

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591518

研究課題名(和文)自然免疫および自己免疫の解析による小児の急性脳症の病態解明

研究課題名(英文)Analysis of pathogenesis of acute encephalopathy in children

研究代表者

奥村 彰久 (Okumura, Akihisa)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：60303624

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：近年、急性脳症における抗神経抗体の関与が注目されているが、そ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比較した。自己免疫性機序の関与が疑われる急性脳症16例について、Immunoblot (IB)・ラット脳組織免疫組織染色(ラットIHC)・ヒト脳組織免疫組織染色(ヒトIHC)の3つの方法で抗神経抗体の検出を行った。IBでは5例、ラットIHCでは11例、ヒトIHCでは10例において、抗神経抗体の存在が示唆された。それぞれの結果は必ずしも一致するとは限らなかった。今回の結果では、感度ではIHCがIBに優るが、抗神経抗体の検出には複数の方法を組み合わせる必要があると思われた。

研究成果の概要(英文)：Autoimmune process is presumed to contribute in acute encephalopathy in children. However, the methods for detecting autoantibodies have not been established. We measured serum autoantibodies in children with acute encephalopathy using several different methods. The subject of this study is 16 children with acute encephalopathy suspected to have autoimmune encephalopathy. We measured autoantibodies using the following methods: 1) immunoblot using prepared membrane with human brain derived proteins (IB), 2) immunohistochemical studies using rat brain tissue (rat IHC), 3) immunohistochemical studies using control human brain tissue (human IHC). Autoantibodies were detected in 5 children by IB, 11 by rat IHC, and 10 by human IHC. The results of examinations were not always consistent among methods of measurement. Our study revealed that IHC will be more sensitive than IB. However, the detection of autoantibody should be made in combination of several detection methods.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：自己免疫 抗神経抗体 急性脳症 免疫組織化学染色法 辺縁系脳炎 基底核脳炎

## 1. 研究開始当初の背景

小児の急性脳症は死亡することや重度の神経学的後障害を残すことが稀でなく、その病態や治療法を解明することが強く望まれている。小児の急性脳症の発症機構については様々な研究がなされてきた。高サイトカイン血症・興奮毒性・自己抗体の産生などの関与が仮説として提唱され、急性脳症の一部ではそれを支持する所見が得られつつある。急性壊死性脳症やインフルエンザ関連脳症では、複数の研究者が血清中および髄液中の IL-6 や TNF $\alpha$  の著明な増加を報告している。これらの結果は急性脳症にいわゆるサイトカインストームが関与していることを強く示唆する。二相性けいれんと遅発性拡散脳低下を伴う急性脳症 (AESD) では、発症時のけいれん重積が特徴的である。また、MR スペクトロスコピーを用いる研究で、脳組織中のグルタミン酸の上昇が示唆されている。このことは、AESD ではけいれん重積によって惹起された興奮毒性が二次的に脳障害を起こすという仮説を支持する。しかし、実際には急性壊死性脳症の患者の血清および髄液中のサイトカイン値は必ずしも著しい高値を呈するとは限らない。一方、AESD の患児でも著しい血清サイトカイン上昇を認めた報告もある。これらの事実は、複数の発症機構が複雑に関係しながら急性脳症を起こしていることを示唆する。このように、現在まで小児の急性脳症の発症機構は十分に明らかになっておらず、早期診断法も未だ解明されていない。

近年、自己抗体が関与する急性脳炎・脳症の研究が進展し、成人においては様々な亢神経抗体の存在とそれが引き起こす神経症状との関係が明らかになりつつある。成人の自己免疫性脳炎では、数週間かけて亜急性に増悪する意識障害と難治性のけいれんが発症後早期の特徴的な所見として知られている。小児においても、同様の特徴を持つ患児が散見され、成人と同様に自己抗体 (抗神経抗体) の関与が注目されている。頻発する難治性部分発作を伴う急性脳症 (AERRPS) は、亜急性に発症して急速に増悪する意識障害と薬剤抵抗性のけいれんが特徴であるが、これらの臨床的特徴は成人の自己免疫性脳炎との共通点が多い。また、小児でも精神症状で発症し徐々に進行する意識障害を伴う急性脳症の報告が散見されるが、このような特徴は成人の自己免疫性辺縁系脳炎の特徴と類似している。これらの事実は小児の急性脳炎・脳症に自己免疫が関与していることを示唆する。しかし、現在までのところ小児の急性脳炎・脳症における自己免疫の研究は十分に進んでおらず知見の集積が必要である。

