症急性期では高値、回復期で正常化し、急性脳症との鑑別が常に問題となる熱性けいれん重積と比較すると有意差を持って高値であり発症初期の病態の違いを反映していた。またその値は重症例の予後とも相関した。急性脳症を起こした PDHC 欠損症男児の急性期 MRS 所見は一部発性拡散低下をともなう急性脳症 (AESD) と共通し glutamine 作動性神経が過度に興奮したための浮腫が考えられた。2008-2013 年で経年的にみると通常の脳症治療に加えた早期 3 剤 (VB1, VB6, L-カルニチン) 投与により AESD の割合が減少し軽症タイプの脳症の数が増加した。これらの投与が AESD の予防および軽症化に有効である可能性が考えられた。今回の 3 剤はミトコンドリアレスキューにもなっており興味深い。急性脳症の初期病変は血管内皮 (脳血管関門) を場とするミトコンドリア機能不全があり、ニューロンの障害はそれに引き続くものであるという我々の仮説を支持するものである。

A. 研究目的

急性脳症は我が国の小児に多く、各種のウイルス感染症を契機として急激に発症し、遷延する意識障害を特徴とする。その臨床像は多彩で重症の病型はしばしば難治で、予後も不良である。近年臨床像に加え MRI 所見を加味して細分類が進み、急性壊死性脳症 (ANE)、遅発性拡散低下をともなう急性脳症 (AESD) などの病態解析がなされつつある。病初期に

熱性けいれん重積との鑑別が困難で感度の高いバイオマーカーの検索が重要な課題となっている。この3年間で血中 ATP、乳酸、乳酸/ATP 比について急性脳症、熱性けいれん重積での解析を行い病初期バイオマーカーとしての有用性の検討を行った。また IL-1 family に属するサイトカインである IL33 の急性脳症バイオマーカーとしての検討も行った。また各種ミトコンドリア病における

ATP 等の解析も同様に行い急性脳症との病態の異同を検討した。急性脳症を発症したミトコンドリア病の経過を詳細に解析し、ミトコンドリア機能不全の意義を検討した。ミトコンドリアレスキューとしてのビタミン B1, B6, カルニチン投与の AESD に対する影響を評価し、治療上の意義を検討した。

B. 研究方法

①急性脳症と IL-33

IL-33 を測定した急性脳症の患者 10 名を表 1 に示す。血液採取後血清を -70 で凍結保存し AdipoGen 社 ELISA kit (AG-45A-0033TP-KI01) を用いて IL-33 を測定した (林、田沼)。

②急性脳症と血中 ATP, 乳酸

血中 ATP に関しては既報告の方法により木戸研究室において測定が行われた。乳酸は ATP 検体採取時に最も近い時刻の値を解析に用いた。

③ミトコンドリア病と急性脳症

症例 PDHC 欠損症 9 才男児。インフルエンザ感染に引き続き歩行障害、構語障害、意識変容をきたしたが糖、VB1,6、カルニチンに加え脂肪剤の投与で改善した。臨床経過を MRI, MRS 画像、ATP 測定等とあわせ検討した。

AESD に対する早期 3 剤 (ビタミン B1, B6, および L カルニチン) 投与

対象：基礎疾患がなく、有熱時けいれんで発症し、AESD の可能性が考慮されて発症早期より当院で対応し、結果的に急性脳症と診断された症例に限定すると(1)2008-2010 年 10 名と(2)2011-2013 年 11 名が該当した。後者 11 例には発症早期からビタミン B1, B6, および L カルニチン投与が行われていたが前者 10 例にはそれらの投与はなされていなかった。両群に男女比や発症月齢の差はなかった。両群で 2 相めのけいれん発作、MRI 画

像から AESD の発症の有無を比較検討した。

(倫理面への配慮)

