

けいれん重積型脳症の早期診断のためのバイオマーカー検索と早期ステロイド治療の有効性に関する研究

研究分担者 山形 崇倫 自治医科大学医学部小児科学 教授
研究協力者：村山 圭 千葉県こども病院代謝科 部長
研究協力者：小島 華林 自治医科大学医学部小児科学 講師
研究協力者：池田 尚広 自治医科大学医学部小児科学 助教

研究要旨

1. 先天代謝異常症に併発する急性脳症、Reye 症候群の診療指針を作成した。
2. けいれん重積型脳症の早期診断と早期治療法開発のため、以下を実施した。
初回けいれん後 8 時間以上意識障害が遷延した例にステロイドパルス療法を、2011 年 6 月以降実施した。AESD 症例は 2011 年 6 月以前が 7.2% に対し、2011 年 6 月以降は 2.3% と有意に低下していた ($p=0.024$)。早期ステロイドパルス療法によって AESD の予防及び脳障害を軽減できる可能性があり、さらに解析継続中である。
早期診断のバイオマーカー同定のため、初回けいれん後早期の髄液で、AESD 発症した患者で変化している蛋白の同定を試みた。AESD で発現増加 6 蛋白、発現低下 4 蛋白を抽出し同定した。発現増加蛋白のうち 5 つは免疫グロブリン系だった。発現低下したのは、神経修復に関与する蛋白等で、早期診断のバイオマーカーとして有望と考えられ、他の患者の髄液で Western blot で解析したが、有意差なものは検出されなかった。
3. MRI で脳梁膨大部の拡散低下と小脳炎は、ロタウィルス胃腸炎に合併した例が 10/15 例と多かった。後遺症も 11/15 例と多い。後遺症なし 4 例中 2 例は早期にステロイドパルス療法を実施しており、有効である可能性も考えられる。

A. 研究目的

I. 先天代謝異常症に併発する急性脳症、Reye 症候群の診療指針

アミノ酸・有機酸代謝異常やミトコンドリア異常症などでは、感染などのストレスや基質となる物質の過量摂取などにより、代謝機構が破綻して、アシドーシス、低血糖、高乳酸血症や高アンモニア血症などを来し、意識障害を呈することがある。アスピリン等の薬剤も関連し、一部は Reye 症候群として、急激な脳症を発症する。これらの診断の手順を作成し、診断体制を確立することは重要な課題である。

II. けいれん重積型脳症の早期診断と治療介入法の検討

けいれん重積型脳症 (AESD) は、発熱に伴い、けいれん重積を起こした後に、一時的に意識状態が改善した後、2-4 日後に、再度けいれん発作や意識障害を起こす 2 相性の経過を取り、麻痺、知的障害やてんかんなどの後遺症を残すこ

とが多い疾患である。現時点では、二相性の経過を見ないと診断が困難である。2 回目のけいれん・意識障害の発症後に治療しても、予後の改善は得られず、1 回目のけいれんの後、早期に診断し、早期治療を行うことで、予後の改善が得られる可能性がある。そのために、初回けいれん後、早期に二相性の脳症の発症を予測するバイオマーカーが必要である。その、バイオマーカーの候補として、初回けいれん発症後早期に、髄液内で発現が変化している分子の同定が考えられる。また、発症機序と病態を解明するためにも、髄液内で変化している分子を同定することは重要である。

よって、我々は、早期治療介入の可能性として、初回けいれん後意識障害遷延例に対するステロイドパルス療法の効果を確認すると共に、初回けいれん後早期の髄液で、AESD 発症した患者で変化している蛋白の同定を試みた。

(1) AESD に対する早期ステロイドパルス療法の発症予防効果の検討

2011年6月以降、自治医大小児科では AESD の発症予防と予後の改善を目的に、発熱に伴うけいれん後、意識障害が遷延した例に早期ステロイドパルス療法を実施することとした。実施前後で熱性けいれん、軽度急性脳症、AESD の発症数を検討し、AESD に対する早期ステロイドパルス療法の効果を検討した。