これらの知見から我々は、自己免疫に着目した解析が小児の急性脳炎・脳症の病態解明やバイオマーカーの確立に重要であると考え、研究を行った。

## 2. 研究の目的

成人では、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自己免疫の関与の報告が相次ぎ、抗神経抗体の解析が進んでいる。小児においても、亜急性の経過で意識障害や治療抵抗性の痙攣を認めたり、先行する精神症状を伴ったりするなど、成人の自己免疫性脳炎と類似した症例が散見される。これらの自己免疫性機序の関与が疑わしい急性脳炎・脳症は、画像では明らかな異常を認めることは例外的であり、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ため、診断は困難である。

したがって、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。欧米では成人の抗神経抗体の検出は cell-based assay がスタンダードになっており、それに基づく診断や病態の解析が進んでいる。しかし、日本では cell-based assay を施行できる施設はほとんどない。また、cell-based assay は抗原特異的な抗体を検出する方法であり、標的となるタンパクが同定されていない場合には、適用することができない。このような状況を考えると、現時点では小児においては抗神経抗体の検出は極めて困難であると言わざるを得ない。したがって、cell-based assay 以外の抗神経抗体の検出法の確立が必要である。Cell-based assay に代わ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、これらの複数の検出法を比較した報告はほとんどない。

我々は、小児における至適な亢進蛍光体の検出法を明らかにするために、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行いその結果を比較した。

## 3. 研究の方法

抗神経抗体の関与が疑われた 16 例の小児の急性脳炎・脳症を対象とした。

対象となった症例は、以下の条件を満たしていた。

- 1) 精神症状や不随意運動が先行する
- 2) 治療抵抗性のけいれんを認める
- 3) ステロイドパルス療法やガンマグロブリン大量療法により改善する。
- 4) 頭部 MRI で明らかな病変を認めない

また、脳血流シンチグラムやポジトロンエミッション CT などの脳機能画像における血流増加などの炎症の存在を示唆する所見を数例で認めた。

これらの臨床経過や検査所見から、臨床的に自己免疫性機序の関与を疑った 16 症例において、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メンブレン (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。正常コントロールを同時に反応させ、正常コントロールにみられないバンドが染色された場合を陽性と判定した。

## 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。染色の有無は目視で判断した。陽性例を図 1 に示す

## 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 倍に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。染色の有無は目視で判断し、染色された細胞の種類とその部位を記録した (図 1)。なお、対照となるヒト脳切片は、中枢神経疾患以外で死亡した症例のものを用いた。これらの脳組織は東京都総合医学研究所に保存されていたものであり、倫理委員会の承認を得て用いたものである。

なお本研究では、意識障害の出現前に精神症状が顕著であった例を辺縁系脳炎と、不随意運動が顕著であった例を基底核脳炎と分類した。

## 4. 研究成果

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。

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

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。染色さ

れたバンドに相当する抗原タンパクの分子量は 30~45 kDa に該当するものが多く、共通の標的分子が存在する可能性が示唆された。

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。辺縁系脳炎では核に加えてニューロピルが染色されることが多く、基底核脳炎では核のみが染色されることが多かった。この結果は、この 2 群では標的となる抗原タンパクが異なることが示唆され、その相違が神経症状の相違として表現されている可能性があると思われる。

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、海馬 4 例・基底核 3 例・大脳皮質 3 例などであった。辺縁系脳炎では海馬が染色されることが比較的多く、基底核脳炎では基底核が染色されることが比較的多かった。これらの結果は、抗体の結合部位と神経症状との間に関連があることを示唆する。

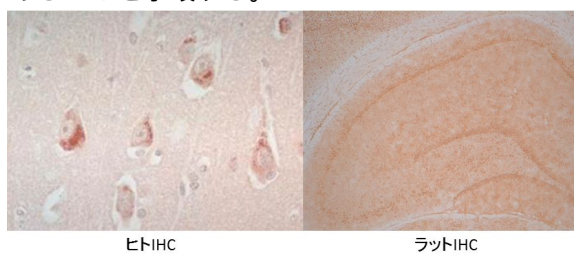


図 1

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。前述したように、小児の自己免疫脳炎・脳症については標的となる抗原が明らかになっていない。) IB は特定のエピトープを標的としないため、未知の標的タンパクに対する抗体を検出する可能性がある。また、IB では抗体が単クローン性なのか、多クローン性なのかを判別できる可能性がある。さらに、免疫組織染色法での抗体の結合部位や immunoblot で結合したタンパクの分子量をもとに標的タンパクの同定ができる可能性がある。これらの利点があるため、IB は小児の自己免疫脳炎・脳症においては有用であると推定される。しかし、IB に使用するメンブレンの作成過程で、タンパクを変性させる処理を行う必要がある。したがって、抗原分子の立体構造が生体内のそれとは異なってしまうことにより抗原性が変化し、その結果として抗体の検出感度が劣る結果になった可能性がある。より良い条件で抗原タンパクをメンブレン上に展開することが可能になれば、IB の有用性が増すと思われる。