研究及び研究結果の発表にあたっては、患者のプライバシー保護に十分配慮した。

C. 研究結果

①急性脳症と IL-33

図 1 に急性脳症 10 例の IL-33 の値を示す。10 例中 5 例で経過中 IL-33 が検出された。比較的后遺症の重い遅発性拡散低下をとともなう急性脳症 (AESD) では検出されず。検出されたのは比較的予後のよい急性脳症であった。

乳酸 / ATP 比について

図 2 に各疾患の乳酸 / ATP 比を示す。急性脳症 20 例の急性期 (5.65 ± 5.55) は熱性けいれん重積 16 例急性期 (1.65 ± 1.01) よりも有意に乳酸 / ATP 比は高値であった。また急性脳症急性期の乳酸 / ATP 比はミトコンドリア病 13 例のそれ (5.65 ± 5.85) と比較し有意差は認めず。

ミトコンドリア病と急性脳症

症例の急性期と回復期の MRI, MRS を図 3 に示す。急性期には MRI 上小脳歯状核に信号異常を認め、MRS では乳酸の上昇とともにグルタミン-グルタミン酸 (図中 Glx) の上昇を認め、回復期にはそれらは全て改善した。急性期には血中乳酸は 4.20mM, 回復期には 3.20mM, ATP 0.64mM, 乳酸 / ATP 比 5.02 であった。

AESD に対する早期 3 剤 (ビタミン B1, B6, および L カルニチン) 投与

これら 3 剤を投与しなかった

(1)2008-2010 年の 10 例のうち 6 例が 2 相目のけいれんを起こし AESD と診断された。
(2)2011-2013 年 11 例中 10 例は早期 3 剤投与を行い 2 相めのけいれんは起こらず MRI

画像変化もなく結果的に軽症脳症であった
(図4)

D. 考察

①急性脳症と IL-33

IL-33 は IL-1 family に属するサイトカインで Th2 タイプのサイトカインに関連した免疫反応に参与する。IL-33 は細胞内では転写因子として細胞外では NF- κ B を誘導する因子として働く。炎症性サイトカインとしての性質を持ち IL-33-IL33R 経路はウイルス感染の成立にも参与する。今回の IL-33 測定で比較的后遺症の重い遅発性拡散低下をとともなう急性脳症 (AESD) では検出されず比較的前後のよい急性脳症で検出されたことは AESD の発症機序が IL-33-IL33R 経路を介さないものであることを示唆する。IL-33 が検出された 5 例中 3 例は発症 2 日以内に検出され、1 例は発症後 5、7 日めに、1 例は発症 20 日めに検出されており、この IL-33-IL33R 経路がどの程度初期病態成立に参与しているのかは不明であるが少なくとも一部の急性脳症の初期病態には IL-33-IL33R 経路を含む免疫反応が参与した可能性がある。ステロイドパルス療法にもかかわらず軽度の後遺症を残していることは血管内皮由来の IL-33-IL33R 経路活性化の可能性がある。

乳酸 / ATP 比について

乳酸 / ATP 比は急性脳症急性期では高値、回復期で正常化した。また急性脳症との鑑別が常に問題となる熱性けいれん重積と比較すると有意差を持って高値であり発症初期の病態の違いを反映している。この値は重症例の予後と相関した。

乳酸 / ATP 比が急性脳症急性期と種々のミトコンドリア病の患者での値と有意差がなかったことはミトコンドリアを場とする共通の energy failure が起こっている可能性

を示唆する。

ミトコンドリア病と急性脳症

急性脳症を起こした PDHC 欠損症男児の急性期 MRS 所見 (乳酸の上昇とともにグルタミン-グルタミン酸 (図中 Glx) の上昇) は一部 AESD の急性期 MRI 所見と共通する。Glx のうち glutamate は興奮性の伝達物質であり、また astrocyte に存在し glutamin に代謝され浸透圧調節物質としても働く。glutamine 作動性神経が過度に興奮すると astrocyte に glutamine が過剰に蓄積し細胞性浮腫をきたす。急性脳症 (AESD) や PDHC 欠損症ではこの細胞性浮腫が共通していると思われる。両者ともにインフルエンザウイルスが引き起こしやすいことも共通の機序が想定される。