(2) AESD の早期診断マーカー同定と病態解明のための髄液プロテオーム解析

以前、AESD の早期診断バイオマーカーの検索目的に、発症早期の髄液プロテオーム解析により網羅的蛋白発現解析を行った。今年度は、さらに解析を進め、他の患者で候補分子の発現解析を行った。

III. MERS病変で発症した小脳炎の検討

病初期は、意識障害と MRI で脳梁膨大部の拡散低下を呈し、数日後に小脳症状と MRI で小脳白質内側の拡散低下を呈した小脳炎症例を2例経験した。脳梁膨大部の拡散低下を呈する場合、可逆性の脳梁膨大部病変を有する脳炎脳症 (MERS) として予後良好なことが多いが、本例は2例とも後遺症を残した。同様の症例が近年報告されており、MERS 病変を呈する脳症の中でも注意すべき病態であり、既報告例を含め、治療・経過について検討した。

B. 研究方法

I. 先天代謝異常症に併発する急性脳症、Reye 症候群の診療指針

先天代謝異常症に併発する急性脳症、Reye 症候群について、各疾患毎の診断方法と治療法について、文献検索等から診療指針を作成する。

II. けいれん重積型脳症の早期診断と治療介入法の検討

(1) AESD に対する早期ステロイドパルス療法の発症予防効果の検討

(対象) 2008年1月～2016年7月までの8年6か月に、発熱に伴うてんかん重積状態(もしくは群発)のため当院に入院した382例(8か月～8歳 平均1.9歳、男:女220人:162人)を解析対象とした。明らかな脳浮腫、高サイトカイン血症を伴う症例、ADEM 他、脳炎を示唆する明らかな画像所見、髄液所見のある症例は除外した。

(方法) 2011年6月以降、以下の導入基準で早期ステロイドパルス療法を施行した。

来院時、JCS 20以上の意識障害を呈する症例
けいれん後意識障害が8時間以上遷延する症

例

意識障害が改善傾向のときは、12時間後に清明でない症例

ステロイドパルス療法は、mPSL 30mg/kg/dose (max 1g/dose) を1日1回、3日間点滴静注した。ヘパリン持続静注(100-150万単位/日)とH₂ blocker を併用した。明らかに意識清明になった場合は途中で中止した。

最終診断を以下の3群に分類し、解析した。

熱性けいれん複雑型: 発症から24時間以内に意識清明を確認。

軽度急性脳症: 発症から24時間以上、意識障害遷延したが、二相性の発作、脳MRI異常を認めない。

AESD: 二相性の発作が出現し、脳MRIで典型的な皮質下白質の高信号を認める。

(2) AESD の早期診断マーカー同定と病態解明のための髄液プロテオーム解析

(対象) 対象は、AESD 3例(年齢: 11か月～1歳3か月)で、比較対照として、一相性脳症3例(年齢: 11か月～2歳0か月)を用いた。初回痙攣後、10時間以内(2時間～10時間)の髄液を用い、2-Dimensional Fluorescence Difference Gel Electrophoresis (2D-DIGE) で蛋白を分離し、両群で発現量に差がある蛋白をmass spectrum (MS/MS analysis) で同定した。1回目は、AESD 2例を混合し赤に、一相性脳症2例を混合して緑とし、2回目は逆に、AESD 1例を緑、一相性脳症1例を赤にして泳動した。今回、それらの蛋白について、他のAESD患者3名を追加し、髄液での発現をWestern blot法で確認した。

III. MERS病変で発症した小脳炎の検討

脳炎を伴った脳梁膨大部病変を有する脳炎脳症の自験例2例と既報告例において、病因、経過、治療と予後について検討した。

(倫理面への配慮)

