

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591147

研究課題名（和文）急性・亜急性の脳炎・脳症における積極的な神経保護療法の導入のための研究

研究課題名（英文）The study for the development of neuroprotective therapy in acute and subacute encephalitis/encephalopathy.

研究代表者

田沼 直之 (TANUMA NAOYUKI)

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・研究員

研究者番号：00281676

研究成果の概要（和文）：急性・亜急性の経過をとる小児の脳炎・脳症における積極的な神経保護療法導入のために、剖検脳を用いた神経病理学的解析とELISA法による生体試料（尿、血清、髄液）中のバイオマーカー測定、多種類サイトカイン定量を組み合わせ、脳炎・脳症の病態の系統的な解析を試みた。髄液タウ蛋白や酸化ストレスマーカーなどは、脳炎・脳症の病態解析や治療効果判定に応用可能と考えられた。また、患者血清を用いた免疫組織化学染色は、自己免疫が関与する亜急性脳炎の診断に有用であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：To develop neuroprotective therapy, we investigated the pathogenesis of acute and subacute encephalitis/encephalopathy by measurements of cerebrospinal fluid (CSF) biomarkers in combination with conventional neuropathological analysis. The results suggest that CSF tau protein and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine could be useful in following the clinical course and monitoring the efficacy of therapies. In addition, the use of patient serum for immunohistochemistry is a sensitive screening method for the detection of anti-neuronal autoantibodies in autoimmune encephalitis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：脳炎・脳症、酸化ストレス、タウ蛋白、サイトカイン、神経保護療法、抗神経抗体、自己免疫性脳炎

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザ脳症をはじめとする小児の急性脳炎・脳症は、抗脳浮腫療法、抗けいれん薬の投与などの支持療法に加えて、特異療法として抗ウイルス療法、ステロイド（メチルプレドニゾロン）パルス療法、ガンマグロブリン大量療法、さらには特殊治療として脳低体温療法、持続血液透析濾過療法など、治療ガイドラインが確立され

急性期死亡率は改善されつつある。しかしながら、これらの治療は生存例での後遺症率の改善には必ずしも役立っていない。

本研究グループは、これまで病理組織での解析と並行させながら、患者の尿・髄液の酸化ストレスマーカーの測定を進め、色素性乾皮症、Lafora病、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症（DRPLA）などの小児期発症神経変性疾患において、酸化ストレスの病

態への関与を明らかにしてきた。これらの経緯をふまえ、これまでの研究成果を発展させる形で、急性・亜急性の経過をとる小児脳炎・脳症の病態を系統的に解析し、後遺症軽減のための積極的な神経保護療法プロトコルの開発を提案する本研究を企画するに至った。

2. 研究の目的

急性脳炎・脳症は、急激な経過で意識障害、けいれんなどの中枢神経症状が出現し、重篤な神経学的後遺症を呈することも多い疾患群である。近年、急性壊死性脳症 (acute necrotizing encephalopathy, ANE) (1995)、けいれん重積型急性脳症 (2000) ないし二相性けいれんと遅発性拡散能低下を呈する急性脳症 (acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion, AESD) (2006)、難治頻回部分発作重積型急性脳炎 (acute encephalitis with refractory, repetitive partial seizures, AERRPS) (2001)、可逆性脳梁膨大部病変を有する軽症脳炎・脳症 (clinically mild encephalitis/encephalopathy with a reversal splenial lesion, MERS) (2004) などの新しい疾患概念がわが国の小児神経科医から記載・確立され、急性脳症の病態解析も進歩しつつある。

本研究は、急性・亜急性の経過をとる小児の脳炎・脳症における積極的な神経保護療法導入のために、剖検脳を用いた神経病理学的解析と ELISA 法による生体試料 (尿、血清、髄液) 中のバイオマーカー測定、多種類サイトカイン定量を組み合わせて、脳炎・脳症の病態の系統的な解析を試みた。

3. 研究の方法

(1) 生体試料を用いたバイオマーカー測定

急性脳炎・脳症の患者から脳脊髄液 (髄液)、血清、尿などの生体試料を採取し、各種バイオマーカーの測定を行った。DNA に対する 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)、脂質の過酸化マーカー Hexanoyl lysine adduct (HEL) の2種類の酸化ストレスマーカー濃度を、日本老化制御研究所社製 ELISA キット (血清・髄液 8-OHdG 測定では高感度キット) と Bio-Rad 社製モデル 680 マイクロプレートリーダーを用いて測定した。尿検体では同時にクレアチンを測定し酸化ストレスマーカー濃度をクレアチン濃度で除した値を測定値とした。また、血清・髄液検体での