AESD に対する早期 3 剤 (ビタミン B1, B6, および L カルニチン) 投与

AESD の早期治療介入に関しては、ビタミン B6 投与、脳低温療法が報告されているが、現時点は早期診断が難しいことから、その介入効果の判断も難しい。通常の脳症治療に加えた早期 3 剤 (VB1, VB6, L-カルニチン) 投与により AESD の割合が減少し軽症タイプの脳症の数が増加した。AESD の予防および軽症化に有効である可能性が考えられた。今回の 3 剤はミトコンドリアレスキューにもなっており興味深い。

E. 結論

小児急性脳症の根本的な原因は不明なままであるが病態の中でミトコンドリア機能不全の可能性ががあることは (おそらくニューロンより先に) 今回の研究で明らかになり、AESD の病勢を緩和する治療もミトコンドリアレスキューとしての位置づけができるものであった。今後のより効率的な薬剤の知見集積が期待される。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

論文発表

1. 論文発表

- 1 Kubota M, Chida J, Hoshino H, Kashii H, Ozawa H, Koide A, Hoshino A, Koyama A, Mizuno Y, Yamaguchi M, Yao D, Yao M, Kido H. Thermolabile CPT II variants and low blood ATP levels are closely related to severity of acute encephalopathy in Japanese children. *Brain Dev* 2012;34:20-7.
- 2 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.* 2012;34:124-7. Epub 2011 May 14.
- 3 Hayashi M, Saito-Miwa N, Tanuma N, Kubota M. Brain vascular change in Cockayne syndrome. *Neuropathology* 2012;32:113-7.
- 4 Hoshino A, Saitoh M, Oka A, Okumura A, Kubota M, Saito Y, Takanashi JI, Hirose S, Yamagata T, Yamanouchi H, Mizuguchi M. Epidemiology of acute encephalopathy in Japan, with emphasis on the association of viruses and syndromes. *Brain Dev.* 2012;34:337-43. Epub 2011 Sep 15.
- 5 Saitoh M, Shinohara M, Hoshino H, Kubota M, Amemiya K, Takanashi JI, Hwang SK, Hirose S, Mizuguchi M. Mutations of the SCN1A gene in acute encephalopathy. *Epilepsia.* 2012; 53: 558-564.
- 6 Hachiya Y, Hayashi M, Negishi T, Atsumi S, Kubota M, Nishihara T. A Case of Osteogenesis Imperfecta Type II Caused by a Novel *COL1A2* Gene Mutation: Endoscopic Third Ventriculostomy to Prevent Hydrocephalus. *Neuropediatrics* 2012; 43(04): 225-228
- 7 Haga N, Kubota M, Miwa Z. 2013. Epidemiology of hereditary sensory and autonomic neuropathy type IV and V in Japan. *Am J Med Genet Part A* 2013;161A:871-4.
- 8 Shinohara, M, Saitoh, M, Nishizawa, D, Ikeda, K, Hirose, S, Takanashi, JI, Takita J, Kikuchi K, Kubota M et al. ADORA2A polymorphism predisposes children to encephalopathy with febrile status epilepticus. *Neurology.* 2013; 80: 1571-1576.
- 9 Kato M, Yamagata T, Kubota M, Arai H, Yamashita S, Nakagawa T, Fujii T, Sugai K, Imai K, Uster T, Chitayat D, Weiss S, Kashii H, Kusano R, Matsumoto A, Nakamura K, Oyazato Y, Maeno M, Nishiyama K, Kodera H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saito K, Hayasaka K, Matsumoto N, Saito H. Clinical spectrum of early onset epileptic encephalopathies caused by KCNQ2 mutation. *Epilepsia.* 2013 Apr 26. doi: 10.1111/epi.12200. [Epub ahead of print]
