

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・粟屋が提唱し、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/0111 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 $\mu\text{g/ml}$) 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

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。メチルプレドニゾロン・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, 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, 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

**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、菊也健二郎
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、菊也健二郎
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に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た。

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

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
水口雅	急性脳症, ライ症候群.	日本臨牀社	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	148-152
水口雅	ウイルス性脳炎・脊髄炎・髄膜炎概論.	日本臨牀社	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	日本臨牀社	東京	2013	529-535
水口雅	大腸菌.	日本臨牀社	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	日本臨牀社	東京	2013	774-778
高梨潤一	小児神経疾患.	日本磁気共鳴医学Proton MRSの臨床有用性検討会	Proton MRS の臨床有用性コンセンサスガイド 2013年度版	日本磁気共鳴医学会	東京	2013	36-48
高梨潤一	可逆性の脳梁病変を有する軽症脳炎脳症.	青木茂樹、阿部修、増谷佳孝、高原太郎	これでわかる拡散MRI 第3版	秀潤社	東京	2013	284-285
高梨潤一	二相性脳症・痙攣重積型急性脳症.	青木茂樹、阿部修、増谷佳孝、高原太郎	これでわかる拡散MRI 第3版	秀潤社	東京	2013	286-289
廣瀬伸一	てんかん.	日本小児神経学会教育委員会	小児神経学の進歩 第42集	診断と治療社	東京	2013	106-112

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
Sakai E, Yamanaka G, Kawashima H, Morishima Y, Ishida Y, Oana S, Miyajima T,	A case of recurrent acute encephalopathy with febrile convulsive status epilepticus with carnitine	Neuropediatric s	44(4)	218-221	2013
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	ADORA2A polymorphism predisposes children to encephalopathy with febrile status epilepticus.	Neurology	80(17)	1571- 1576	2013
Mizuguchi M.	Influenza encephalopathy and related neuropsychiatric	Influenza and Other Respiratory	7(Suppl 3)	67-71	2013
水口雅.	急性脳症—発症の遺伝的背 景—	Neuroinfection	18(1)	54-59	2013
Okumura A, Nakagawa S, Kawashima H, Morichi S, Muguruma T, Saito O, Fujimoto JI, Toida C, Kuga S,	Severe form of encephalopathy associated with 2009 pandemic influenza A (H1N1) in Japan.	Journal of Clinical Virology	56 (1)	25-30	2013
Okumura A, Nakagawa S, Kawashima H, Muguruma T, Saito O, Fujimoto J, Toida C, Kuga S, Imamura T,	Unexpected cardiopulmonary arrest associated with influenza: our experience during the 2009 pandemic in Japan.	Influenza and Other Respiratory Viruses	7 (5)	759-760	2013
Igarashi A, Okumura A, Kitamura Y, Jinbo K, Akatsuka S, Tanuma N,	Acute limbic encephalitis with focal hyperperfusion on single photon emission	Brain and Develoment	35 (2)	181-184	2013

Suganuma H, Okumura A, Kitamura Y, Shoji H, Shimizu T.	Effect of hypoxic-ischemic insults on the composition of fatty acids in the brain	Annals of Nutrition and Metabolism	62(2)	123-128	2013
Kubota T, Fukasawa T, Kitamura E, Magota M, Kato Y, Natsume J,	Epileptic seizures induced by dexmedetomidine in a neonate.	Brain and Development	35 (4)	360-362	2013
Hiraiwa-Sofue A, Ito Y, Ohta R, Kimura H, Okumura A.	Human herpesvirus 6-associated encephalopathy in a child	Neuropediatrics	44 (3)	155-158	2013
Nakazawa M, Okumura A, Niijima S, Yamashita S, Shimono K, Hirose S,	Oral mexiletine for lidocaine-responsive neonatal epilepsy.	Brain and Development	35 (7)	667-669	2013
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	Scandinavian Journal of Infectious Diseases	45 (6)	469-477	2013
Ishii A, Shioda M, Okumura A, Kidokoro H, Sakauchi M, Shimada S, Shimizu T,	A recurrent <i>KCNT1</i> mutation in two sporadic cases with malignant migrating partial seizures	Gene	531 (2)	467-471	2013
Hachiya Y, Uruha A, Kasai-Yoshida E, Shimoda K, Satoh-Shirai I, Kumada S, Kurihara E, Suzuki	Rituximab ameliorates anti-N-methyl-d-aspartate receptor encephalitis by removal of short-lived plasmablasts	Journal of Neuroimmunology	265(1-2)	128-130	2013
Sakuma H and Noto D, Takahashi K, Saika R, Saga R, Yamada M, Yonemura T, Mizuko	Development of a culture system to Induce microglia-like cells from hematopoietic cells	Neuropathology and Applied Neurobiology	in press		2014
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(2)	110-114	2013