8-OHdG・HEL の測定では、あらかじめミリポア社製マイクロコンチューブによる透析処理を行った。さらに酸化ストレスとサイトカイン動態との関係を検討するため、サスペンションビーズアレイテクノロジーの応用により、微量試料 (約 50 μ l) で Bio-Rad 社製 Bio-Plex 200 システムを用いて多種類サイトカイン・ケモカイン (Bio-Rad 社製 8-Plex A panel : IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, IFN- γ , TNF- α) を同時定量した。さらに軸索障害マーカーとして total tau protein の測定を Invitrogen 社製 ELISA キットにて行った。

(2) 自己免疫関連亜急性脳炎の抗神経抗体のスクリーニング

対象は、大脳皮質・基底核に限局性の神経画像異常 (MRI、SPECT、FDG-PET) とそれに対応した言語障害などの高次脳機能障害やジストニアなどの不随意運動がみられ、既存の抗神経抗体 (抗 GluR 抗体など) の存在が否定された急性脳炎症例とした。ガンマグロブリン大量療法前後などの患者血清を用いて、対照脳組織での免疫組織化学染色 (二次抗体は抗ヒト IgG, IgM 抗体) を行い、ヒト脳組織と結合する抗神経抗体を同定した。

倫理面への配慮として、本研究計画は府中療育センターと協力医療機関の倫理委員会から承認のもと実施された。生体試料の収集にあたっては十分な説明の上での書面による同意を患者家族から受けた。

4. 研究成果

(1) 急性脳症における酸化ストレスマーカー

急性脳症の治療としてエダラボンを使用した症例について治療前後で髄液酸化ストレスマーカーを測定し効果を検討した。対象は急性脳症 5 例、けいれん重積 1 例で、抗ウイルス療法、抗脳浮腫療法、抗けいれん薬などの投与に加えて、エダラボンは 7~12 日間投与 (1mg/kg/日) した。治療前後での髄液酸化ストレスマーカー (8-OHdG、HEL の2種類) 測定を実施した。その結果、治療前の髄液 8-OHdG は、6 例中 5 例 (脳症 4 例中 3 例、けいれん重積 1 例) で高値を示し、治療後はいずれも改善を示した。HEL は測定しえた 5 例中 3 例で治療前に高値を示したが、治療後の改善も 8-OHdG に比べて乏しかった。けいれん重積の 1 例は脳症への進展が考慮され、入院時より脳

症急性期治療が開始された結果、後遺症なく退院した。

(2) MERS における髄液バイオマーカー解析

急性脳症の亜型のうち、MERS 患者 6 例(男 2 名、女 4 名、年齢 1-13 歳)について、各種髄液バイオマーカー(8-OHdG、HEL、タウ蛋白、サイトカイン)を測定した。その結果 8-OHdG が 4 例、HEL が 1 例で上昇していた。サイトカインでは IL-6、IL-10 が 3 例で上昇し、3 例中 2 例は病変が脳梁から大脳白質に広がっていた。軸索障害マーカーであるタウ蛋白は全例正常であった。

(3) インフルエンザウイルス A/H1N1 による急性脳症の 1 例

インフルエンザウイルス A/H1N1 による急性脳症の 1 例において、経時的に髄液バイオマーカーの測定を行った。発症時には髄液タウ蛋白、炎症性サイトカインが上昇し、第 9 病日にはタウ蛋白の更なる上昇、炎症性サイトカインの低下傾向を認めた。臨床的には MRI 上びまん性脳浮腫、脳幹病変を呈し、ステロイドパルス療法、大量 γ グロブリン投与、エダラボン投与、抗脳浮腫療法に加えて、脳低温療法を行った結果、ほぼ後遺症なく治癒した。本例では抗サイトカイン療法+神経保護療法が有効であった可能性が示唆された。

(4) FDG-PET にて代謝亢進を呈した自己免疫性脳炎の 1 例

不随意運動で発症し、FDG-PET で左側頭葉、基底核に代謝亢進を呈した 1 歳 10 ヶ月の自己免疫関連脳炎例において、 γ グロブリン大量療法前後の患者血清を用いて、対照脳組織での免疫組織化学染色を行った。治療前の血清では FDG-PET の病変部位に一致して神経細胞に染色がみられたが、治療後には染色性が消失した。この結果、抗神経抗体が脳炎の病態に関与していると考えられた。