- 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-i, Shotelersuk V, Tekin M, Ochi N, Kubota M, Ito N, Ihara K, Hara T, Tonoki H, Ohta T, Saito K, Matsuo M, Urano M, Enokizono T, Sato A, Tanaka H, Ogawa A, Fujita T, Hiraki Y, Kitanaka S, Matsubara Y, Makita T, Taguri M, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saito H, Yoshiura K-i, Matsumoto N, Niikawa N. MLL2 and KDM6A mutations in patients with Kabuki syndrome. *Am J Med Genet* 2013;Part A 161A:2234–2243.
- 11 Nakamura K, Kodera H, Akita T, Shiina M, Kato M, Hoshino H, Terashima H, Kubota M et al. De Novo Mutations in *GNAO1*, Encoding a Gao Subunit of Heterotrimeric G Proteins, Cause Epileptic Encephalopathy. *The American Journal of Human Genetics*. 2013;93:1–10
- 12 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* 2014;36:489-95.
- 13 Ohba C, Kato M, Takahashi S, Lerman-Sagie T, Lev D, Terashima H, Kubota M, Kawawaki H, Matsufuji M, Kojima Y, Tateno A, Goldberg-Stern H, Straussberg R, Marom D, Leshinsky-Silver E, Nakashima M, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Miyake N, Tanaka F, Matsumoto N, Saito H. Early onset epileptic encephalopathy caused by de novo SCN8A mutations. *Epilepsia*. 2014 Jun 2. doi: 10.1111/epi.12668. [Epub ahead of print]
- 14 Nakashima M, Kashii H, Murakami Y, Kato M, Tsurusaki Y, Miyake N, Kubota M, Kinoshita T, Saito H, Matsumoto M. Novel compound heterozygous PIGT mutations caused multiple congenital anomalies-hypotonia-seizures syndrome 3. *Neurogenetics* 2014 DOI 10.1007/s10048-014-0408-y
- 15 Shimada S, Shimojima K, Okamoto N, Sangu N, Hirasawa K, Matsuo M, Ikeuchi M, Shimakawa S, Shimizu K, Mizuno S, Kubota M et al. Microarray analysis of 50 patients reveals the critical chromosomal regions responsible for 1p36 deletion syndrome-related complications. *Brain Dev* 2014 in press.
- 16 Saitoh M, Shinohara M, Ishii A, Ihara Y, Hirose S, Shiomi M, Kawaguchi H, Kubota M et al. Clinical and genetic features of acute encephalopathy in children taking theophylline. *Brain Dev* 2014 in press.
- 17 Tanuma N, Miyata R, Nakajima K, Okumura A, Kubota M, Hamano S, Hayashi M. Changes in Cerebrospinal Fluid Biomarkers in Human Herpesvirus-6-Associated Acute Encephalopathy/Febrile Seizures. *Hindawi Publishing Corporation Mediators of Inflammation* Volume 2014, Article ID 564091, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/564091>
- 18 Hoshino H, Kubota M. Canavan disease: Clinical features and recent

advances in research. *Pediatrics International* 2014;56:477-483.

- 19 Haga N, Kubota M, Miwa Z. Hereditary sensory and autonomic neuropathy types IV and V in Japan. *Pediatrics International*. 2015 (in press)

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

【特許取得】

なし

【特許出願】

なし

2. 学会発表

症例	診断	ステロイド	後遺症	IL-33 検出
1	急性脳症(分類不能)	mPSL 前	軽	+
2	MERS+横紋筋融解	mPSL 前	なし	+
3	急性脳症(分類不能)	mPSL 前	軽	+
4	急性脳症(分類不能)	mPSL 後	軽	+
5	急性脳症(HHV6)	mPSL 後	軽	+
6	急性脳症(マイコプラズマ)	mPSL 後	軽	-
7	AESD	mPSL 後	重	-
8	AESD	mPSL 前	重	-
9	AESD	-	軽	-
10	AESD	mPSL 前	重	-