研究実施にあたっては、「急性脳症のプロテオーム解析を主体とした病因・病態解析」として自治医科大学遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認を得て実施した。また、ステロイド治療については、リスク等を説明して、またサンプル収集等の実施にあたっては、患者の親権者のインフォームドコンセントを得た。

C. 研究結果

I. 先天代謝異常症に併発する急性脳症、Reye 症候群の診療指針

先天代謝異常症やミトコンドリア異常症に

併発する急性脳症、Reye 症候群について、診療指針を作成して、「小児急性脳症診療ガイドライン 2016」に記載した。

II. けいれん重積型脳症の早期診断と治療介入法の検討

(1) AESD に対する早期ステロイドパルス療法の発症予防効果の検討

解析対象になった全 382 例中、最終診断として熱性けいれん複雑型 273 例、軽度急性脳症 94 例、AESD 15 例であった。

早期ステロイドパルス療法を計 51 例に実施した。パルス療法実施例の最終診断は、軽度急性脳症 47 例、AESD 4 例であった。パルス療法の開始時間はけいれん後 24 時間以内で、8~12 時間が 32 例、12~24 時間が 19 例であった。明らかな副作用はなかった。

熱性けいれんは毎年、30 例前後（22 例から 45 例）で、パルス施行前後で入院患者数に大きな差は無かった。軽度急性脳症発症数は、毎年 10 例前後であるが、パルス施行後に 17 例、21 例と多かった年があった。

全期間を通し、パルス実施したが AESD を発症した例は 4 例で、パルス非実施で AESD になったのは 11 例であった。

AESD 症例は 2011 年 6 月以前が 125 例中 9 例（7.2%）に対し、2011 年 6 月以降は 257 例中 6 例（パルス未実施も含む）（2.3%）と統計学的有意差を認めた（ $p=0.024$ ）。早期ステロイドパルス療法（24 時間以内）施行後、AESD を発症した 4 例中 2 例に重度の後遺症を認めた。発症 12 時間以内の超早期ステロイドパルス療法施行例は、AESD 発症は 1 例のみで後遺障害はなかった。

さらに症例を蓄積しており、29 年度にはパルス実施例でけいれん重積型脳症を発症した例もあった。一定数蓄積後に再度解析し、有効性を確認して行く。

(2) AESD の早期診断マーカー同定と病態解明のための髄液プロテオーム解析

2D-DIGE 解析結果、AESD で発現が増加していたスポット 6 か所、発現が低下していたスポット 4 か所で、蛋白を抽出して同定した。AESD で発現が増加していたスポット 6 か所中、5 か所は、Ig- 2 chain C region (1.3x)、Ig- 2 chain C region (1.4x)、Ig- 1 chain C region (1.5x)、Ig- chain V- region (1.3x)、Ig- chain V- region (1.3x) などの、免疫グロブリン系であった。もう一つの蛋白も、免疫系に関連す

る抗原で 2.5 倍上昇しており、早期診断のバイオマーカーとして有望と考えられた。また、AESD で発現が低下していたスポットは、免疫系、アポトーシスに関連する蛋白、グリア細胞から分泌され神経修復に関与する蛋白等で、一相性脳症では 1.3 倍から 3.6 倍増加していた。これらの蛋白について、他の患者の髄液での発現の差を解析した結果、両群間で発現の有意差は検出されなかった。

III. MERS 病変で発症した小脳炎の検討

当科の例

（症例 1）2 歳の女児。発熱（39）翌日（第一病日）複雑部分発作を群発し、意識障害も出現し入院した。GCS: E2V2M4、JCS: -3。髄液細胞数 231/mm³（単核 28/mm³、多核 203/mm³）、蛋白 39mg/dl、糖 66mg/dl。けいれん群発に対し、ミダゾラム(MDZ)とフォスフェニトイン静注し、ステロイドパルス療法開始。第 3 病日に頭部 MRI 上、脳梁膨大部病変あり。第 4 病日に複雑部分発作の重積出現。頭部 MRI で小脳病変あり。第 5 病日から、徐々に意識改善してきたが、第 6 病日には複雑部分発作出現。第 7 病日から徐々に発語、運動機能の改善を認めた。第 12 病日の MRI で小脳白質内側に DWI 低下が残存していた。発症 3 か月後で、軽度の運動機能の低下あり。