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、2種類の動物種の脳組織を用いても、抗体を検出できない症例が存在した。IHCでもIBと同様に組織の固定の過程でタンパクの変性がおきることが避けることができない。特に、ヒト脳切片については組織を得るまでにある程度以上の時間が必要であり、死後変化を避けることができない。これらの結果から、標的となるタンパク分子の立体構造が生体内とは異なってしまうことによって抗原性が失われることを避けることができない。切片の作成過程の特性からIHCではIBよりはタンパク分子の立体構造の変化は軽度であると予想されるが、それでもなお抗原を検出する感度が低下すると推測される。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。種によって脳に発現しているタンパクに相違があることは、十分予想できることである。したがって抗神経抗体の検出のためにIHCを用いる場合には複数の動物種を用いることが必要であり、可能であればヒトの標本を用いることが抗体検出感度を高めると思われた。

また、IHCでは染色された部位により、病原性が異なる可能性を念頭に置かねばならない。成人の辺縁系脳炎では抗体はシナプスが多く集積しているニューロピルに結合し、細胞体や核には結合しない。これは、成人の辺縁系脳炎の標的となるタンパクがシナプスに発現しており、細胞体や核に発現していないことと合致する。抗神経抗体が血液内で産生されるのであれば、その標的タンパクが核や細胞体にあるとは考えにくい。したがって、IHCによって染色された場合でも、それが本当に病原性を反映しているか否かについては、慎重な議論が必要である。一般に、抗体の振る舞いは生体内と試験管内では異なっていることが古くから知られている。理論的な予想と実際に起きる現象とは必ずしも単純に一致するとは限らないのが、自己免疫疾患の病態解明の困難さの一因である。

成人では抗神経抗体の標的となるタンパクが複数同定されており、標的タンパクと臨床症状との関係の解明が進んでいる。抗神経抗体の標的タンパクが小児でも同じであるかは未だ明らかになっていない。抗神経抗体のスタンダードであるcell-based assayは標的となるタンパクに特異的な抗体を検出する方法であるため、未知のタンパクが標的である場合には適用することができない。したがって、小児の急性脳炎脳症においては、網羅的な抗体の検出を試みる必要がある。今回我々が施行した方法はそれぞれ長所と短所とがあり、複数の方法を相互補完的に使用することが良いと思われる。

今回の研究では、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て総合的に判断することが必要と思われる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計30件)

- 1) Okumura A, et al. (11名省略、1番目) Unexpected cardiopulmonary arrest associated with influenza: our experience during the 2009 pandemic in Japan. *Influenza Other Respi Viruses* 2013; 7: 759-760. 査読有り.
- 2) Okumura A, et al. (12名省略、1番目) Severe form of encephalopathy associated with 2009 pandemic influenza A (H1N1) in Japan. *J Clin Virol* 2013; 56: 25-30. 査読有り.
- 3) Okumura A, Hayashi M, et al. (12名省略、1番目) Whole-exome sequencing of a unique brain malformation with periventricular heterotopia, cingulate polymicrogyria and midbrain tectal hyperplasia. *Neuropathology*. 2013; 33: 553-560. 査読有り.
- 4) Igarashi A, Okumura A, Hayashi M, et al. (5名省略、2番目) Acute limbic encephalitis with focal hyperperfusion on single photon emission computed tomography. *Brain Dev* 2013; 35: 181-184. 査読有り.
- 5) Kidokoro H, Kubota T, Hayakawa M, Kato Y, Okumura A. Neonatal seizure identification on reduced channel EEG. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2013; 98: F359-361. 査読有り.
- 6) Nakano T, Okumura A, et al. (6名省略、2番目) Safety evaluation of laninamivir octanoate hydrate through analysis of adverse events reported during early post-marketing phase vigilance. *Scand J Infect Dis.* 2013; 45: 469-477. 査読有り.
- 7) Okumura A, et al. (14名省略、1番目) Acute encephalopathy in children with Dravet syndrome. *Epilepsia.* 2012; 53: 79-86. 査読有り.
- 8) Okumura A, et al. (8名省略、1番目) Acute encephalopathy with 2009 pandemic flu: Comparison with seasonal flu. *Brain Dev* 2012; 34: 13-19. 査読有り.
- 9) Miyata R, Hayashi M, Okumura A, et al. (8名省略、7番目) Oxidative stress in patients with clinically mild encephalitis/encephalopathy with a reversible splenial lesion (MERS). *Brain Dev* 2012; 34: 124-127. 査読有り.
- 10) Kawashima H, Okumura A, et al. (3名

- 省略、3番目) National survey of pandemic influenza A (H1N1) 2009-associated encephalopathy in Japanese children. J Med Virol 2012; 84: 1151-1156. 査読有り .
- 11) Hayashi N, Okumura A, et al. (7名省略、2番目) Prognostic factors in acute encephalopathy with reduced subcortical diffusion. Brain Dev 2012; 34: 632-639. 査読有り .
- 12) Kawashima H, Okumura A, et al. (3名省略、3番目) Treatment of pandemic influenza A (H1N1) 2009-associated encephalopathy in children. Scand J Infect Dis 2012; 44: 941-947. 査読有り .
- 13) Okumura A, et al. (11名省略、1番目) Deaths associated with pandemic (H1N1) 2009 among children, Japan, 2009-2010. Emerg Infect Dis 2011; 17: 1993-2000. 査読有り .
- 14) Okumura A, et al. (4名省略、1番目) Acute encephalopathy in a child with secondary carnitine deficiency due to pivalate-conjugated antibiotics. Pediatr Infect Dis J 2011; 30: 92. 査読有り .
- 15) Okumura A, et al. (6名省略、1番目) Amplitude-integrated electroencephalography in patients with acute encephalopathy with refractory, repetitive partial seizures. Brain Dev 2011; 33: 77-82. 査読有り .
- 16) Kato T, Okumura A, Hayakawa M, et al. (3名省略、2番目) Amplitude-integrated electroencephalography in preterm infants with cystic periventricular leukomalacia. Early Hum Dev 2011; 87: 217-221. 査読有り .
- 17) Kubota T, Okumura A, et al. (6名省略、8番目) Chronological diffusion-weighted imaging changes and mutism in the course of rotavirus-associated acute cerebellitis/cerebellopathy concurrent with encephalitis/encephalopathy. Brain Dev 2011; 33: 21-27. 査読有り .
- 18) Kato T, Okumura A, et al. (4名省略、2番目) Transient and mild reduction of consciousness during febrile illness in children. Neuropediatrics 2011; 42: 183-187. 査読有り .
- [学会発表](計30件)
- 1) Akihisa Okumura, et al. 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、2013年10月11日、北九州 .
- 2) 奥村彰久、他 . 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、2013年7月15日、横浜 .
- 3) Akihisa Okumura, et al. Attitude toward Epilepsy after Media Coverage of Car Accidents Related to Persons with Epilepsy in Japan. 30th International Epilepsy Congress, 2013年6月24日、Montreal .
- 4) Akihisa Okumura, et al. Whole-exome sequencing identifies FLNB variant in a unique brain malformation. 第55回小児神経学会総会、2013年5月30日、大分 .
- 5) 奥村彰久、他 . 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、2013年4月20日、広島 .
- 6) Okumura, et al. PRRT2 Mutation in Japanese Children with Benign Infantile Epilepsy. The 16th Annual Meeting of American Epilepsy Society, 2012年12月2日、San Diego .
- 7) 奥村彰久 . 新生児および乳幼児の発作 - aEEGによる評価 - . 第46回日本てんかん学会、2012年10月10日、東京 .
- 8) Akihisa Okumura. Neonatal EEG in determining risk to the preterm brain. Joint congress of the 12th International Child Neurology Congress and the 11th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology, 2012年6月1日、Brisbane .
- 9) Akihisa Okumura, et al. Autoimmune encephalitis proven by immunohistochemical study. 第54回日本小児神経学会総会、2012年5月17日、札幌 .
- 10) 奥村彰久、他 . アトキンス食に伴う成長障害 . 第115回日本小児科学会学術集会、2012年4月19日、福岡 .
- 11) 奥村彰久、他 . 新生児発作・新生児発作様イベントの症状型分類の実証的検討 . 第56回日本未熟児新生児学会学術集会、2011年11月14日、東京 .
- 12) 奥村彰久、他 . 2番染色体長腕の微小重複を伴う難治性新生児てんかんの1例 . 第45回日本てんかん学会総会、2011年10月6日、新潟 .
- 13) Akihisa Okumura. Neonatal seizures and epilepsy. 29th International Epilepsy Congress, 2011年9月1日、Rome .
- 14) 奥村彰久、他 . 2009 Pandemic Flu A (H1N1)小児死亡例の実態調査 . 第114回日本小児科学会学術集会、2011年8月14日、東京 .
- 15) 奥村彰久、他 . 2009 Pandemic Flu A (H1N1)による急性脳症死亡例の臨床像 . 第53回日本小児神経学会総会、2011年5月27日、

横浜.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥村 彰久 (OKUMURA, Akihisa)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：60303624

(2) 研究分担者

早川 昌弘 (HAYAKAWA, Masahiro)

名古屋大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：40343206

林 雅晴 (HAYASHI Masaharu)

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・

プロジェクトリーダー

研究者番号：00280777