表1 IL-33 を測定した急性脳症の10例

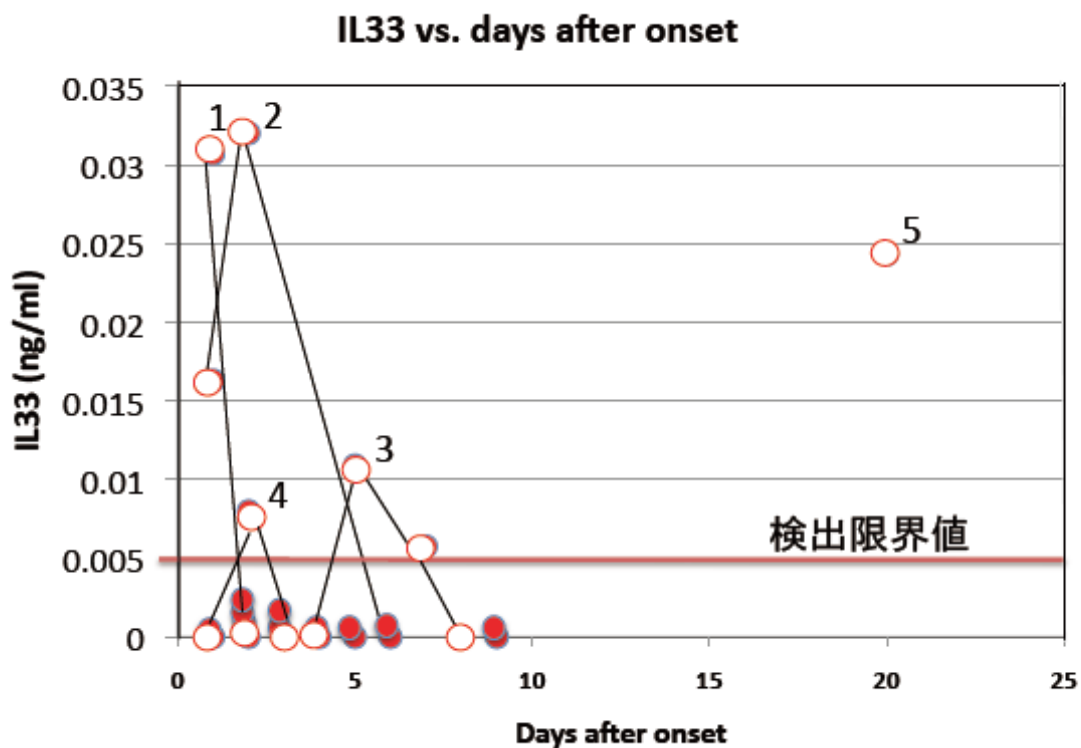


図1 急性脳症10例におけるIL-33の経時的変化。

肩番号は症例を示す（白抜きのは症例1-5、赤丸は症例6-10でいずれも検出限界値以下）。

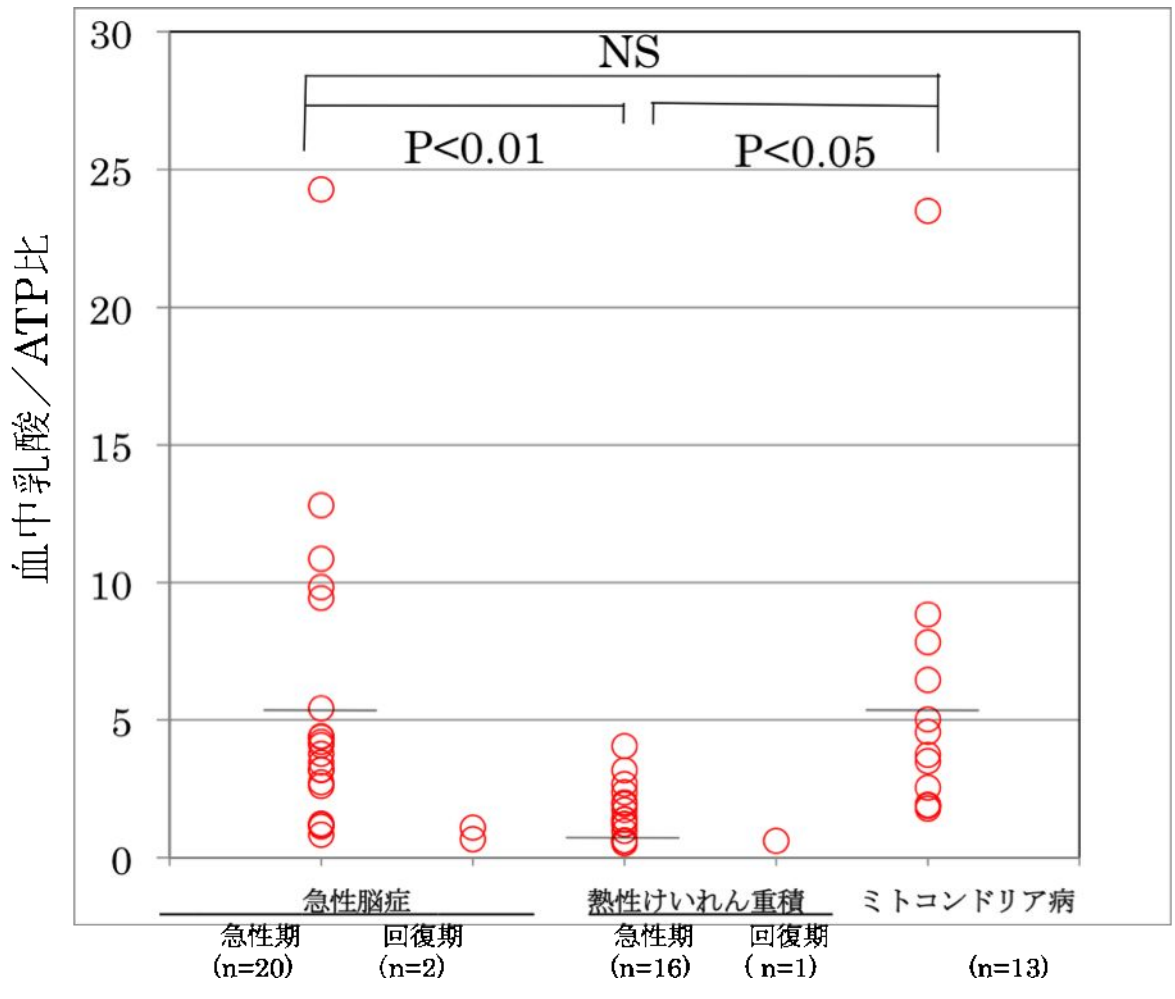