Takanashi J, Taneichi H, Misaki T, Yahata Y, Okumura A, Ishida Y, Miyawaki T, Okabe N	Clinical and radiological features of encephalopathy during 2011 <i>E. coli</i> O111	Neurology	82(7)	564-572	2014
Kouga T, Iai M, Yamashita S, Aida N, Takahashi T, Ochi H	A child with three episodes of reversible	Neuropediatrics	44(4)	199-202	2013
Shiuhara T, Miyake T, Izumi S, Sugihara S, Watanabe M, Takayoshi I, Kubota M	Serum and CSF biomarkers in acute pediatric neurological disorders	Brain and Development	in press		2014
安元佐和、廣瀬伸一	治療における最近の新薬の位置づけ（薬効別）～新薬の広場～	医薬ジャーナル 新薬展望 2013	49(S-1)	273-277	2013
友納優子、廣瀬伸一	急性脳症における遺伝子解析	小児内科	45(2)	176-178	2013
石井敦士、廣瀬伸一	小児神経学の新たな展開 - ゲノム科学による病因不明・難治性小児神経疾患の	日本小児科学会雑誌	107(9)	1383-1388	2013
中村紀子、安元佐和、藤田貴子、友納優子、井原由紀子、二之宮信也、井手口	小児欠神てんかんと初期診断した 25 例の臨床経過と脳派所見	福岡大医紀要	40(3/4)	105-110	2013
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 M, Suzuki M, Yoshida T,	Genotype–phenotype correlations in alternating hemiplegia of childhood.	Neurology	82(6)	482-490	2014

Higurashi N, Uchida T, Hirose S, Okano H.	Current trends in Dravet syndrome research.	Journal of Neurology and Neurophysiolog	in press		2014
Sugawara T, Yoshida S, Onodera N, Wada K, Hirose S, Kaneko S.	Detection of <i>SCN1A</i> mutations in patients with severe myoclonic epilepsy in infancy by	Journal of Epileptology.	21	5-13.	2013
Yamada J, Zhu G, Okada M, Hirose S, Yoshida S, Shiba Y, Migita K, Mori F, Sugawara T, Chen L,	A novel prophylactic effect of furosemide treatment on autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy	Epilepsy Research	107(1-2)	127-137	2013
Sasaki M, Ishii A, Saito Y, Hirose S.	Intermediate form between alternating hemiplegia of childhood and rapid-onset	Movement Disorder	29(1)	153-154	2013
Nakazawa M, Okumura A, Niijima S, Yamashita S, Shimono K, Hirose S,	Oral mexiletine for lidocaine-responsive neonatal epilepsy.	Brain and Development	35(7)	667-669	2013
Nakamura Y, Shi X, Numata T, Mori Y, Inoue R, Lossin C, Baram TZ, Hirose S.	Novel <i>HCN2</i> Mutation Contributes to Febrile Seizures by Shifting the Channel's Kinetics in a	PLoS ONE.	8(12)	e80376	2013
Migita K, Yamada J, Nikaido Y, Shi X, Kaneko S, Hirose S,	Properties of a novel GABAA receptor $\gamma 2$ subunit mutation	Journal of Pharmacologic al Science	121(1)	84-87	2013
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	Genetic analysis of <i>PRRT2</i> for benign infantile epilepsy, infantile convulsions with choreoathetosis syndrome, and benign convulsions with mild	Brain and Development	35(6)	524-530	2013

Ishii A, Saito Y, Mitsui J, Ishiura H, Yoshimura J, Arai H, Yamashita S, Kimura S, Oguni H, Morishita S, Tsuji S,	Identification of <i>ATP1A3</i> mutations by exome sequencing as the cause of alternating hemiplegia of childhood in Japanese	PLoS ONE	8(2)	e56120	2013
Inoue T, Kawawaki H, Kuki I, Nabatame S, Tomonoh Y, Sukigara S, Horino A, Nukui M, Okazaki S, Tomiwa K,	A case of severe progressive early-onset epileptic encephalopathy: unique GABAergic interneuron distribution	Journal of Neurological Science	327(1-2)	65-72	2013
Inoue T, Ihara Y, Tomonoh Y, Nakamura N, Ninomiya S, Fujita T, Ideguchi H,	Early onset and focal spike discharges as indicators of poor prognosis for	Brain and Development	in press		2014
Hirose S, Scheffer IE, Marini C, De Jonghe P, Andermann E, Goldman AM, Kauffman M, Tan NC,	Genetics Commission of the International League Against Epilepsy. <i>SCN1A</i> testing for epilepsy: application in clinical	Epilepsia	54(5)	946-952	2013
Higurashi N, Uchida T, Lossin C, Misumi Y, Okada Y, Akamatsu W, Imaizumi Y, Zhang B, Nabeshima K, Mori MX, Katsurabayashi S.	A human Dravet syndrome model from patient induced pluripotent stem cells.	Molecular Brain	6	19	2013
Higurashi N, Okano H, Hirose S.	The effect of <i>SCN1A</i> mutations on patient-derived GABAergic neurons: what are the implications for future Dravet	Future Neurology	8(5)	487-489	2013

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,	<i>PCDH19</i> -related female-limited epilepsy: further details regarding early clinical features and therapeutic efficacy.	Epilepsy Research	106(1-2)	191-199	2013
---	---	----------------------	----------	---------	------