（症例 2）5 歳の女児。嘔吐と下痢が出現し、第 2 病日から間歇的な手の震えを繰り返す様になった。ロタウイルス陽性。第 4 病日に意識障害と下肢の強直反復し、当院転院。体温 38.0、GCS: E2V2M4、JCS: -200。髄液細胞数 145/mm³（単核 10/mm³、多核 135/mm³）、蛋白 44mg/dl、糖 81mg/dl。第 5 病日からステロイドパルス療法開始。頭部 MRI 上、脳梁膨大部病変あり。JCS -3 の意識障害が遷延。第 9 病日、頭部 MRI 上小脳病変あり。ステロイドパルス療法は 3 クール実施。第 33 病日以降、徐々に軽快。失調歩行と企図振戦があったが、発症 1 年 3 か月後（6 歳）で、知的レベルは境界域で、運動機能は正常。

（既報告例のまとめ）MERS + 小脳炎は、2003~2017 年で、13 例の報告あり。発症年齢 平均 3.3 歳（2-7 歳）で男女比 3:10。全例基礎疾患なし。発熱の病原体は、ロタウイルス 9 例、ムンプスウイルス 1 例、アデノウイルス 1 例、HHV6 ウィルス 1 例、RS ウィルス 1 例。感染症発症第 1-4 病日に意識障害(12/13)、痙攣(9/13)で発症。第 3-12 病日に無言、体幹失調、構音障害、測定障害等の小脳症状を呈していた。病初期(Day1-5)の MRI で MERS+白質病変、小脳病変が検出されていたが、小脳病変は MERS 病変出現 0 日から 6 日で、遅れて出現することもあった。後遺症として、MRI 上小脳萎縮(6/13 例)、構音障害(7/13 例)、体幹失調(2/13

例)、なし(4/13例)。後遺症なしは、ロタ(1/10)、ムンプス、HHV6、RS感染例。後遺症なし例におけるステロイドパルス療法開始時期は、小脳炎症状出現前2例、小脳炎症状出現後1例、治療時期不明1例であった。

D. 考察

I. 先天代謝異常症に併発する急性脳症、Reye症候群の診療指針

先天代謝異常症は多彩な疾患があり、食事療法や薬物療法などの治療法が開発されているものも多い。今後は、早期診断と治療介入のために、生化学的および遺伝学的診断体制の整備が重要である。

II. けいれん重積型脳症の早期診断と治療介入法の検討

(1) AESDに対する早期ステロイドパルス療法の発症予防効果の検討

早期ステロイドパルス療法実施後、熱性けいれん及び、軽度急性脳症例数は減少せず、AESDの発症頻度は統計学的有意差を持って減少した。さらに早期(12時間以内)にステロイドパルス療法を行った症例でAESDを発症したのは1例のみで、かつ後遺症がなかった。早期ステロイドパルス療法によってAESDの予防及び脳障害を軽減できる可能性がある。ただし、本研究は、二重盲検比較試験ではなく、一定の時期の前後で比較した解析であり、AESD数の推移については全国的な症例数の推移との関連を確認する必要がある。

(2) AESDの早期診断マーカー同定と病態解明のための髄液プロテオーム解析

これまで、AESDの中心病態は細胞興奮毒性と考えられていたが、最初のプロテオーム解析で同定された、ImmunoglobulinsなどのAESDで発現が変化している蛋白から、AESDにも炎症や抗原抗体反応などの免疫反応が関与している可能性が示唆された。よって、治療としては炎症を抑制するステロイド等の治療が妥当である。また、Microgliaの機能や神経修復に関連する蛋白の発現が低下していたことなどからは、細胞興奮毒性による細胞障害からの回復過程に異常があるために発症する可能性もある。