図2 各疾患の乳酸/ATP比

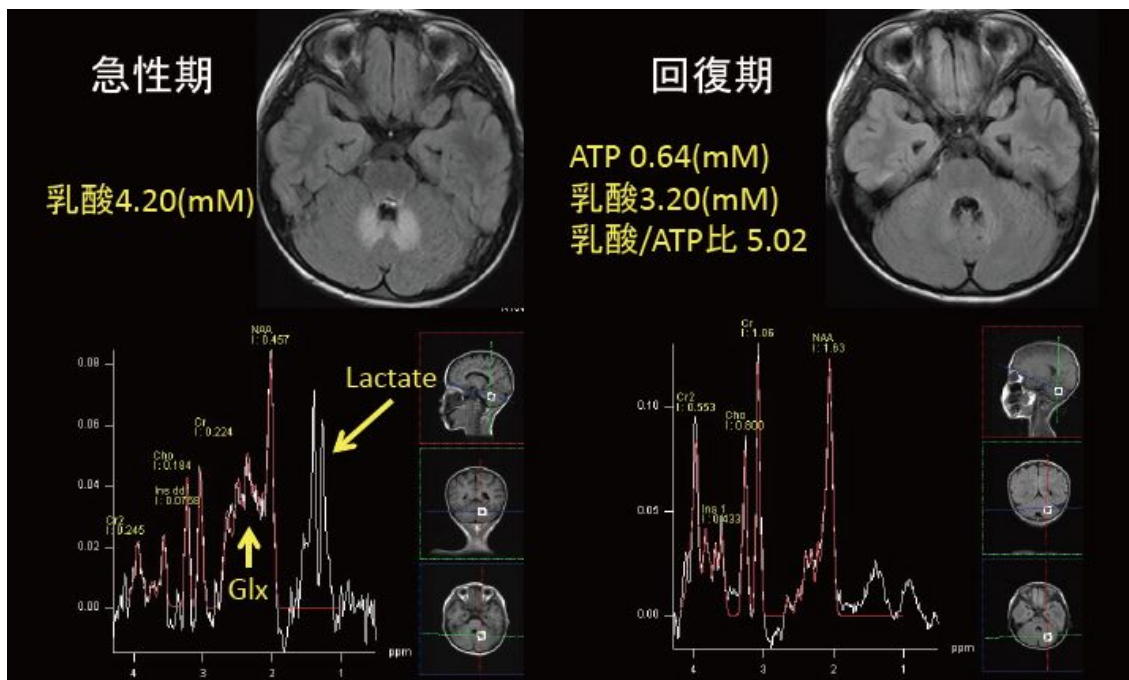


図3 PDHC欠損症9才男児。インフルエンザ感染による意識障害の急性期および回復期のMRI, MRS。急性期には小脳歯状核の病変、乳酸上昇(長矢印)、Glutamate-glutamin complex(Glx)の増加(短矢印)を認める。

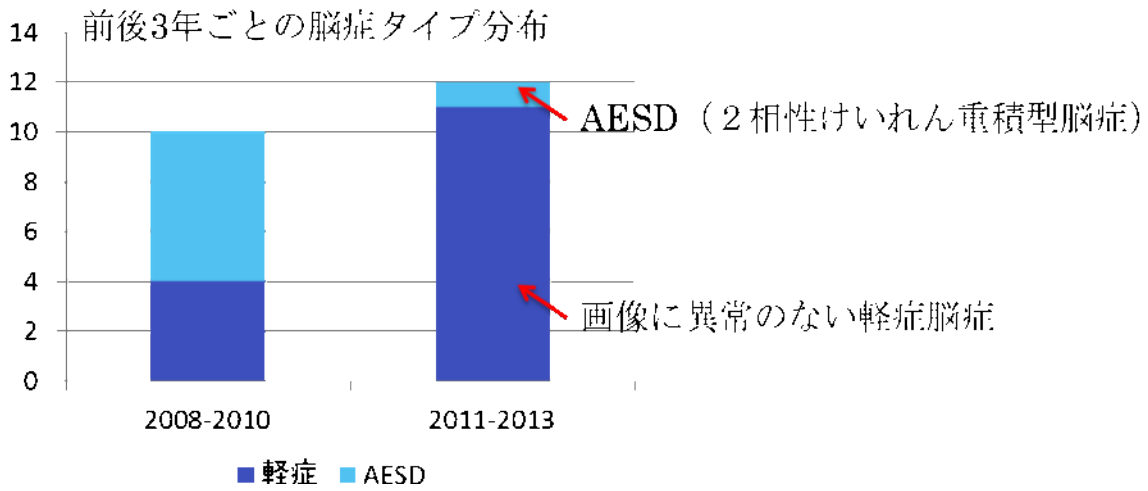


図4 2008-2010年および2011-2013年における脳症のタイプ別人数。早期3剤（VB1, VB6, L-カルニチン）投与を行った2011-2013年ではAESDが減少した。