(5) Hemiconvulsion-hemiplegia-epilepsy (HHE) 症候群様のけいれん重積症状を繰り返した限局性脳症の 1 例

HHE 様のエピソードを 3 回繰り返した 9 歳男児例。初回エピソード後、頭部 MRI/T2 強調画像にて右頭頂側頭部の皮質下白質に高信号域を認め、髄液バイオマーカー解析にて 8-OHdG と tau protein の上昇を認めた。gabapentin によりけいれんは徐々におさまったが、右大脳半球の萎縮を残した。この

エピソードの 1 年 3 カ月後に再び左半身けいれんと麻痺が出現、さらに 3 カ月後には右半身けいれんが出現した。3 回目のエピソード時の頭部 MRI/T2 強調画像にて左側頭後頭部に高信号域を認め、髄液 total tau protein と IL-6 の上昇を認めた。2 回目のエピソード時の患者血清を用いた抗神経抗体のスクリーニングでは側頭後頭葉の大脳皮質ニューロンに陽性所見を認め、寛解期の血清ではこの所見は消失した。以上のことから、本症例の発症に自己免疫機序が関与している可能性が示唆された。

(6) A 群 β 溶連菌感染に関連した自己免疫性神経障害における抗神経抗体の解析

A 群 β 溶連菌感染に関連した自己免疫性神経障害として、急性散在性脳脊髄炎(ADEM)、Pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococci (PANDAS)、亜急性脳炎の症例を各一例ずつ解析した。ADEM は 10 歳女児で、発熱、意識障害で発症し頭部 MRI で両側基底核に信号異常を認めた。髄液バイオマーカー解析では急性期に tau protein と IL-6、IL-8、TNF- α が上昇し、寛解期に減少した。患者血清を用いた解析では急性期に淡蒼球ニューロンに陽性を示したが、回復期には染色性が消失した。PANDAS 症例は 7 歳女児で、溶連菌感染後 6 日に行動異常で発症、頭部 MRI は異常なし。髄液バイオマーカー解析では急性期に IL-10 と TNF- α が上昇、患者血清を用いた抗神経抗体スクリーニングでは急性期に淡蒼球ニューロンに染色性を示した。亜急性脳炎は 9 歳女児で、異常興奮と行動異常にて発症し錐体外路症状もみられた。ASO、ASK の上昇あり、溶連菌感染関連亜急性脳炎が疑われ IVIG 治療を行った。治療後症状は消失したが、失声症、幻視、反響言語が出現し、IVIG 治療無効にて、メチルプレドニゾロンパルス療法にて症状が次第に改善した。髄液サイトカインは急性期、回復期とも正常、患者血清を用いた脳組織染色では急性期に側頭葉ニューロンに陽性、回復期は染色性が消失した。以上の結果から患者血清を用いた免疫染色は溶連菌感染後の自己免疫性神経障害における抗神経抗体のスクリーニングに有用であることが示唆された。

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 12 件)

- ① 田沼直之、林雅晴. エダラボン. 小児内科、査読無、45, 2013, 253-256.
- ② 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. 査読有, 35, 2013, 181-184.
- ③ 田沼直之. 神経疾患とバイオマーカー. 小児内科、査読無、44, 2012, 1421-1424.
- ④ 田沼直之. 小児急性脳症とバイオマーカー. 日本臨牀、査読無、70, 2012, 887-892.
- ⑤ Hayashi M, Miyata R, Tanuma N. Oxidative stress in developmental brain disorders. Adv. Exp. Med. Biol. 査読有, 724, 2012, 278-290.
- ⑥ Kitamura Y, Okumura A, Hayashi M, Mori H, Takahashi S, Yanagihara K, Miyata R, Tanuma N, Mimaki S, Abe S, Shimizu T. Oxidative stress markers and phosphorus magnetic resonance spectroscopy in a patient with GLUT1 deficiency treated with modified Atkins diet. Brain Dev. 査読有, 34, 2012, 372-375.
- ⑦ Miyata R, Tanuma N, Hayashi M, Takahashi Y. Focal encephalopathy with recurrent episodes of epileptic status and cluster mimicking hemiconvulsion-hemiplegia-epilepsy syndrome. Brain Dev. 査読有, 34, 2012, 360-363.
- ⑧ Miyata R, Tanuma N, Hayashi M, Imamura T, Takanashi J, 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. 査読有, 34, 2012, 124-127.
- ⑨ 田沼直之. 急性脳症とバイオマーカー. 小児科診療、査読無、74, 2011, 931-936.
- ⑩ 安西有紀、林雅晴、松岡正樹、高橋宏行、宮田理英、田沼直之、大矢達男. パンデミック (H1N1) 2009 インフルエンザ感染により脳幹病変を呈した急性脳症の 1 例. 脳と発達、査読有、43, 2011, 57-59.
- ⑪ Sekigawa M, Okumura A, Nijima S, Hayashi M, Tanaka K, Shimizu T. Autoimmune focal encephalitis shows marked hypermetabolism on positron emission tomography. J. Pediatr. 査読有, 156, 2010, 158-160.
- ⑫ Tanuma N, Miyata R, Kumada S, Kubota M, Takanashi J, Okumura A, Hamano S, Hayashi M. The axonal damage marker tau protein in the cerebrospinal fluid

is increased in patients with acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion. Brain Dev. 査読有, 32, 2010, 435-439.

〔学会発表〕(計 9 件)

- ① Tanuma N, Miyata R, Nakajima K, Okumura A, Kubota M, Hamano S, Hayashi M. Oxidative stress in acute encephalopathy associated with HHV-6 and influenza virus infection. The 12th International Child Neurology Congress and the 11th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology. 2012 年 5 月 28 日、Brisbane, Australia.
- ② 宮田理英、中島啓介、田沼直之、林雅晴. インフルエンザ罹患時のけいれん重積と急性脳症における髄液酸化ストレスマーカー解析、第 53 回日本小児神経学会総会、2011 年 5 月 27 日、パシフィコ横浜 (横浜) .
- ③ 中島啓介、宮田理英、田沼直之、林雅晴. 小児の急性神経疾患における髄液 GFAP の測定、第 53 回日本小児神経学会総会、2011 年 5 月 27 日、パシフィコ横浜 (横浜) .
- ④ 田沼直之、宮田理英、林雅晴、小一原玲子、浜野晋一郎、星野英紀、久保田雅也. 急性脳症治療にエダラボンは有効か? 第 53 回日本小児神経学会総会、2011 年 5 月 26 日、パシフィコ横浜 (横浜) .
- ⑤ 白井健太郎、金子節子、菅原祐之、荒木聡、田沼直之、林雅晴. 一過性脳梁膨大部病変を伴った川崎病の 8 歳男児の 1 例、第 53 回日本小児神経学会関東地方会、2010 年 9 月 11 日明治安田生命ホール (東京) .
- ⑥ 八谷靖夫、林雅晴、宮田理英、田沼直之、本郷和久、下田木の実、神田祥子、熊田聡子、栗原栄二. 溶血連鎖球菌感染症に関連する中枢神経症状を呈し、異なる臨床経過を示した 3 例の比較検討、第 52 回日本小児神経学会総会、2010 年 5 月 22 日、福岡国際会議場 (福岡) .
- ⑦ 宮田理英、田沼直之、今村卓司、柏井洋文、奥村彰久、高梨潤一、熊田聡子、林雅晴. Mild encephalitis/encephalopathy with reversal splenic lesion (MERS)患者における髄液中 biomarker の検討、第 52 回日本小児神経学会総会、2010 年 5 月 20 日、福岡国際会議場 (福岡) .
- ⑧ 森山剣光、岡野彩子、宮田理英、田沼直之、林雅晴、神山潤. 脳炎後のてんかん発作の回復期に髄液酸化ストレスマーカーの上昇を認めた 1 例、第 52 回日本小児神経学会総会、2010 年 5 月 20 日、福岡国際会議場 (福岡) .
- ⑨ 安部信平、奥村彰久、中原絵里、池野充、

齋藤雅子、清水俊明、田沼直之、林雅晴.
リハビリン髄注療法を施行した亜急性硬
化性全脳炎の1例、第52回日本小児神経
学会総会、2010年5月20日、福岡国際
会議場（福岡）。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田沼 直之 (TANUMA NAOPYUKI)
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・研究員
研究者番号：00281676

(2) 研究分担者

林 雅晴 (HAYASHI MASAHARU)
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・副参事研究員
研究者番号：00280777

(3) 連携研究者

なし