しかし、プロテオーム解析で検出された各蛋白に関して、他の患者で有意な変化は確認されなかった。その理由の一つとして、AESDの病因は多様で、同じカスケードの幾つかの分子の関与や、複数の分子機構が関与する可能性が推定

される。また、実験方法の問題として、プロテオーム解析は、髄液を濃縮し、蛋白量を合わせて実施したため、結果は、他の蛋白との相対的なものになった可能性がある。髄液をそのまま使用することは難しく、基準は、全サンプルを混合したものであり、基準をどうするかなど、方法を再検討の上、症例を追加し実施する。

III. MERS病変で発症した小脳炎の検討

MERS+小脳炎は、ロタウイルス胃腸炎に合併した報告が最も多かった(10/15例)。ロタウイルス関連脳症では、病初期MRIではMERS病変のみでも小脳炎等の後遺症を残す合併症に注意が必要である。自験例を含め、11/15例と多くの例で後遺症を残しているが、程度はさまざままで、長期経過で予後が改善する例もある。当科の症例2は、2か月以上失調症状が残存したが、1年後には運動面は正常になり、知的レベルも境界域になった。ステロイドパルス療法の効果は明らかでないが、後遺症なし4例中2例は早期にステロイドパルス療法を実施しており、早期治療が有効である可能性も考えられ、有効性の検証が必要である。ロタウイルスワクチン普及により減少することが期待されるが、他の病因でも発症しており、病態の解明が必要であり、また、小脳炎を来すリスク因子の同定と、早期診断のバイオマーカー検出が必要である。

E. 結論

先天代謝異常症に併発する急性脳症、Reye症候群の診療指針を作成した。

AESDにおいて、初回けいれん後の早期にステロイドパルス療法を実施することは、発症予防と軽症化に有効な可能性がある。また、初回けいれん後の髄液プロテオーム解析で、炎症の関与や神経修復機構の低下が示唆されたが、バイオマーカーとして有意な物質は確立できなかった。

MERS+小脳炎は、ロタウイルス胃腸炎の合併が多く、小脳炎所見は遅れることも多いため、ロタウイルス胃腸炎では、脳梁膨大部病変出現時も注意が必要である。ロタウイルスワクチン普及により減少することが期待されるが、他の病因でも発症しており、病態の解明と対応法が求められる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Miyachi A, Monden Y, Osaka H, Takahashi Y, Yamagata T. A case of anti-NMDAR

encephalitis presented hypotensive shock during plasma exchange. Brain Dev.2016;38:427-30.

2) Tada H, Takanashi J, Okuno H, Kubota M, Yamagata T, Kawano G, Shiihara T, Hamano S, Hirose S, Hayashi T, Osaka H, Mizuguchi M. Predictive score for early diagnosis of acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion (AESD). J Neurol Sci.2015;358:62-5.

3) Saitoh M, Shinohara M, Ishii A, Ihara Y, Hirose S, Shiomi M, Kawawaki H, Kubota M, Yamagata T, Miyamoto A, Yamanaka G, Amemiya K, Kikuchi K, Kamei A, Akasaka M, Anzai Y, Mizuguchi M. Clinical and genetic features of acute encephalopathy in children taking theophylline. Brain Dev.2015;37:463-70.

2. 学会発表

1) 桑島真理、長嶋雅子、中野祐子、門田行史、小坂仁、山形崇倫：急性脳症を反復した Sotos 症候群の 2 症例．第 57 回日本小児神経学会学術集会 2015 年 5 月 28 日

2) 小林 瑞、池田尚広、宮内彰彦、長嶋雅子、門田行史、小坂 仁、山形崇倫 早期ステロイドパルス療法によるけいれん重積型急性脳症発症予防効果の検討．第 59 回日本小児神経学会総会 2017 年 6 月 15 日大阪

G . 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし