

ISSN 1348-2718

# NEUROINFECTION

## 神経感染症

Vol. 16 No. 1 2011

日本神経感染症学会

Japanese Society for Neuroinfectious Diseases

## 目 次

第15回日本神経感染症学会学術集会報告	細矢 光亮	
会長講演 亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) に対する新たな治療法の開発を目指して	細矢 光亮	1
特別講演 iPS 細胞を用いた神経系の再生研究	岡野 栄之	9
教育講演1 フラビウイルス脳炎とその病態	高崎 智彦	13
教育講演2 ウィルス性脳炎との鑑別診断に重要な自己抗体介在性脳炎	田中 恵子	19
教育講演3 中枢神経系の感染症と炎症の画像診断	柳下 章	27
教育講演4 中枢神経感染症でみられるミオクロースス	宇川 義一	34
教育講演5 神経感染症ガイドラインの検証	亀井 聰	43
<b>シンポジウム1 「プリオン病の疫学から治療まで」</b>		
プリオン病のサーベイランスと疫学	坂井 健二	50
発症機序：異常化プリオンモデルの検討	齊藤美保子	57
Real-time QUIC法による髄液中異常プリオン蛋白の測定	新 竜一郎	64
プリオン病の画像診断	藤田 浩司	67
プリオン病の感染予防	岸田 日帶	73
プリオン病の分子標的治療薬の開発	逆瀬川裕二	79
<b>シンポジウム2 「神経系の浮腫と細胞死」</b>		
血液脳関門・血液神経関門の破綻	神田 隆	87
脳炎と興奮毒性、細胞傷害性T細胞	高橋 幸利	96
急性脳症：サイトカインとフリーラジカル	河島 尚志	105
役員一覧		118
会則		119
投稿規程		121
投稿承諾書		123
編集者		

# 第15回日本神経感染症学会学術集会報告

第15回日本神経感染症学会学術集会会長 細矢光亮  
(福島県立医科大学医学部小児科学講座)

2010年10月8、9の両日にわたり、福島市において、第15回日本神経感染症学会学術集会を開催させていただきました。お蔭様で、学会員をはじめとして、多くの方々のご参加、ご協力を賜りまして盛会裏に無事終了することができました。

本学会は神経内科医、小児科医、神経病理医、微生物学研究者、疫学研究者など、多くの研究領域の専門家からなるアカデミックな学会でありますので、テーマを「神経と感染症—病態の解明から治療法の開発へー」としまして、神経感染症疾患の病態をいかに捉えるか、検査所見をどのように理解したらよいのか、その病態に最も適した治療法は何かといった基本的な課題を討論する場にしたいと考えました。

特別講演では、神経疾患を扱うものには夢の治療である「神経再生医療の展望」を慶應義塾大学の岡野栄之先生に、2009年にパンデミックをおこした「新型インフルエンザ2009H1N1」に対する小児科学会の対応とその成果に関しまして岡山大学の森島恒雄先生にそれぞれご講演いただきました。また、教育講演では、金沢医科大学 田中恵子先生に「中枢神経疾患と自己抗体」、都立神経病院 柳下章先生に「中枢神経疾患の画像診断」、福島県立医科大学 宇川義一先生に「神経感染症で見られるミオクローススの病態」、国立感染症研究所 高崎智彦先生に「ラビウイルス脳炎の病態」、日本大学 亀井聰先生に「神経感染症ガイドラインの検証」につきましてそれぞれご講演賜りました。

シンポジウムでは、水澤英洋先生と北本哲之先生に「プリオン病の疫学から治療まで」のテーマで、サーベイランスと疫学、新しい診断法、画像診断、感染予防、治療について新知見を含め企画していただきました。また、水口雅先生と市山高志先生に「神経系の浮腫と細胞死」のテーマで、血液脳関門、脳炎の病態および低体温療法に関して取り上げていただきました。

会長講演は「亜急性硬化性全脳炎に対する治療法の開発を目指して」とのテーマで私がこれまで行ってきました研究の成果と今後の課題についてお話しさせていただきました。

一般演題は76題と多数の貴重な発表をしていただき、特別企画と合わせまして大変豊富な内容になりました。そして、参加いただきました皆様には活発な意見交換をしていただき、有意義な学術集会になったと思います。演者、座長、参加者すべての皆様に心より感謝申し上げます。

最後に、当学術集会の開催にあたり、陰で働いてくれた事務局をはじめ、福島県立医科大学小児科の医局員、スタッフに御礼申し上げます。

## 会長講演

## 亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) に対する 新たな治療法の開発を目指して

細矢光亮

**【要旨】** 亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) に対し、これまでイノシプレックスの経口投与やインターフェロン (IFN) の脳室内投与が行われてきたが、その効果は確実ではなかった。ウイルスの増殖を抑制する薬剤は SSPE に対する新たな治療薬になると想え、組織培養および動物モデルにおいて各種薬剤の抗 SSPE ウィルス効果を検討した結果、リバビリンにイノシプレックスや IFN に勝る優れた効果があることを明らかにした。そこで、イノシプレックスと IFN の併用療法では臨床症状の進行が抑えられなかつた SSPE 患者に対しリバビリン静注療法を行い、さらには脳室内投与療法を試み、一部の症例でリバビリン療法の臨床的有効性を確認した。現在国内の多施設においてリバビリン脳室内投与療法を治験中であり、より有効で安全な投与方法を検討しているところである。

Key words: 亜急性硬化性全脳炎、SSPE、リバビリン、脳室内投与療法

### 1 はじめに

亜急性硬化性全脳炎 (subacute sclerosing panencephalitis; SSPE) は、麻疹罹患後おおよそ 2-10 年の潜伏期間の後に中枢神経症状を呈し、一旦発症後は進行性に増悪し、高度の痴呆、植物状態となり死に至る slow-wiirus 感染症である<sup>1)</sup>。SSPE 患者の脳組織と麻疹ウイルスに感受性のある細胞を混合培養すると、抗原性は麻疹ウイルスに極めて類似しているが、通常の麻疹ウイルスとは異なり、細胞結合性で感染性遊離ウイルスを産生せず、神経病原性の強い麻疹様ウイルスが分離される。これがいわゆる SSPE ウィルスである。SSPE ウィルスの遺伝子を通常の麻疹ウイルスと比較すると、構造蛋白をコードする遺伝子、特に M 遺伝子に変異が蓄積しており、これが SSPE ウィルスの生物学的特徴に関与していると考えられている。SSPE 患者の臨床経過をみると、麻疹から回復した後、数年におよぶ潜伏期間を置いて発症して来る。発症後比較的初期の段階ではウイルスの発現は非常に低く、その後病態の進展に伴いウイルス発現が増加する。すなわち、潜伏状態から SSPE ウィルスの増殖期に移行して脳内

病変が拡大し、臨床症状を呈するに至ると推測される。したがって、発症して比較的早い段階で SSPE ウィルスの増殖を抑制することができれば、病状の進行を阻止し治癒も望めると考えられる。今まで、SSPE に対しアマンタジン<sup>2)</sup>、イノシプレックス<sup>3,4)</sup>、インターフェロン (IFN)<sup>5-7)</sup>、シメチジン<sup>8)</sup>などが試みられているが、それらの効果は確実とは言えず、全く無反応の例も少なからず存在する。また、治療初期には有効と思われた例においても、長期的な予後は思わしくない<sup>9)</sup>。

### 2 組織培養および動物モデルにおける リバビリンの抗 SSPE ウィルス効果

現在使用されているイノシプレックスや IFN よりも抗 SSPE ウィルス効果の高い薬剤があれば、SSPE に対する新たな治療薬になると想えられる。そこで、これらの薬剤を対照薬として、RNA ウィルスに対し効果が期待される種々の抗ウイルス剤について、SSPE ウィルスに対する増殖抑制効果を組織培養上で比較検討した<sup>10)</sup>。その中で、リバビリンは SSPE ウィルスのラーク形成を 5-10 μg/ml の

濃度で50%に、 $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ 以上濃度でほぼ完全に抑制した。すなわち、リバビリンはIFN- $\alpha$ やイノシプレックスに比し優れた効果を示した(表1)。

SSPEウイルスをハムスターの頭蓋内に接種すると、接種後3-10日で易刺激性、ミオクローヌス、麻痺などの神経症状を発症し、6-20日で死亡する。脳波上では、発作性同期性高振幅徐波が観察される<sup>11)</sup>。これらは、臨床上SSPE患者で観察される症状であり、脳波所見である。このSSPEモデルを用いて、リバビリンとIFN- $\alpha$ の抗ウイルス効果

を比較検討した。3~4週齢のハムスターの頭蓋内にSSPEウイルスを接種し、ウイルス接種後12時間より24時間ごとに10回薬剤を頭蓋内に直接投与した。56日間症状の出現や死亡の有無を観察し、薬剤の治療効果を判定した。コントロール群は、ウイルス接種後3週までに全例死亡した。リバビリンは、投与量依存性に生存率を改善させ、 $1\text{mg/kg/day}$ で40%、 $5\text{mg/kg/day}$ で80%、 $10\text{mg/kg/day}$ 以上で100%が生存した(図1)<sup>12)</sup>。IFN- $\alpha$ は、投与量依存性に生存率を改善させたが、臨床における使用量に相当する

表1 抗ウイルス薬のSSPEウイルスに対する増殖抑制効果

抗ウイルス薬	有効濃度 <sup>a</sup> ( $\mu\text{g/ml}$ )	毒性濃度 <sup>b</sup> ( $\mu\text{g/ml}$ )	選択係数 <sup>c</sup>	抗ウイルス薬	有効濃度 <sup>a</sup> ( $\mu\text{g/ml}$ )	毒性濃度 <sup>b</sup> ( $\mu\text{g/ml}$ )	選択係数 <sup>c</sup>
<b>アデノシン誘導体</b>							
Tubercidin	>0.64	0.64	<1	Ribavirin	12	>250	>21
5-Chlorotubercidin	>1.6	1.6	<1	3-Deazaguanine	0.70	40	57
Neplanocin A	6.5	8.0	1.2	Pyrazofurin	0.11	25	230
Neplanocin C	0.84	8.0	9.5	EICAR <sup>d</sup>	0.30	>250	>830
C-c' Ado	2.2	16	7.3				
DHCA	8.5	100	12	<b>ウリジン誘導体</b>			
DHCDA	24	200	8.3	3'-C-Methyluridine	>500	500	<1
(S)-DHPA	>200	>200	><1	3-Deazauridine	>500	>500	><1
(RS)-AHPA	62	400	6.5	5'-Deoxy-5-fluorouridine	>500	500	<1
(S)-HPMPA	>200	200	<1	6-Azauridine	0.84	40	48
<b>シチジン誘導体</b>							
Carbodine	0.95	1.6	1.7	Amantadine	90	700	7.8
Cyclopentenyl cytosine	0.049	0.32	6.5	Inosiplex	890	>5000	>5.6
				Interferon- $\alpha$	30 <sup>e</sup>	>10000	>330

a 50%有効濃度

b 最小毒性濃度

c 50%有効濃度／最小毒性濃度

d 5-Ethynyl-1- $\beta$ -D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide.

e IU/ml

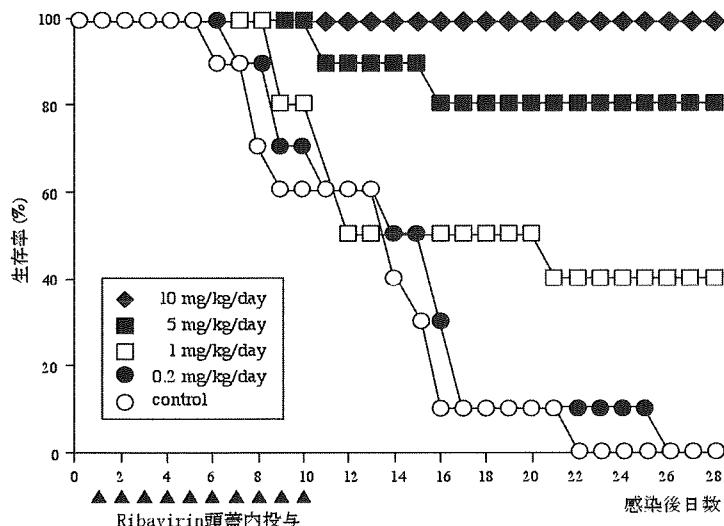


図1 ハムスターを用いたSSPEモデルにおけるリバビリンの治療効果  
投与量依存性に生存率が改善し、 $1\text{mg/kg/day}$ で40%、 $5\text{mg/kg/day}$ で80%、 $10\text{mg/kg/day}$ 以上で100%が生存した。

$6 \times 10^4$  IU/kgで20%、その100倍量の $6 \times 10^6$  IU/kgでも70%であった<sup>13)</sup>。

リバビリン10mg/kg/dayを投与したハムスターは全例が生存し、生存したハムスターは全く神経症状を呈さず、後遺症も残さなかった。そこで、この投与量における脳内でのSSPEウイルス増殖の有無を調べた。ウイルス感染後経時にハムスターを屠殺し、脳内の感染性SSPEウイルス量を測定した。コントロール群では、ウイルス接種24時間より120時間にかけてウイルス量は増加し、その後168時間まで高値が持続し死亡した。ウイルス量の最高値は15,000PFU/gであった。一方、リバビリン治療群では、感染後48時間に一旦300PFU/gに達したが、その後は減少し、120時間以降感染性ウイルスは全く検出されなかつた。感染後10日間リバビリン投与を継続したのち中止したが、観察期間の56日まで、感染性ウイルスは検出されなかつた（図2）<sup>12)</sup>。

SSPEモデルにおけるリバビリンの有効濃度を求めるため、摘出した脳内のリバビリン濃度をHPLC（high-performance liquid chromatography）法により測定した。SSPEモデルにおいて100%が生存

するリバビリン10mg/kg/dayの投与において、脳内リバビリン濃度は50μg/g以上を10日間維持した。リバビリンの毒性濃度は、250～350μg/gであった（図3）<sup>14)</sup>。

以上のことから、リバビリンはハムスターを用いた動物モデルにおいて治療効果を示すこと、100%の生存が得られる脳内リバビリン濃度は50～100μg/gで、これは組織培養においてSSPEウイルスの増殖を完全に抑制する濃度に一致すること、ある期間ウイルスの増殖を完全に抑制すればウイルスを消滅せしめる可能性があることなどが示された。ただし、リバビリンの有効安全域は狭く、投与の際にはリバビリンの濃度をモニターする必要があると思われた。

### 3 SSPE患者におけるリバビリン療法の試み

リバビリンは、他の疾患において経口投与あるいは経静脈投与されている薬剤である。経口投与では、髄液中リバビリン濃度がSSPEウイルスに対する有効濃度に達しないことは既に知られている<sup>15)</sup>。そ

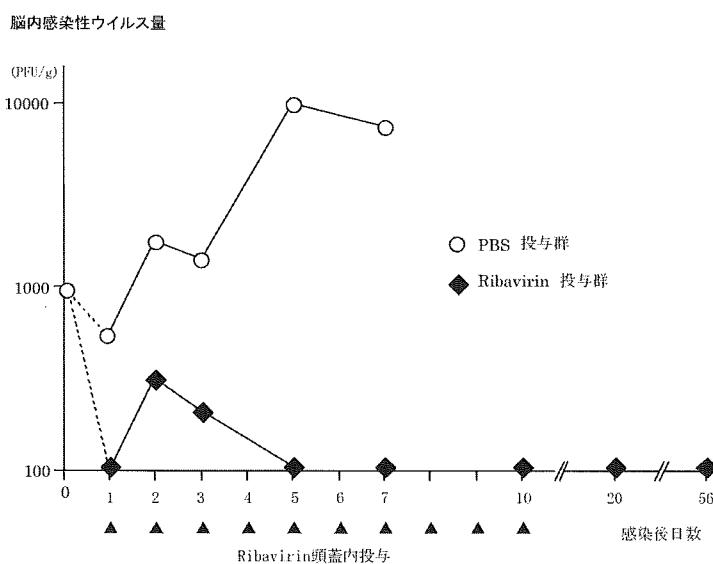


図 2

図2 ハムスター脳内におけるリバビリンのSSPEウイルス増殖抑制効果

リバビリン治療群では、感染後48時間に感染性ウイルス量は300PFU/gに達したが、その後は減少し、120時間以降感染性ウイルスは全く検出されなかつた。治療中止後も感染性ウイルスの回復はみられなかつた。

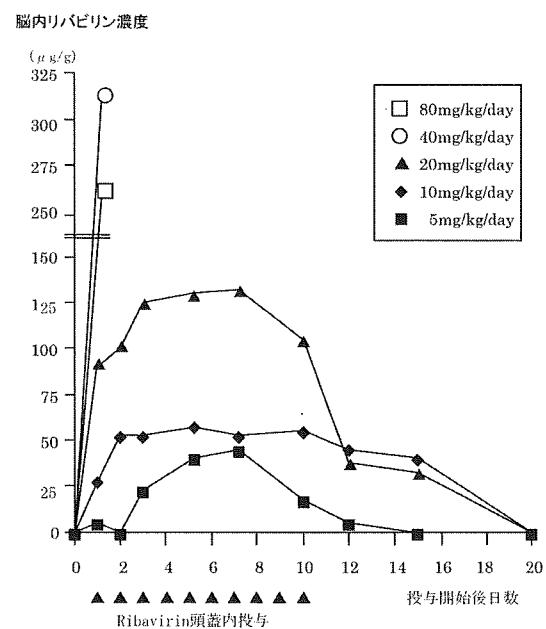


図 3

図3 ハムスター脳内におけるリバビリン濃度の測定

リバビリン10mg/kg/dayの投与において、脳内リバビリン濃度は50μg/g以上を10日間維持した。

こで、イノシプレックスの経口投与とIFNの脳室内投与の併用では臨床症状の進行が迎えられなかつた。SSPE患者2例に対し、リバビリン経静脈投与を試みた。まず、患者の入院施設の倫理委員会の承認を受け、詳細な説明の上で患者両親より同意を得て、イノシプレックスとIFNに併用してリバビリンの経静脈投与を開始した。リバビリン1回量10mg/kg、1日3回投与から開始し、1回量を20mg/kg、30mg/kgと増量した。リバビリン投与は7日間継続し7日間休薬を基本とし、これを繰り返した。濃度の安定する15回目の投与後3時間に血清と髄液を採取し、HPLC法によりリバビリンの濃度を測定した。血清中リバビリン濃度は、投与量依存性に1.3から20.9μg/mlに上昇した。リバビリンの血液から髄液への移行は比較的良好で、髄液濃度は血清濃度の74% (50–89%) であった。髄液中リバビリン濃度は、投与量依存性に1.1から17.4μg/mlに上昇した。1回量20mg/kg以上の投与により、髄液中リバビリン濃度は、組織培養および動物実験におけるSSPEウ

イルスに対する50%有効濃度である7.5μg/ml以上を維持した<sup>16)</sup>。

図4に示した症例は、Jabourの分類の2期に治療を開始したところ、ミオクローヌスの消失、右感音性難聴の軽快など、臨床症状に著明な改善をみた。病期はJabour分類の1期に改善した。また、臨床症状の改善に伴って、髄液中麻疹HI抗体価が減少した<sup>17)</sup>。リバビリン経静脈投与による副作用としては、20mg/kg以上の投与の継続により、貧血と口唇腫脹がみられたが、投与の中止によりすみやかに軽快した。

リバビリン経静脈投与では、治療継続中は効果が持続したが、中止後に症状が再燃し、髄液中麻疹抗体価が再上昇した(図4)。SSPEウイルスの消失を期待するには、中枢神経系におけるリバビリン濃度をさらに高く保つ必要があるが、経静脈投与量をこれ以上増加するのは副作用の点から困難であった。それまで、頭蓋内へのリバビリン投与の報告はなかったが、我々の基礎研究の結果を根拠として、米国

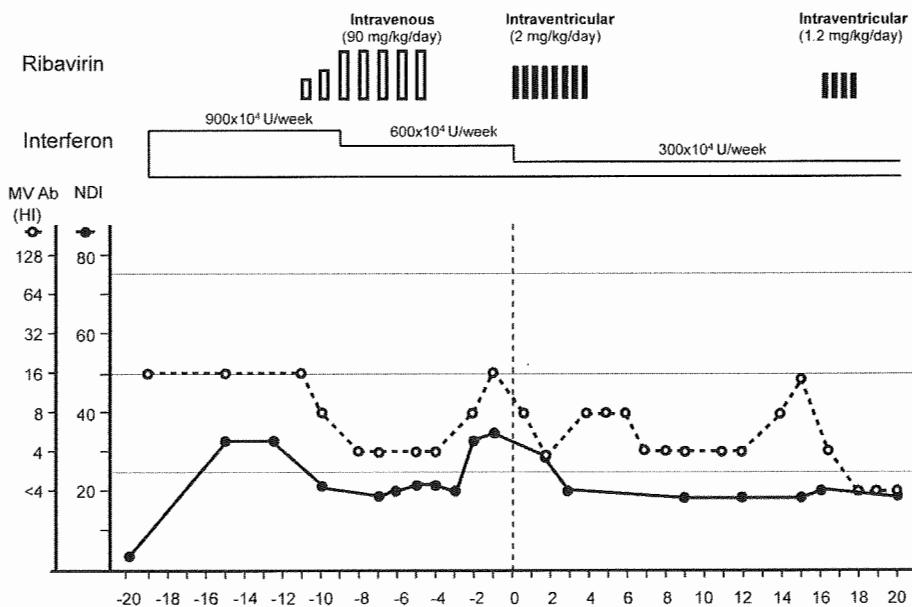


図 4

図4 リバビリン投与症例の臨床症状スコアと髄液中麻疹抗体価の推移

Jabourの分類の2期にリバビリン経静脈投与を開始したところ、ミオクローヌスの消失、右感音性難聴の軽快など、臨床症状に著明な改善がみられ、病期はJabour分類の1期に改善した。また、髄液中麻疹HI抗体価が減少した。しかし、リバビリン経静脈投与を中止すると症状が再燃し、髄液中麻疹抗体価が再上昇した。

髄液中リバビリン濃度を有効濃度に維持するためにリバビリン脳室内投与療法を行ったところ、臨床症状スコアが36から22再度低下し、髄液中麻疹抗体価は16倍から4倍に低下した。治療中止後12か月間、臨床症状に再燃はなかつた。

において1例のSSPE患者に対しリバビリンの脳室内投与が行われ、副反応はみられず有効であったとの学会報告がなされた<sup>18)</sup>。再度、倫理委員会の承認と患者家族の同意を得て、リバビリンの脳室内への直接投与を試みた。

組織培養および動物モデルにおいてウイルス増殖を完全に抑制し、かつ安全な濃度である50–150 μg/mlを髄液中の目標濃度とした。0.25mg/kgから開始し徐々に投与量を増加したところ、1.0mg/kgの投与で投与後2時間の濃度が目標濃度に達した。しかし、半減期が2–6時間と比較的短かったので、投与を12時間おきに繰り返した。これにより、髄液中リバビリン濃度はほぼ目標濃度を維持した。5日間投与9日間休薬を1クールとしてこれを繰り返した。投与時に軽度の頭痛や眠気がある、投与の継続により口唇が腫脹すると言った副反応がみられたが、重篤なものは無かった。再び症状に改善が見られ、3か月の脳室内投与後治療を中止した。髄液中麻痺抗体価は4倍となり、治療中止後12か月間再燃はなかった(図4)<sup>19)</sup>。

#### 4 リバビリン脳室内投与の治療計画

現在行っているリバビリン脳室内投与療法の治療プロトコールを図5に示した。リバビリン1mg/kg/回、1日2回、5日間投与から開始し、初回と9回目投与後2時間、6時間、12時間にリザーバーから逆流で採取した髄液と、6時間に腰椎穿刺にて採取した髄液のリバビリン濃度を求める。投与方法変更の基本は、2時間の濃度が150 μg/ml未満の場合は1回量を増加し、150 μg/ml以上200 μg/ml未満となるように調整する。この投与量で12時間の濃度が20 μg/ml未満の場合は投与回数を1日3回にすることである。これにより、理論的には髄液リバビリン濃度が目標濃度(50–200 μg/ml)をほぼ維持することになる。投与量が決定したら、5日間治療9日間休薬を12クール(6か月)継続する。

6か月の治療で投与を終了すると、6–12ヵ月後に臨床症状の再燃や髄液麻痺抗体価の再上昇がみられる。そこで、維持療法として治療終了後6か月無治療、6クール(3か月)治療を4回繰り返し、全治療期間3年6か月で終了する治療計画(図6)を作成した。

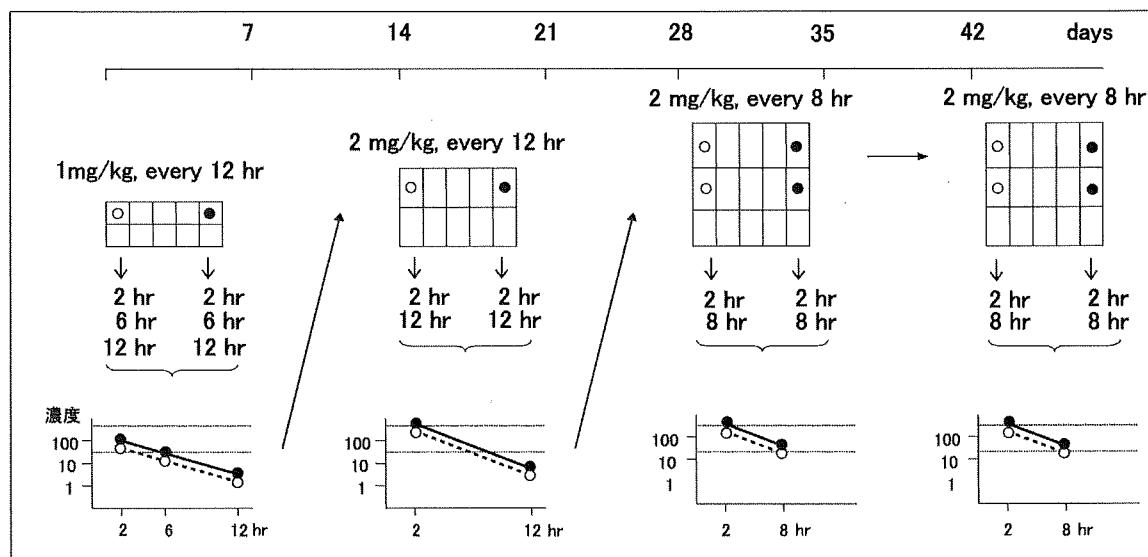


図 5

図5 リバビリン脳室内投与療法治療計画

- ①2時間の濃度が<150 μg/mlの場合は、150<<200 μg/mlを目標に、副作用に注意しながら1回量を増加する。
- ②投与直前の濃度が<20 μg/mlの場合は、可能であれば3回投与とする。
- ③2時間の濃度が150<<200 μg/ml、投与直前の濃度が>20 μg/mlの場合は、この投与方法に固定し、これをくり返す。
- ④投与方法が固定したら、これを6クール継続し、その終了時に効果判定する。有効と判定された場合は、計6ヶ月間継続する。

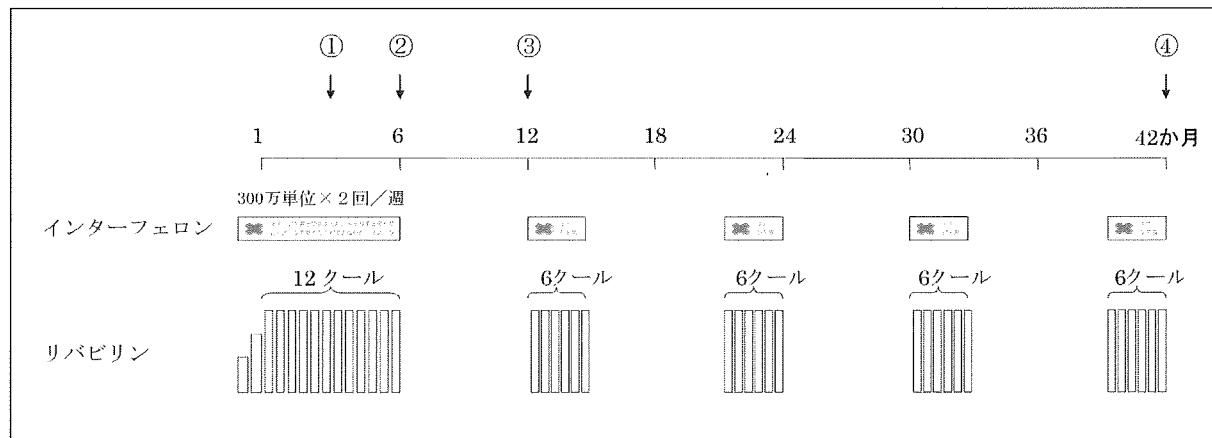


図 6

図6 リバビリン脳室内投与療法治療計画Ⅱ

- ①目標濃度に達してから6クール治療を行い、臨床的に有効性が確認されたら計6ヶ月治療を継続する。
- ②12クール終了時点で髄液麻疹抗体価が治療前の1/4以下に低下した場合は、治療を一終了する。
- ③髄液麻疹抗体価が再上昇するなどの再燃兆候がなく、中止後6ヶ月を経過した場合は、6クールの強化療法を行う。
- ④症状、抗体価、画像所見等が安定していれば、3ヶ月治療、6ヶ月無治療のサイクルを継続する。治療期間は3年6ヶ月を予定する。

## 5 国内におけるリバビリン脳室内投与症例

前述の治療プロトコールを用いて、これまでリバビリン脳室内投与療法を施行された症例は国内で20例以上あるが、その内6か月以上継続して治療され、病歴が調査された18例について、リバビリン療法開始前と治療後のNDIスコアを比較した(図7)。

3例がやや改善、4例が不变、7例が軽度増悪、4例が増悪であった。SSPEは通常進行性に増悪する疾患であることを考えると、18例中7例(39%)では臨床症状の進行を止めることができた(有効であった)と思われ、軽度増悪まで含めると、14例(78%)に進行を遅らせる作用があったと言えるかもしれない。

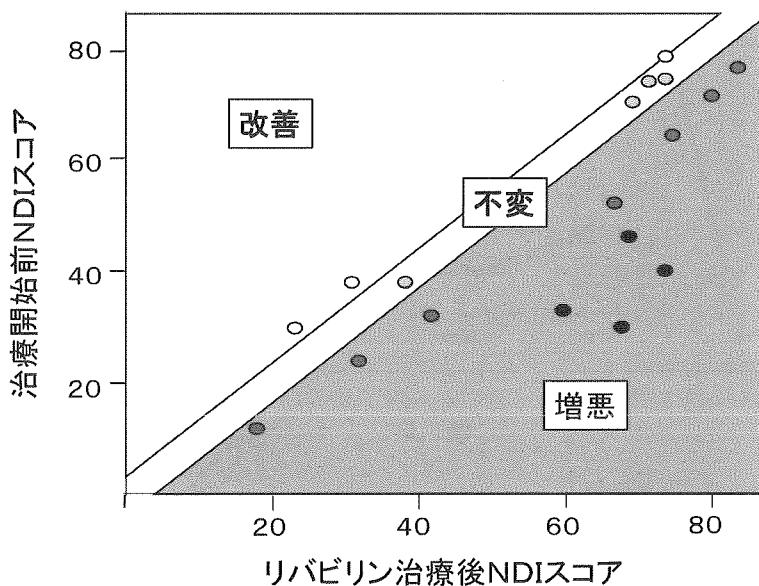


図 7

図7 リバビリン脳室内投与療法の予後

リバビリン脳室内投与療法開始前と治療後のNDIスコアを比較した。3例がやや改善、4例が不变、7例が軽度増悪、4例が増悪であった。

## 6 おわりに

リバビリンは、組織培養においてSSPEウイルスの増殖を抑制し、動物モデルにおいて治療効果を示した。また、SSPE患者において髄液中リバビリン濃度を有効濃度に保つことにより臨床的有効性が示された。現在多数例においてリバビリン脳室内投与療法を試みているが、病期の比較的早い時期に治療が開始され、髄液中のリバビリン濃度が有効濃度に維持された場合には、臨床的有効性が確認される場合が多い。しかしながら、リバビリン治療を中止すると、それから数ヵ月後に臨床症状の悪化・再燃を認め、有効例においても治療を中止することが出来ない。SSPE患者では、免疫学的脆弱性が推察されることから、リバビリンによりウイルスの増殖を抑制してもウイルスを免疫学的には排除できず、治療中止により再燃すると考えられる。ウイルスを中枢神経系から排除するためには、持続感染したウイルスの遺伝子を特異的に破壊する薬剤を開発する必要があると考えられる。

## 文 献

- 1 Swaiman KF, Ashwal S, eds. *Pediatric neurology: Principles and practice*, 2<sup>nd</sup> ed. Vol 1. St Louis, Missouri: Mosby, 671-679, 1999.
- 2 Robertson WC, Clark DB, Markesberry WR. Review of 38 cases of subacute sclerosing panencephalitis: effect of amantadine on the natural course of the disease. *Ann. Neurol.* 8: 422-425, 1980.
- 3 Jones CE, Dyken PR, Huttenlocher PR, Jabbour JT, Maxwell KW. Inosiplex therapy in subacute sclerosing panencephalitis. *Lancet* I, 1034-1037, 1982.
- 4 Fukuyama Y, Nihei K, Matsumoto S, et al. Clinical effects of MND-19(inosiplex) on subacute sclerosing panencephalitis. *Brain Dev.* 9: 270-282, 1987.
- 5 Panitch HS, Plascencia JG, Norris FH, Cantell K, Smith RA. Subacute sclerosing panencephalitis: remission after treatment with intraventricular interferon. *Neurology*, 36: 562-566, 1986.
- 6 Yalaz K, Anlar B, Oktem F, et al. Intraventricular interferon and oral inosiplex in the treatment of subacute sclerosing panencephalitis. *Neurology*. 42: 488-491, 1992.
- 7 Gereroso G, Yamani s, Crowell J, et al. Combined oral isoprinosine-intraventricular  $\alpha$ -interferon therapy for subacute sclerosing panencephalitis. *Brain Dev.* 15: 346-355, 1993.
- 8 Anlar B, Gucuyener K, Imir T, Yalaz K, Renda Y. Cimetidine as an immunomodulator in subacute sclerosing panencephalitis: a double blind, placebo-controlled study. *Pediatr. Infect. Dis J.* 12: 578-581, 1993.
- 9 Anlar B, Yalaz K, Oktem F, Kose G. Long-term follow up of patients with subacute sclerosing panencephalitis treated with intraventricular  $\alpha$ -interferon. *Neurology* 48: 526-528, 1997.
- 10 Hosoya M, Shigeta S, Nakamura K, De Clercq E. Inhibitory effect of selected antiviral compounds on measles (SSPE) virus replication in vitro. *Antiviral Res.* 12: 87-98, 1989.
- 11 Sugita T, Shiraki K, Ueda N, et al. Induction of acute myoclonic encephalopathy in hamsters by subacute sclerosing panencephalitis virus. *J Infect Dis* 150: 340-347, 1984.
- 12 Honda Y, Hosoya M, Ishii T, Shigeta S, Suzuki H. Effect of ribavirin on subacute sclerosing panencephalitis virus infections in hamsters. *Antimicrob Agents Chemother.* 38: 653-655, 1994.
- 13 Takahashi T, Hosoya M, Shigeta S, et al. The cooperative effect of interferon- $\alpha$  and ribavirin on subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) virus infections, in vitro and in vivo. *Antiviral Res.* 37: 29-35, 1989.
- 14 Ishii T, Hosoya M, Mori S, Shigeta S, Suzuki H. Effective ribavirin concentration in hamster brains for antiviral chemotherapy for subacute sclerosing panencephalitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 40: 241-243, 1996.
- 15 Ogle JW, Toltsis P, Parker WD, et al. Oral

- ribavirin therapy for subacute sclerosing panencephalitis. *J Infect Dis* 159: 748-750, 1989.
- 16 Hosoya M, Shigeta S, Tomoda A, et al. High-dose intravenous ribavirin therapy for subacute sclerosing panencephalitis. *Antimicrob Agents Chemother*. 45: 943-945, 2001.
- 17 Tomoda A, Shiraishi S, Hosoya M, Hamada A, Miike T. Combined treatment with interferon- $\alpha$  and ribavirin for SSPE. *Pediatr Neurol*. 24: 54-59, 2001.
- 18 Stephen BT, Ramel AC, Cormac AO. Intraparenchymal alpha-interferon and intraventricular ribavirin for subacute sclerosing panencephalitis (SSPE). *Neurology* 54: A430, 2000.
- 19 Hosoya M, Mori S, Tomoda A, et al. Pharmacokinetics and effects of ribavirin following intraventricular administration for treatment of subacute sclerosing panencephalitis. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 4631-4635, 2004.

## 特別講演

## iPS細胞を用いた神経系の再生研究

岡野栄之

**【要旨】**我々は、「一度、損傷を受けた中枢神経系は二度と再生しない」というカハールのドグマにチャレンジするために、幹細胞を用いた神経系の再生戦略に取り組んできた。iPS (induced Pluripotent Stem) 細胞は、体細胞に多能性誘導遺伝子 (Oct4, Sox2, Klf4, cMycなど) を導入することで樹立され、神経や心筋細胞や肝臓等の3胚葉性の分化能すなわち多能性を有している。私たちは、まずマウスのiPS細胞を使って神経系細胞を誘導し、脊髄損傷動物モデルに移植して安全性と有効性を示した。また本稿では、iPS細胞を用いた神経再生の臨床応用への道筋についても議論したい。

Key words:	脊髄損傷	spinal cord injury
iPS細胞		iPS cell
幹細胞		stem cell
移植		transplantation
レトロウイルス		retrovirus

## ■脊髄損傷に対する再生医療の開発

脊髄損傷は、損傷脊髄内の5～10%の軸索が損傷を免れるかあるいは再生できれば、臨床では機能的にかなりの改善が期待できるものと考えられている。我々は、再生医療の開発により、この問題に取り組んできた。この時考えなければならないのが、脊髄損傷の病態の時系列な変化である<sup>1)</sup>。これは、損傷後の時間の経過とともに病態が刻々と変化し、急性期(損傷後数日以内)には炎症性サイトカイン誘導、プロテアーゼ活性、NO産生、興奮性アミノ酸による細胞死といった二次損傷が生じる。亜急性期(損傷後2～3週間)に入ると神経細胞死が起きて反応性のグリアの増殖と肥大、そしてグリア瘢痕が生じ、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンが発現して、これが固有の受容体を活性化し、その下流では低分子量G蛋白質のRhoを活性化し、神経軸索の再生をブロックすることが知られている。

私たちは、急性期の炎症が終息した後、グリア瘢痕ができるまでのいわゆる亜急性期と言われる時期に神経幹細胞を移植すると、最も治療効果が上がる

ことを齧歯類、霊長類を用いた脊髄損傷モデルで明らかにしてきた<sup>2)～6)</sup>。また、セマフォリン3A阻害薬<sup>7)</sup>などの神経軸索の再生を誘導する薬剤やリハビリテーションを併用して、これまで困難だった慢性期患者に対する治療の開発研究を行ってきた。特に、我々は大日本住友製薬との共同チームを組んで、神経軸索の伸長を妨げる生体内タンパク質セマフォリン3Aの選択的阻害剤SM-216289が、損傷した脊髄の再生を誘導し、機能回復を引き起こすことをラットの脊髄損傷モデルを用いて明らかにした。脊髄損傷モデル成体ラット(第8胸椎レベルでの完全切断モデル)へSM-216289を4週間に渡って投与し、損傷14週間後に解析したところ、SM-216289投与群では対照群と比較して有意に神経軸索の再生が誘導されることを確認した。また神経軸索の再生以外に、損傷部に末梢神経タイプのミエリン形成細胞であるシュワン細胞が移動し、再生したと思われる軸索に対して末梢神経型のミエリンの形成を誘導し、損傷部における細胞死の抑制や血管新生などの種々の再生機転を促していることを明らかにした。この結果は、本薬剤またはその類似化合物が、脊髄損傷治療

薬となることを示唆しているといえよう。また現在我々は、セマフォリン3Aとリハビリテーションの併用による脊髄損傷の実験的治療を行っている。

これまでげつ歯類(マウス、ラット)に加え、コモンマーモセットという小型霊長類の脊髄損傷モデルを作製し、ヒト胎児由来の神経幹細胞を移植して安全性や有効性を確認してきた<sup>2), 4), 5)</sup>。しかし、胎児組織由来の幹細胞は、倫理的な問題のため、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」の対象外となっている。そこで脊髄再生を目指した幹細胞治療のソースとして、成体組織から調整できる細胞すなわち、iPS細胞由来神経幹細胞や神経堤由来幹細胞に着目し、研究を進めている。

iPS細胞技術は、京都大学の山中伸弥教授らによって開発されたものである。最初の報告では、マウスの線維芽細胞等を含む体細胞にレトロウイルス法を用いて4つの転写因子(Oct4、Sox2、c-Myc、Klf4)を導入することにより、ES細胞様の細胞にリプログラミングされることを2006年に明らかにした<sup>6)</sup>。翌2007年にはヒトiPS細胞の樹立に成功している<sup>7)</sup>。

iPS細胞を用いた脊髄再生は、ヒトの皮膚細胞を採取し、iPS細胞を作製して神経系の細胞に分化誘導して本人に移植する治療の可能性について考えて見よう。皮膚の細胞培養に約1週間、iPS細胞作製に2~3ヶ月、神経系細胞誘導に2~3ヶ月、その増殖にも時間が必要となる。さらに安全性確認として、免疫不全動物に移植し腫瘍原性がないことを半年間観察するため、総和すると線維芽細胞の培養を始めてから2年近くの期間が必要であると計算される。一方、ヒトの場合、受傷後1年で、いわゆる慢性期となる。そのため、損傷後にiPS細胞を樹立するのでは間に合わない計算となる。その解決策として、多様なHLAに対応するiPS細胞を樹立し、腫瘍原性のないiPS細胞株を選択し、臨床グレードの細胞ストックを用意し、iPS細胞バンクを構築し、さらにそれらを神経系へと分化誘導した神経細胞バンクを用意することが重要であると考えている。これを準備することにより、いつでも、誰にでも移植ができるようになり、移植時期の問題は解決できるものと期待できる。幸い、昨年(2010年)の11月1日に改定された厚生労働省「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」ではiPS細胞が対象になっている。では、iPS細胞を用いた脊髄再生の臨床応用を実現するためには、どのような道筋・戦略が必要となる

のであろうか?

### ■脊髄損傷に対する“安全な”マウス iPS細胞株由来神経幹細胞の移植

体細胞からiPS細胞へのリプログラミングは多くの段階を経て徐々に進むものと考えられている。マウスさらにはヒトにおいて、c-Mycという腫瘍遺伝子を導入しなくともiPS細胞が樹立できることが示されている<sup>10)</sup>。一方、我々は山中教授らとの共同研究で、iPS細胞から分化誘導した神経前駆細胞の腫瘍原性は、iPS細胞の起源となる体細胞の腫瘍原性に関係していることを明らかにした<sup>11)</sup>。すなわち、これまでに山中研究室で樹立されたマウスiPS細胞36株を用いて、胚様体形成を経て、ニューロスフェアの形成(神経系への分化誘導)を行い、免疫不全(NOD/SCID)マウスの脳の線条体へ移植することにより、*in vitro*での分化能力と移植後の安全性(腫瘍原性)の評価を行った。その結果、解析したほぼすべてのiPS細胞株は、ニューロスフェア形成能を有していた(すなわち神経系に分化可能であった)。しかしながら、フローサイトメトリーによって詳細に解析したところ、iPS細胞由来のニューロスフェア中に残存する多能性幹細胞マーカーであるNanog-EGFP陽性の未分化細胞の割合は、iPS細胞の由来となった体細胞の種類により大きく異なっていることが明らかとなった。すなわち、胎仔線維芽細胞(MEF)由来iPS細胞株はES細胞と同等の神経分化誘導への応答性を示し、ニューロスフェア中に未分化細胞はほとんど残存していなかった。また、ニューロスフェア中に残存するNanog-EGFP陽性の未分化細胞の割合は、テラトーマ形成能と強い正の相関があることが明らかとなった。つまり、MEF-iPS細胞株由来ニューロスフェアを移植したマウス群における移植後のテラトーマ形成は、ES細胞株由来ニューロスフェア移植群と同等に低頻度且つ軽微であった。また、成体胃上皮細胞(Stm)から作製したiPS細胞2株の移植群においては、16週の観察期間中にテラトーマ形成は観察されなかった。一方、成体尾線維芽細胞(Tail-Tip Fibroblast, TTF)由来のiPS細胞株は有意に分化抵抗性を示し、分化誘導後のニューロスフェア中に多くの未分化細胞が残存していた。これらのTTF-iPS由来ニューロスフェア移植マウス群においては、有意に大きなテラトーマ形成が観察され、多くのマウスが短期間のうちに衰弱もしくは死亡した。成体肝細胞(Hep)由来iPS細胞株の分化誘導への応答性および腫瘍形成能は、MEF-

iPS細胞株とTTF-iPS細胞株の中間であった。一方で、意外にもc-Mycの導入の有無や樹立時のレポーターによる初期化細胞の選抜の有無は、iPS細胞の分化誘導への応答性や移植後の安全性に影響を与えたかった<sup>11), 12)</sup>。

次に実際に、マウスの胸髄損傷モデルを作製して、腫瘍原性のないiPS細胞から分化誘導した神経前駆細胞を損傷9日目のモデルマウスに移植をおこなった<sup>13)</sup>。移植していないマウスは損傷後49日を経ても後肢が麻痺したままで、後肢に荷重して立ち上ることとはできなかった。一方、移植したマウスは前肢と後肢の協調運動も一部回復し、後肢に荷重して立ち上るまでに機能改善が観察された。つまり、安全性を担保したiPS細胞由来の神経前駆細胞を使用すると、ES細胞由来の神経前駆細胞と同等の治療効果が得られることが示された。この機能回復は、脊髄損傷に伴う萎縮性変化および神経軸索の脱髓の抑制に加え、後肢の運動機能と密接な関連のある縫線核脊髄路のセロトニン作動性ニューロンの軸索伸展の促進や、移植細胞による再髓鞘化等の効果によるものと考えられる。また、この機能回復のメカニズムについては、後ほど詳しく述べたい。

さらに我々は、より現実的な臨床応用モデルとして、成体組織(TTF)由来のiPS細胞株を用いて、同様の移植実験を行った。前述の安全性の検討の中で使用したTTF由来iPS細胞6株のうち、安全であったのは、1クローンのみであった。この“安全な”TTF由来細胞1株と、腫瘍形成能が認められた“危険な”TTF由来iPS細胞2株について、ニューロスフェアへの分化誘導後に、脊髄損傷モデルマウスへの移植を行った。その結果、全てのTTF-iPS株由来ニューロスフェア移植群において、機能回復が見られたものの、“危険な”TTF-iPS株由来ニューロスフェア移植群においては、一時的に得られていた機能回復が損傷後6週の時点で失われ、かつ大多数のマウスが死亡することが観察された。一方で“安全な”TTF-iPS株由来ニューロスフェア移植群においては、腫瘍形成は見られず、機能回復が得られることが判明した。このことから、iPS細胞は、移植後の安全性に関しては非常に株間のばらつきが大きいものの、厳密にその安全性を事前に検討すれば、脊髄損傷治療への有用な細胞源となり得る可能性が示された<sup>12)</sup>。

この細胞移植による機能回復のメカニズムを考えてみよう。iPS細胞/ES細胞から誘導したニューロスフェアをマウスに移植すると、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトへと分化する。

このiPS細胞由来のオリゴデンドロサイトは損傷脊髄内で再髓鞘化を行うことが示された。幼弱なアストロサイトは神経栄養因子を発現、血管新生を誘導して周辺細胞のアポトーシスを抑制、セロトニン作動性ニューロンの軸索産生を促すものと考えられる。またiPS細胞由来の神経細胞は、ホストのニューロンとシナプスを形成していることが明らかとなった。すなわちiPS細胞/ES細胞から誘導したニューロスフェア移植によってもたらされたニューロン-ニューロン相互作用、ニューロン-グリア相互作用が総合して運動機能の回復に結びつくものと考えられた。

## 今後の展望

これまでの我々の研究により、マウス<sup>13)</sup>およびヒト(論文投稿中)の安全なiPS細胞由来神経前駆細胞を移植することにより、マウスおよびサルト(論文投稿準備中)の脊髄損傷モデルの機能回復に成功している。今後臨床応用へと進むにあたって、安全性の担保が何よりも重要である。そのためには、ゲノムに挿入がないiPS細胞の作成のみならず、適切な起源細胞の選択、セルソーターによる解析、遺伝子発現の詳細な解析、reprogrammingの程度の解析、免疫不全マウスへの移植と長期間の造腫瘍性の解析などが必要であろう。さらに、このiPS細胞技術は再生医療への応用だけでなく、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症等の疾患の原因解明や病態解明、また医薬品の開発や副作用の評価等への応用も期待されている。

## 文献

- 1) Okano H. Neural stem cells and strategies for the regeneration of the central nervous system. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* 2010; 86: 438-450.
- 2) Okano, H. (2002) Neural stem cells: progression of basic research and perspective for clinical application. *Keio J. Med.* 51: 115-128, 2002.
- 3) Ogawa Y, Sawamoto K, Miyata T et al. (2002) Transplantation of in vitro-expanded fetal neural progenitor cells results in neurogenesis and functional recovery after spinal cord contusion injury in adult rats. *J. Neurosci. Res.* 69: 925-933.

- 4) Iwanami A, Yamane J, Katoh H et al. (2005): Establishment of Graded Spinal Cord Injury Model in a Non-human Primate: the Common Marmoset. *J.Neurosci, Res.* 80: 172-181.
- 5) Iwanami, A., Kakneko, S., Nakamura, M., et al. (2005) Transplantation of human neural stem/progenitor cells promotes functional recovery after spinal cord injury in common marmoset. *J. Neurosci.,Res.* 80: 182-190.
- 6) Okada S, Ishii K, Yamane J et al. (2005): In vivo imaging of engrafted neural stem cells: its application in evaluating the optimal timing of transplantation for spinal cord injury. *FASEB J.* 19:1839-41, 2005
- 7) Kaneko S, Iwanami A, Nakamura M et al., (2006) A selective Sema3A-inhibitor enhances regenerative responses and functional recovery of the injured spinal cord. *Nat.Med.* 12(12): 1380-1389, 2006.
- 8) Takahashi, K., Yamanaka, S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663-676
- 9) Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M. et al., (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131: 861-872.
- 10) Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K et al., 2008. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol.* 26(1):101-106.
- 11) Miura K, Okada Y, Aoi T, et al., (2009) Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines *Nat Biotechnol.* 27: 743-745.
- 12) 三浦 恭子, 辻 収彦, 岡野 栄之 (2010) iPS細胞の安全性の担保 9 (3): 315-322, 2010.
- 13) Tsuji O, Miura K, Okada Y, et al. (2010). Therapeutic effect of the appropriately evaluated ‘safe’ iPS cells for spinal cord injury. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 107:12704-12709.

## 教育講演 1

## フラビウイルス脳炎とその病態

高崎智彦

**【要旨】** フラビウイルス脳炎は、節足動物によって媒介されるフラビウイルス科フラビウイルス属のウイルスによって発症する急性熱性脳炎の総称である。わが国には、日本脳炎ウイルスが常在し、北海道にはダニによって媒介されるダニ媒介性脳炎ウイルスが存在する。脳炎にいたればその病態はほぼ類似であるが、他の病態や臨床経過は異なる点もある。これらのウイルスは、蚊によって媒介される感染症であり、近年その流行が世界的規模で問題となっている。特に1999年にニューヨークで流行が確認されたウエストナイル熱・脳炎は、北米から中南米に拡大し、2010年夏の時点でその流行は終息せず、ギリシャでも流行が発生した。

Key words: フラビウイルス、日本脳炎、ウエストナイル脳炎、ダニ媒介性脳炎、輸入感染症

## はじめに

フラビウイルス科フラビウイルス属のウイルスには、黄熱ウイルス、デングウイルスと脳炎を起こすウイルスとして日本脳炎血清型群として分類されるウイルス群、ダニ媒介性脳炎ウイルス群のウイルスが存在する。日本脳炎やウエストナイル脳炎は蚊によってウイルスが媒介され、ダニ媒介性脳炎ウイルスは、ダニによって媒介される。本邦におけるフラビウイルス脳炎は、日本脳炎ウイルスが常在し、北海道にダニ媒介性脳炎(ロシア春夏脳炎)ウイルスが常在する。一方、北米で1999年以来、流行が続いているウエストナイル脳炎は、輸入感染症として重要である。フラビウイルス脳炎を臨床的に鑑別診断することは困難であり、確定診断には病原体診断と血清学的検査が重要である。

## 1. フラビウイルス感染症

フラビウイルス属のウイルスには、約70種類のウイルスが分類されている。その名称はラテン語で黄色を意味する *flavus* に由来し、多くは節足動物により媒介されるという伝播様式からアルボウイルス(節足動物媒介性ウイルス)とも呼ばれる。脳炎を発症するウイルスには、蚊によって媒介される日本

脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルス、クンジンウイルス、マレーバレー脳炎ウイルス、セントルイス脳炎ウイルスなどの日本脳炎血清型群のウイルスと、ダニによって媒介されるロシア春夏脳炎ウイルス、中央ヨーロッパ脳炎ウイルス、北米ポワッサン脳炎ウイルスなどのダニ媒介性脳炎群のウイルスが挙げられる(図1)。

## 2. フラビウイルスの構造と機能

フラビウイルスはプラス一本鎖のRNAウイルスである。その形態は、直径40-50nmの球形ウイルスで、エンベロープを有する。ウイルス遺伝子は約11kbである。5'末端には約100塩基、3'末端には約600塩基からなる非翻訳領域がある。5'末端側にC,prM,Eの構造蛋白をコードする遺伝子があり、それぞれC、prM、E蛋白を作る。prM蛋白はウイルス成熟過程で転換酵素フリン(furin)により切斷されM蛋白となる。E蛋白は中和抗体、赤血球凝集阻止(HI)抗体が認識する蛋白で約54kDの大きさである。Eに続いてNS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B、NS5の7種類の非構造タンパクをコードする遺伝子が3末端側にある。非構造蛋白の機能については断片的に解明されているが不明な部分も多い。

図1

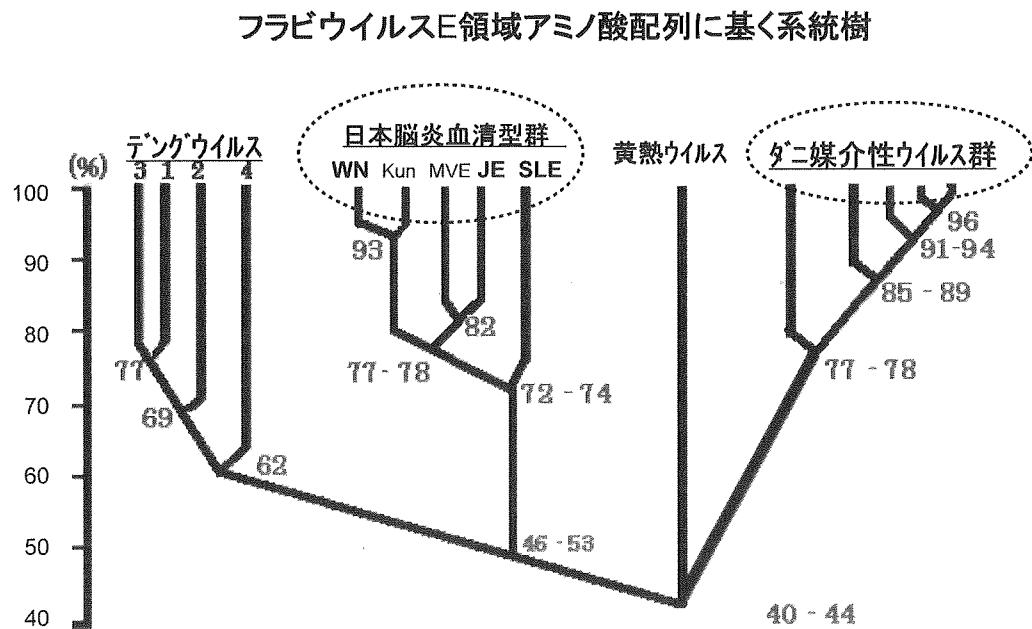


図1 フラビウイルスE領域アミノ酸配列に基づく系統樹

フラビウイルス属のウイルスは、ダニ媒介性脳炎ウイルス群、黄熱ウイルス、日本脳炎血清型群、テングウイルスの4つのグループに分類され、ダニ媒介性脳炎ウイルス群と日本脳炎血清型群のウイルスが脳炎をおこす。WN: ウエストナイルウイルス、Kun: クンジンウイルス、MVE: マレーバレー脳炎ウイルス、JE: 日本脳炎ウイルス、SLE: セントルイス脳炎ウイルス。楕円で囲ったウイルス群が脳炎を起こすウイルスである。

### 3. 日本脳炎

日本脳炎は、日本脳炎ウイルスを持った蚊に刺されることでウイルスに感染し、体の中で増えたウイルスが脳や脊髄に侵入して発病する。日本脳炎ウイルスは、主に增幅動物の体内で大量に増殖し、その血を吸った蚊が感染しウイルスは蚊の体内(唾液腺など)で増殖し、時に人や馬を刺して脳炎を引き起こす。ヒトやウマは自然界では終末宿主である。日本などの温帯では水田で発生するコガタアカイエカが媒介するが、熱帯ではその他数種類の蚊が媒介することが知られている。ブタは、特にコガタアカイエカに好まれること、肥育期間が短かく毎年感受性のある個体が多数供給されること、ウイルス血症が高いことなどから、効率のよい增幅動物となっている。しかし、ブタに近縁のイノシシやある種の鳥が增幅動物になっている可能性も指摘されている<sup>1)</sup>。患者は蚊が活動する初夏から秋にかけて、通常関東より西の地域で発生する。また、東アジアや東南アジアでも日本脳炎が流行しており、これらの国で感染する危険性もある。

潜伏期間は6日から16日くらいで、初発症状は発熱・倦怠感・頭痛・恶心・嘔吐などで、その後高熱が出て意識障害が出現し、項部硬直、振戦、筋硬直、不随意運動、あるいは麻痺症状ができる。脳炎が進行すると、脳浮腫による脳圧亢進、けいれんや呼吸不全をきたす。しかし日本脳炎ウイルスといつても、必ずしも脳炎だけをおこすわけではなく、髄膜炎や脊髄炎をおこすこともある。また、ウイルスをもつた蚊に刺されても発症する人は、100人から1000人に一人程度である。

#### 1) 日本脳炎の臨床像

日本脳炎ウイルスは不顕性感染率が高く、感染しても発病する(髄膜炎や脊髄炎も含まれる)のは、百人~千人に一人程度である。しかし、脳炎を発症した場合きわめて重篤であり、脳炎患者の20~30%は死亡し、約半数は何らかの後遺症を残す。潜伏期間は6日から16日で、初発症状は発熱・倦怠感・頭痛・恶心・嘔吐などで、その後高熱が出て意識障害が出現し、項部硬直、振戦、筋硬直、不随意運動、あるいは麻痺症状が出現し、進行にともない、脳浮腫による脳圧亢進、けいれんや呼吸不全をきたす。

特異的治療法はなく対症療法が中心となる。早期に診断し、脳圧降下・けいれんの予防・呼吸管理・発熱への対策・合併症の予防を中心に治療する。治療が長期化することが多いため、肺炎などの合併症の予防や早期発見も重要である。

日本脳炎の臨床検査上特に注意すべき点は、発病早期(1~2日後)の髄液検査では、むしろ多核球優位の細胞増加を示す場合があることである。平石らも1967年に、多核球優位の髄液所見を示す症例があることを報告している<sup>2)</sup>。

## 2) 治療と予防

日本脳炎の予後が30年前と比較しても死亡例は減少したが、治癒例は約3分の1とほとんど変化しておらず、治療の難しさは明らかである。従って日本脳炎には予防が最も有効である。マウス脳由来不活化日本脳炎ワクチンは、日本だけでなく東南アジア・東アジアにおける日本脳炎の制圧、コントロールに大きく寄与してきた。しかし、わが国では現在2009年に製造承認された細胞培養日本脳炎不活化ワクチンが使用されている。中国で1988年より主として使用されている弱毒生ワクチン(SA14-14-2株)は初代ハムスター腎臓細胞で増殖させて製造されている。弱毒生ワクチンは製造単価が安いという利点があるが、このワクチンの生産と品質の水準を、国際的基準に適合させる必要があり、そのための努力が現在行なわれている。中国では細胞培養不活化ワクチンも製造されている。

## 4. ウエストナイル熱・脳炎

ウエストナイルウイルス(WNV)もフラビウイルス科フラビウイルス属のRNAウイルスである。日本脳炎血清型群に分類される<sup>3)</sup>。1937年にアフリカウガンダのWest Nile地方の発熱患者から分離され、アフリカ、ヨーロッパ、西アジアなど広範囲に分布している。オーストラリアに常在するクンジンウイルスは、遺伝子学的にウエストナイルウイルスと考えられている。WNVは生態系においては鳥と蚊の間で感染環が形成され、主に蚊(イエカ、ヤブカなど60種類以上の蚊が媒介可能)を介してヒトに感染し、ウエストナイル熱や脳炎を引き起こす。WNVの場合には都会に生息する蚊とカラスやスズメなどの野鳥との間で感染環が成立するため、日本脳炎と異なり都市部でも流行するという特徴がある。また300種類もの鳥が固有宿主と考えられており、ウイルスの活動が広範囲に拡大する可能性が高い。通常、直接ヒトからヒトへの感染はないと言われているが、

輸血、臓器移植、母乳を介した感染の報告例がある。

1999年に米国ニューヨーク市及び周辺地域で大きな流行が確認され、このウイルスは1998年に分離されたイスラエルの株に近似していることが遺伝子解析の結果から明らかになった<sup>4)</sup>。従来の流行に比べ現在の北米の流行では神経症状の合併例が多いという特徴がある。わが国への輸入症例としては、2005年にペルトリコ、ロサンゼルスへの旅行後WN熱と診断された輸入症例が一例報告されている<sup>5)</sup>。また、すでに治癒していたため届出されなかったが、やはり2005年にロサンゼルスでWNVに感染した日本人留学生症例も確認されている。

### 1) ウエストナイル熱・脳炎の臨床像

#### ウエストナイル熱

潜伏期は2~6日である。典型的な症状は発熱、強い倦怠感、頭痛、筋力低下、集中力の欠如などであり急性期の症状は3から10日程度持続する。北米の流行では胸背部中心の丘疹の出現率が高く、約半数の症例で認められる。30%の症例で著明な搔痒感や痛みを伴う。眼窩痛、咽頭炎、嘔気、嘔吐、下痢、腹痛などが認められることもある。

#### ウエストナイル脳炎

主な症状は発熱、頭痛、筋力低下、弛緩性麻痺などである。そのほかの神経学的症状としては振戦、ミオクロース、パーキンソン症状、顔面神経麻痺などの報告もある。神経病変は脳幹部や脊髄前角細胞に認められる。明らかな髄膜炎・脳炎の症状を呈さずにポリオ様の脊髄炎を起こしたり、ギラン・バレー症候群様の筋力低下を来たすこともある<sup>6)</sup>。実際、この筋力低下はポリニューロパチーの結果であり、剖検例からも脊髄神経根に著明な炎症所見を認めたと報告されている<sup>7)</sup>。その他、網膜脈絡膜炎や虹彩炎がしばしば報告されている。脈絡膜病変は多巣性である。チュニジアの報告ではWN感染者のうち80%の症例で多巣性脈絡膜炎を呈し、軽度の硝子体炎が認められた。ほとんどの患者は無症候性であるが長期的な予後は不明である。また横紋筋融解症、肝炎、脾炎、心筋炎、中枢性尿崩症の合併の報告もある。デング出血熱のような出血症状を呈することはまれである。

## 2) 治療と予防

特異的な治療法はまだないため、対症療法が基本である。ウエストナイル脳炎に関しても、ダニ媒介性脳炎同様に、米国でウエストナイルウイルスに高い中和抗体を有するγ-グロブリン製剤(Omr-IgG-am®)が、免疫不全患者や移植患者のウエストナイ

ルウイルス感染者を対象に臨床試験中である。

ワクチンに関しては、日本脳炎とダニ媒介性脳炎に対しては実用化されたワクチンが存在する。ウエストナイルウイルスに対するヒト用のワクチンは、現在開発中で臨床試験段階である。ヒトのワクチンはまだ実用化されていない。

## 5. ダニ媒介性脳炎

ダニ媒介性脳炎ウイルス群にはダニ媒介性ウイルスを含めて14のウイルス種からなるが、このうち8種類がヒトにダニ媒介性脳炎、跳躍病、キャサヌール森林病、オムスク出血熱、ポアサン脳炎などの病気をおこす。ダニ媒介性脳炎はヨーロッパからロシア極東地域にかけて広く分布し、ウイルスはマダニとノネズミなどの小型野生哺乳類の間で感染環が維持されている。主なものとしてロシア春夏脳炎と中央ヨーロッパ脳炎がある。ロシア春夏脳炎は、我国でも[REDACTED]年に北海道渡島支庁管内の酪農家の主婦が本疾患に罹患した報告<sup>8)</sup>があり、ロシア春夏脳炎ウイルスが道南地域に広範に分布していることが判明した。

### 1) ダニ媒介性脳炎の臨床症状

脳炎をおこす危険性は、年齢とともに高くなる。45歳以下では脳炎(脊髄炎を含む)は髄膜炎患者より少ないが、60歳以上では70%以上が脳炎を発症する。

#### a) 中央ヨーロッパダニ媒介性脳炎

潜伏期間は、7から14日であり、二相性の病状を呈する。第一期は、インフルエンザ様の発熱(38℃以上の高熱)・頭痛・筋肉痛が2日から8日間続く。この第一期は約3分の1の症例で認められない場合もある。解熱後1日から20日間(多くは2-4日)は症状が消え、その後第二期にはいり発熱とともに痙攣・眩暈・知覚異常などの中枢神経系症状を呈する。脳炎、髄膜炎あるいは髄膜炎であることもあるが、通常脊髄炎は伴わない。麻痺症状は報告によってばらつきがあるが、3~23%に認められる。死亡率は1~5%とされている。後遺症としては、感覚障害が主なものであるが、平行障害、感音性難聴などもある。後遺症の頻度は35%~60%とされている。疾患の重篤度は、ヨーロッパの東から西に移るにつれて低下する。

#### b) ロシア春夏脳炎

潜伏期間は、7から14日であるが、中央ヨーロッパ脳炎のような二相性の病状は呈さない。発症は比較的緩やかであり、潜伏期の後に前駆症状として頭

痛・発熱・恶心・嘔吐・羞明が見られ、極期には精神錯乱・昏睡・痙攣および麻痺などの脳炎症状が出現することもある。致死率は20~30%、後遺症の頻度は30~80%と、中央ヨーロッパ脳炎より高い。死亡する場合は、発症後1週間程度であることが多い。また、出血熱を伴ったロシア春夏脳炎8症例が1999年に報告されている<sup>9)</sup>。

### 2) 治療と予防

ヨーロッパでは不活化ワクチンが使用されている。しかし、ワクチン接種率は、積極的に予防接種を勧めているオーストリアの87%を除いて、その他の国では10%程度である。

ダニ媒介性脳炎に対する特異的治療法はない。予防接種未接種で、流行地の森林でダニに刺された場合、γ-グロブリン製剤(オーストリア、Baxter社)を投与する。ただし副作用の問題があり、小児には使用されない。また、わが国では入手は困難である。髄膜炎あるいは脳炎を発症した場合、絶対安静の上ウイルス性急性脳炎に準じた対症療法を施す。ヒトは終宿主でありヒトからヒトへの感染はないので隔離する必要はない。しかしヒトへの感染は、ダニによる刺咬だけでなく感染したヤギやヒツジの生乳を飲んだり、生乳から作ったチーズを食べても感染する<sup>10)</sup>。

## 6. セントルイス脳炎

セントルイス脳炎ウイルスはアメリカ合衆国、カナダ、メキシコ、中南米に広く分布し、フラビウイルス属日本脳炎血清型群に分類されるウイルスで蚊によって媒介される。セントルイス脳炎ウイルスは、アメリカ合衆国東部、西部、南アメリカに由来する3つの遺伝子型に分類される。日本のアカイエカ、チカイエカ、熱帯イエカなどが媒介能力を有する。その感染環は鳥と蚊の間で形成されている。アメリカ合衆国東部においては、何年かごとに流行を繰り返しているが、西部では四季を通じて散発的に発生している。感染経路は自然界では蚊によってのみ媒介され、ヒトからヒトへ、あるいは鳥からヒトへといった感染経路は存在しない。潜伏期間は4から21日である。病理的变化は中枢神経のみと報告されているが、ウイルスは肺・肝・脾・腎臓・硝子体液からも分離される。臨床的には、日本脳炎やウエストナイル脳炎に類似で、疾患の重症度は年齢とともに増加する。

## 7. マレーバレー脳炎

マレーバレー脳炎ウイルスは、フラビウイルス属日本脳炎血清型群に分類され、オーストラリアに常 在するが、流行は比較的小規模であったり、散発例であったりする。やはり蚊と鳥類で感染環が維持され、臨床的には、日本脳炎に類似の病像を呈する。

## 8. フラビウイルスによる脳炎に 共通する検査所見

一般にフラビウイルス脳炎では以下のような検査所見を呈する。

- ① 血液検査所見：末梢血白血球数は正常か軽度上昇。中枢神経症状を合併した場合は髄液の白血球数は増加し(通常はリンパ球優位)蛋白濃度も上昇するが糖値の低下は認められない。ただし髄膜炎、脳炎いずれでも髄液中の細胞数が正常な症例もあるため注意を要する(それぞれ3%, 5%程度)。
- ② 画像所見：頭部CTは急性期には典型的な像は示さない。WN脳炎患者の約30%はMRI T2強調画像で大脳基底核、視床、脳幹、脳軟膜、脳室周囲、脊髄の増強効果が認められるとの報告がある。
- ③ 脳波：脳炎を呈している患者では全般性の徐波を認める。特に前頭葉、側頭葉で著明である。急性弛緩性麻痺を呈した患者では知覚神経の伝導は正常であるが、運動神経伝導の低下が認められる。

## 7. フラビウイルス脳炎の実験室診断

我が国においては、蚊が活動する時期のウイルス性髄膜炎、脳炎、脊髄炎を呈するような場合は必ず、日本脳炎を疑わなくてはならない。また、北海道には日本脳炎ウイルスだけでなく、ダニ媒介性脳炎ウイルスも存在するため、鑑別疾患として念頭に置く必要がある。

海外からの帰国者で原因不明の急性熱性疾患で髄膜炎、脳炎、脊髄炎を呈する患者はウエストナイル脳炎を念頭に置く必要がある。海外での流行状況は診断上重要な情報となりうる。フラビウイルス脳炎を疑われる患者を診察した際、まず行うべき検査としては髄液あるいは血液からのRT-PCR法によるウイルス遺伝子の検出、ウイルス分離などの病原体診断と血清学的診断である<sup>11)</sup>。

## 8. おわりに

フラビウイルス脳炎、特に我が国に常在する日本脳炎、ダニ媒介性脳炎そして輸入感染症として重要なウエストナイル脳炎を中心に述べたが、フラビウイルス属にはその他セントルイス脳炎ウイルス、マレーバレー脳炎ウイルスも日本脳炎同様の脳炎を引き起こすウイルスである。また、トガウイルス科のウイルスにも蚊を媒介として脳炎を引き起こすウイルスがある。アメリカ大陸に常在する東部ウマ脳炎ウイルス、西部ウマ脳炎ウイルス、ベネズエラウマ脳炎ウイルスである。これらのウイルスはヒトに感染するとその不顕性感染率は高いが、発病すると非常に重篤な脳炎を引き起こす。交通手段が発達し、ヒトや物流の行き来が頻繁になった現在、ウエストナイルウイルスだけでなく、これらのウイルスに対しても、現地の流行状況を把握し侵入防止対策、診断体制の整備を図る必要がある。

## 文 献

- 1) Hamano M, Lim CK, Sawabe K, Kurane I, Takasaki T, et al. Detection of antibodies to Japanese encephalitis virus in the wild boars in Hiroshima prefecture, Japan. Epidemiol Infect. 135:974-977, 2007.
- 2) 平石克平、松原義雄、角田孝穂. 日本脳炎の臨床－最近10年間の自験例を中心として－. 神經進歩11:69-88, 1967.
- 3) 高崎智彦. : ウエストナイル熱・脳炎. ウイルス .57:199-205, 2007
- 4) Lanciotti RS, Roerhig JT, Deubel V, Smith J, Parker M, et al. Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in northeastern United States. Science 286:2333-2337, 1999.
- 5) 小泉加奈子、他：本邦で初めて確認されたウエストナイル熱の輸入症例. 感染症学雑誌 80:56-57, 2006.
- 6) Sampson BA, Ambrosi C, Charlot A, Reiber K, Veress JF, et al. The pathology of human West Nile virus infection. Human Pathology 31:527-531, 2000.
- 7) CDC. Acute flaccid paralysis syndrome associated with West Nile virus infection – Mississippi and Louisiana, July-August MMWR 51:825-828, 2002.

- 8) Takashima I, Morita K, Chiba M, Hayasaka D, Sato T et al. A case of tick-borne encephalitis in Japan and isolation of the virus. *J Clin Microbiol* 35:1943-47, 1997
- 9) Labuda M., Elecková E, Licková M, Sabó A. Tick-borne encephalitis virus foci in Slovakia. *Int J Med Microbiol.* 291 Suppl 33:43-7, 2002.
- 10) 高崎智彦. ワクチンの最新事情と渡航者の接種－ダニ媒介性脳炎ワクチン. *日本医事新報* 4362:101-104, 2007.
- 11) 高崎智彦：ウエストナイル熱の診断と検査. *臨床とウイルス* 33:22-27, 2005

## 教育講演 2

## ウィルス性脳炎との鑑別診断に重要な自己抗体介在性脳炎

田中惠子

**【要旨】** 急性脳炎では、原因にもとづく速やかな治療導入が良好な予後を得る上で重要である。ヘルペス脳炎が否定された場合、自己免疫性、傍腫瘍性脳炎・脳症の鑑別が必要であるが、その診断に有用な情報を与えるのが、病型に密接に関連する自己抗体の検出である。近年、脳炎・脳症では様々な自己抗体が明らかにされており、抗体診断の重要性が増している。

抗体が反応する抗原の局在により、疾患の背景、治療反応性が異なる。細胞内抗原に対する抗体を生じる群では、悪性腫瘍の合併が多く治療抵抗性であるのに対し、細胞表面抗原に対する抗体を生じる場合は、腫瘍に関連しない自己免疫疾患に分類される疾患が多く、免疫療法に反応するものが多い。

Key words: 細胞表面抗原、細胞内抗原、抗NMDA受容体抗体、辺縁系脳炎、奇形腫  
cell surface antigen, intracellular antigen, anti-NMDA receptor antibody,  
limbic encephalitis, teratoma

## 1.はじめに

急性の経過で、頭痛、発熱、精神症状、意識障害、けいれんなどの脳炎症状を呈する場合、まずはヘルペス脳炎を念頭に置いて治療を開始し、並行してその他のウィルスを含めた病原体の同定を進めることになる。感染性である可能性が低い場合は、自己免疫性、傍腫瘍性脳炎・脳症の鑑別診断が必要になる。原因を明らかにし、速やかに治療を開始することは、良好な予後を得る上で極めて重要であるが、原因同定には困難を伴う場合が多い。診断のツールとして重要な位置を占めるのが、病型に密接に関連する自己抗体の検出である。近年、脳炎症状に関わる様々な自己抗体が明らかにされており、抗体の除去療法が症状の改善をもたらすことから、抗体診断の重要性が増している。

これらの抗体の多くは、ニューロンやグリアの細胞表面に発現する受容体・チャネルに対するものであり、それぞれの対応抗原を細胞膜上に発現させる cell-based assay、または免疫沈降法を用いる系で抗体検査がなされる場合が多い。このようにして検出される自己抗体としては、以前から抗 voltage-

gated potassium channel (VGKC) 抗体を有する群が知られているが<sup>1)</sup>、最近ニューロンのシナプスに発現して刺激伝達を担う受容体に反応する抗体を生じる脳炎・脳症が相次いで明らかになっている。

一方、従来から亜急性の経過で脳炎・脳症を生じる症例の中に、悪性腫瘍が潜在し、その原発巣と関連して生じる自己抗体が検出される例が、傍腫瘍性神経症候群として知られていた。従来の抗体検出法は、神経組織を用いた免疫組織化学および神経組織を破碎・可溶化して抗原とするウェスタンプロットが主体であったために、比較的存在量の多い蛋白質に対する抗体が検出される場合が多かった。その多くは、細胞内に存在し、細胞の分化・生存に関わる蛋白が多い。代表的なものとして、脳脊髄炎を呈する肺小細胞癌症例に出現する抗Hu抗体や小脳失調を呈する婦人癌症例に生じる抗Yo抗体がよく知られている<sup>2)-6)</sup>。

以下に、脳炎・脳症の症候を生じ、自己抗体が関連する疾患群をとりあげる。

## 細胞表面抗原に対する抗体を生じる脳炎・脳症

細胞表面に抗原がある場合は、流血中の抗体が結合しやすいと考えられる。

このような抗体を保有する一群では、早期に抗体を除去し、抗体産生を抑制する治療が有効であることが多い。

このような抗原の多くは細胞膜に存在することから、機能分子を細胞外に表出しておらず、抗体がチャネル機能を競合的に阻害したり、補体存在下で受容体蛋白の代謝回転に影響を及ぼす可能性が考えられる。

このような抗体を有する疾患として、抗N-methyl-D-aspartic acid (NMDA)受容体抗体陽性脳炎<sup>7)8)</sup>、抗 $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionate (AMPA)受容体抗体陽性脳炎<sup>9)</sup>、抗 $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)<sub>B</sub>受容体抗体陽性脳炎<sup>10)</sup>、抗Leucine-rich glioma inactivated 1 (LGI-1)抗体（以前抗VGKC抗体陽性辺縁系脳炎と称されたものの対応抗原であることが明らかになった）を生じる辺縁系脳炎<sup>11)</sup>などがある。

### 1) 抗NMDA受容体抗体陽性脳炎

以前から本邦では、若年女性に生じる脳炎で、精神症状で始まり、経過中、けいれん重積や呼吸不全などを呈し、重篤な状態に陥るもの、長期予後の良好な一群の存在が知られていた<sup>12)</sup>。2007年に米国ペンシルベニア大のDalmauらは、このような臨床像を呈し卵巣奇形腫を合併した症例で、グルタミン酸受容体の一つであるNMDA受容体に対する自己抗体が検出されることを報告し、急速に同様の症例が集積して、一疾患単位と認知されるようになった<sup>7)</sup>。

この疾患は、先行感染のあと、記録力障害、異常行動、意識障害で発症し、痙攣、口唇・顔面または四肢の不随意運動が見られるようになり、さらに呼吸不全が生じて人工呼吸器管理が必要となる場合が多い。また、血圧変動、唾液分泌亢進、発汗異常、体温調節異常、腸蠕動異常などの高度の自律神経症状を呈することもある。卵巣奇形腫の合併が注目されたが、18歳以上の女性の場合の奇形腫合併は約60%、小児や18歳以上の男性では5%以下とされる<sup>8)</sup>。腫瘍合併例では早期の腫瘍の摘出が神経症状の改善に有効であることが示されている。また、血漿交換療法、ガンマグロブリン投与、副腎皮質ホルモン投与も有効である<sup>7)8)</sup>。

この疾患は本邦にも多いと考えられることから、

筆者らも、抗NMDA受容体抗体の検出系を確立した<sup>13)14)15)</sup>。すなわち、NMDA受容体のNR1およびNR2サブユニットを共発現させた培養細胞を抗原とし、患者血清・髄液検体を反応させる、いわゆるcell-based assayといわれる方法である。この方法で検出した抗NMDA受容体抗体を有する例は、若い女性がほとんどであり、70-80%が精神症状、痙攣発作、不随意運動、中枢性低換気、自律神経症状を呈し、55%で何らかの頭部MRI異常所見を呈し、59%に奇形腫を認めることができた。

NMDA受容体は、グリシンに結合するNR1サブユニット、グルタミン酸に結合するNR2サブユニットが重合して形成される陽イオンチャネルであり、シナプスでのシグナル伝達や可塑性に関わることが知られている。NMDA受容体の活動性亢進はneurotoxicとなり痙攣や記録力障害などの症候に関与することが考えられる。

### 2) 抗AMPA受容体抗体陽性脳炎

抗AMPA受容体抗体関連脳炎は10例（男性1名、女性9名）ほどの報告がある<sup>9)</sup>。平均発症年齢は60歳（38歳から87歳）と、抗NMDA受容体抗体陽性脳炎に比べて高齢の女性が多く、昏迷、記録力障害、睡眠障害、行動異常などで初発し、1/3の例で痙攣を呈する。この群では、奇形腫の合併はなく、肺癌、乳癌、胸腺腫瘍の合併が報告された。抗核抗体、抗GAD抗体などの他の自己抗体が併存する例が半数以上あり、頭部MRIでは側頭葉内側面の異常信号が見られた。髄液の細胞增多、蛋白増加が見られる場合が多い。腫瘍摘出と免疫療法に反応する場合が多いが再発も多いとされる。

抗AMPA受容体抗体は、抗NMDA受容体抗体の検出法と同様に、AMPAのsubunitであるGluR1およびGluR2を共発現させたHEK細胞を用いたcell-based assay法で検出される。抗AMPA受容体抗体陽性の検体を培養神経細胞に反応させると、細胞表面に発現するAMPA受容体の数の減少が見られ、抗体を取り除くと回復することが認められた。

3) 抗GABA<sub>B</sub>受容体に対する抗体を有する例（15例）の報告では、男女ともに生じ、平均発症年齢55歳（24歳から75歳）で、記録力障害を伴うてんかん発作が全例に認められた。1/3の例で肺小細胞癌があり、13例中7例で他の自己抗体が併存、頭部MRIで側頭葉内側面に信号異常を認めるものが15例中11例、髄液細胞增多が6/13例、蛋白増加が12/13例に見られた。免疫グロブリンや副腎皮質ホルモン投与に反応して12/15例で著明な改善が見られたと報告されている<sup>10)</sup>。

#### 4) 抗VGKC複合体抗体関連脳炎

2001年にneuromyotoniaおよびMorvan症候群において患者血清中に抗VGKC抗体が検出され、その後、辺縁系脳炎を生じる一群にも本抗体が陽性になる場合があることが報告され、抗VGKC抗体関連辺縁系脳炎と呼称されるようになった<sup>1)</sup>。2010年になり、自己免疫性辺縁系脳炎を呈する症例で検出された抗VGKC抗体の実際の認識抗原はLGI-1であり、また、腫瘍に関連する傍腫瘍性辺縁系脳炎での抗VGKC抗体の認識抗原は、Kv分子そのものではなく、VGKC複合体を形成するcontactin-associated protein (CASPR)-2である場合が多いことが明らかになった<sup>16)</sup>。このことから、VGKC複合体に関連する抗体を生じる一群を、抗VGKC複合体抗体関連脳炎と呼称するようになった。

この群の症例は、亜急性の経過で記憶障害、昏迷、見当識障害やてんかん発作を生じ、高率にSIADHによる低ナトリウム血症を生じる。中・高年の発症が多く、約半数で肺小細胞癌、胸腺腫、前立腺癌、乳癌、造血腫瘍を合併していた。非腫瘍合併例では各種免疫療法に反応することが多いが再発例もある。

これらの細胞表面抗原に対する抗体を有する例の検体では、血漿交換療法や抗体産生抑制療法が神経症状の改善に繋がること、培養細胞などを用いたモデル系で、抗体を含む血清が刺激伝導ブロックや、細胞膜電位変化の阻害など、それぞれの疾患で見られる病態が再現されることが示され、自己抗体が病態に直接的に関与すると考えられる場合が多い<sup>17)</sup>。

#### 細胞内抗原に対する抗体を生じる脳炎・脳症

細胞内抗原に対する抗体を生じる群の多くは、悪性腫瘍が潜在する傍腫瘍性神経症候群であり、一般に副腎皮質ホルモンや免疫抑制剤投与、大量ガンマグロブリン投与、血漿交換療法などの各種免疫療法に抵抗性である。早期に腫瘍の治療を行うことができれば、神経症状の安定化を得ることが多いが、多くの場合は腫瘍の発見に時間がかかり、神経症状は重篤な状況に陥ることが一般的である<sup>2)-6)</sup>。

#### 1) 脳脊髄炎:paraneoplastic encephalomyelitis (PEM)

中枢神経系の広汎な領域にわたる多彩な症候を様々な組み合わせで呈する群であり、末梢神経障害が加わる場合もある。すなわち、認知機能障害や意識障害・せん妄、錐体路症候、不随意運動、下位運動ニ

ューロン徵候、自律神経症候を様々な組み合わせで認める。この群では、潜在する腫瘍および抗体の種類は多様である。肺小細胞癌を有する例が最も多いが、睾丸癌・胸腺腫・乳癌など多様な癌が報告されている。出現する頻度の高い自己抗体としては、抗Hu抗体が最も多く、CRMP-5, Ma-2, amphiphysinに対する抗体も報告されている。

・抗Hu (type II, ANNA-1) 抗体は、中枢および末梢神経細胞核に広く反応する抗体であり、対応抗原には数種のisotype (HuD, PLE21/HeN1/HuC, HuR) があるが、いずれも3個のRNA recognition motif (RRM) を有し、細胞増殖を制御する分子 (*c-fos*, *c-myc*, Gap43, GM-CSFなど) に結合する。Hu蛋白は神経発生の早期から神経細胞に発現し、神経細胞の分化増殖などに重要な役割を担うと考えられている<sup>18)</sup>。

・間脳・脳幹症状を呈することが知られている抗Ma-2抗体陽性例は、数週から6ヶ月程度の間進行する過眠・高体温などの視床下部症状(70%)や辺縁系・上部脳幹症状を呈する。MRIでは側頭葉内側面・視床下部・基底核・視床・四丘体領域に信号異常を認め、CSFは軽度の炎症反応を呈する。45歳以下の男性では睾丸腫瘍が多く、癌の摘出・免疫療法により30%の例で症状の軽快が得られている<sup>19)</sup>。抗Ma-2/Ta抗体は神経細胞核および細胞質・精巣のspermatogenic cellに発現しており、ウェスタンプロットで40kdのバンドに対応する。

・抗amphiphysin抗体は、当初乳癌を伴うStiff-person症候群の3女性で、その後肺小細胞癌に伴うPEMで報告された抗体である。amphiphysinは神經終末に局在し、前シナプス終末に共存する $\alpha$  adaptinやGTPaseの一つであるdynaminと結合しエンドサイトーシスに関わることが知られている<sup>20)</sup>。

・Stiff-person症候群を呈する場合は、抗glutamic acid decarboxylase (GAD) 抗体が関連することが多い。GADは抑制性神経伝達物質であるGABAの合成に関わる酵素であり、本抗体陽性例で、rigidity/myoclonusを伴う脳脊髄炎や小脳失調や難治性てんかんを呈する症例が報告されている。抗GAD抗体陽性難治性てんかんでは、年余にわたり繰り返す痙攣発作と高次脳機能障害を呈し、抗痙攣剤の効果が乏しいものの、血漿交換療法や免疫グロブリン投与が奏功する<sup>21)</sup>。また、他の自己免疫疾患(I型糖尿病、甲状腺疾患、悪性貧血など)を合併する例が報告されている。

## 2) 亜急性小脳変性症: paraneoplastic cerebellar degeneration (PCD)

小脳症状はPEMの一症候としても見られ、この場合は肺小細胞癌を伴い抗Hu抗体が陽性という場合が多いが、電位依存性カルシウムチャネル(voltage-gated calcium channel:VGCC)抗体陽性でLambert-Eaton myasthenic syndrome (LEMS)を合併する場合、乳癌で抗Ri抗体が見られる場合、多様な癌を背景に抗Ma1/Ma2抗体が陽性である例などがある。小脳に限局した症候を呈する女性の場合は、その半数以上が婦人科癌・乳癌を有し、抗Yo抗体が陽性である場合が多い。小脳症状は亜急性に進行した後は安定化するものの、癌そのものが予後を左右する場合が多い<sup>2)-5)</sup>。Yo抗体陽性例の中には、まれながら、消化器の腺癌に伴う男性例の報告もある。Hodgkin病で小脳症状を呈する場合はTr抗体や代謝調節型グルタミン受容体抗体が見いだされた例もある。

Yo抗体は小脳Purkinje細胞の細胞質に多く存在する58kdの蛋白に反応するものであるが、抗原はロイシンが7アミノ酸毎に繰り返すleucine zipper motif (LZM)構造を有し、c-myc, c-fos, c-junなどのproto-oncogeneと結合してDNAの転写に影響を及ぼす可能性が考えられている<sup>22)</sup>。

## 3) 傍腫瘍性辺縁系脳炎:paraneoplastic limbic encephalitis (PLE)

PLEの病型を呈する場合、潜在する腫瘍は、肺癌(50%)、睾丸癌(20%)、乳癌(8%)、Hodgkin病、未分化奇形腫、胸腺腫などが多い。PLEの60%に自己抗体が見られ、抗Hu抗体が36%、抗Ma/Ta抗体が24%，その他CV2/CRMP5、amphiphysinに対する抗体が見られる<sup>23)</sup>。

本症では、脳脊髄液で軽度のリンパ球および蛋白の増加、IgG上昇が見られる。脳波では徐波や発作性鋭波・棘波を認め、頭部MRIでは、一側または両側の側頭葉内側面にT2強調画像やFLAIR画像で、しばしば造影効果を伴う高信号病変を認める。てんかん発作を伴うPLEではMRIが正常でもFDG-PETで側頭葉内側部に高信号を呈する場合がある。

病理学的には、扁桃体、海馬の錐体細胞層やアンモン角での神経細胞脱落、血管周囲性リンパ球浸潤、ミクログリアの増殖などが見られる。

## 4) オプソクロースス・ミオクロースス症候群:paraneoplastic opsoclonus myoclonus syndrome (POMS)

POMSは文字通り、眼球のオプソクローススと四肢のミオクローススおよび小脳失調を呈するもので、小児では神経芽細胞腫に伴うことが多い、成人ではRi抗体陽性乳癌患者以外は、肺小細胞癌を有し自己抗体が検出できない例が多い。少数ながら、婦人科癌、膀胱癌、甲状腺癌、胸腺腫などを伴う例の報告もある。自己抗体は、Ri以外、Hu、CRMP5、amphiphysin、Yo、Ma2抗体などが報告されている。傍腫瘍性POMSに比べ、自己免疫性POMSは各種免疫療法に反応が良好である<sup>24)</sup>。

抗Ri抗体は、中枢神経の神経細胞核に反応し、対応抗原は神経系に特異的に発現するNova-1と命名されたRNA結合蛋白であり、Nova-1のRNA結合活性を阻害することが示された<sup>25)</sup>。

これらの細胞内抗原を認識する抗体を有する傍腫瘍性神経症候群では、発症早期から罹患神経組織に反応する高力値の特徴的な自己抗体が検出され、神経症状、抗体の種類、腫瘍の組織型の間には比較的一定の関係があること、神経症状が腫瘍発見に先行すること、抗体保有者では少なくとも病初期には腫瘍の進展・転移が比較的少ないことが知られ、腫瘍に対して生じた免疫反応が神経と腫瘍を標的とする図式が考えられてきた。しかし、このeffectorの役割を抗Hu抗体や抗Yo抗体などの自己抗体が担うかどうかについては否定的な実験結果が多く、抗体単独で神経症状を生じることはないと考えられている<sup>26)</sup>。一方で、標的臓器に浸潤するリンパ球の特性や末梢血リンパ球の機能解析から、細胞障害性T細胞による神経傷害が生じる可能性が考えられている<sup>27)28)29)</sup>。

以上のように、自己免疫性・傍腫瘍性脳炎・脳症では、その病態を知る上で自己抗体の検索は極めて有用な情報をもたらすものである。細胞表面抗原を認識する抗体が検出される場合には、速やかな抗体除去療法が奏功する可能性が高い。一方で、細胞内抗原を認識する抗体を有する傍腫瘍性神経症候群の場合の自己抗体の意義は、本症を確定診断するのに極めて有用であり、その背後に存在する悪性腫瘍を予測して早期対応が可能になるという役割を有すると考えられる。

## 文 献

- 1) Vincent A, Buckley C, Schott J, et al. Potassium channel antibody-associated encephalopathy: a potentially immunotherapy-responsive form of limbic encephalitis. *Brain* 127: 701-712, 2004.
- 2) Voltz R:Pananeoplastic neurological syndromes: an update on diagnosis,pathogenesis, and therapy. *Lancet Neurol* 1:293-305, 2002.
- 3) Rees J. Paraneoplastic syndromes. *Curr Opin Neurol* 11:633-637, 1998.
- 4) Storstein A, Vedeler CA:Paraneoplastic neurological syndromes and onconeural antibodies: clinical and immunological aspects. *Adv. Clin Chemistry* 44:143-185, 2007.
- 5) Bataller L, Dalmau JO: Paraneoplastic disorders of the central nervous system:Update on diagnostic criteria and treatment. *Sem Neurol.* 24:461-471, 2004.
- 6) Graus F, Delattre JY, Antoine JC, et al. Recommended diagnostic criteria for paraneoplastic neurological syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75:1135-1140, 2004.
- 7) Dalmau J, Gleichman AJ, Hughes EG, et al. Anti-NMDA-receptor encephalitis: case series and analysis of the effects of antibodies. *Lancet Neurol* 7:1091-98, 2008.
- 8) Dalmau J, Lancaster E, Martinez-Hernandez E, et al. Clinical experience and laboratory investigations in patients with anti-NMDAR encephalitis. *Lancet Neurol*. 10:63-74, 2011.
- 9) Lai M, Hughes EG, Peng X, et al. AMPA receptor antibodies in limbic encephalitis alter synaptic receptor location. *Ann Neurol* 65:424-434, 2009.
- 10) Lancaster E, Lai M, Peng X, et al. Antibodies to the GABA(B) receptor in limbic encephalitis with seizures: case series and characterisation of the antigen. *Lancet Neurol* 9: 67-76, 2010.
- 11) Lai M, Huijbers MGM, Lancaster E, et al. Investigation of LGI1 as the antigen in limbic encephalitis previously attributed to potassium channels: a case series. *Lancet Neurol.* 9(8):776-85, 2010.
- 12) 亀井 聰：若年女性に好発する急性非ヘルペス性脳炎. *Annual Review 神経* 2006: 115-119, 2006
- 13) 田中惠子：抗NMDA受容体抗体 日本臨床 広範囲血液・尿化学検査 第7版 IX. 免疫学的検査 F. 自己抗体 68 (Suppl 6) : 651-654、2010
- 14) Tachibana N, Shirakawa T, Ishii K, et al. Expression of various glutamate receptors including N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) in an ovarian teratoma removed from a young woman with anti-NMDAR encephalitis *Inter Med* 49: 2167-2173, 2010
- 15) Tojo K, Nitta K, Ishii W, et al. A young man with anti-NMDAR encephalitis following Guillain-Barre syndrome. *Case Reports in Neurology (Cas Rep Neurol)* 3:7-13, 2011
- 16) Hughes EG, Peng X, Gleichman AJ, et al. Cellular and synaptic mechanisms of anti-NMDA receptor encephalitis. *J Neurosci.* 30(17):5866-5875, 2010.
- 17) Irani SR, Alexander S, Waters P, et al. Antibodies to Kv1 potassium channel-complex proteins leucine-rich, glioma inactivated 1 protein and contactin-associated protein-2 in limbic encephalitis, Morvan's syndrome and acquired neuromyotonia. *Brain* 133: 2734-2748, 2010.
- 18) Joseph B, Orlan M, Furneaux H. p21 (waf1) mRNA contains a conserved element in its 3' -untranslated region that is bound by the Elav-like mRNA-stabilizing proteins. *J Biol Chem* 273:20511-20516, 1998.
- 19) Hoffmann LA, Jarius S, Pellkofer HL, et al. Anti-Ma and anti-Ta associated paraneoplastic neurological syndrome: 22 newly diagnosed patients and review of previous cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79:767-773, 2008.
- 20) David C, McPherson PS, Mundigl O, et al.:

- A role of amphiphysin in synaptic vesicle endocytosis suggested by its binding to dynamin in nerve terminals. Proc Natl Acad Sci USA 93:331-335, 1996.
- 21) Liimatainen S, Peltola M, Sabater L, et al. Clinical significance of glutamic acid decarboxylase antibodies in patients with epilepsy. Epilepsia 51:760-767, 2010
- 22) Sakai K, Shirakawa T, Li Y, et al. Interaction of a paraneoplastic cerebellar degeneration-associated neuronal protein with a nuclear helix-loop-helix leucine zipper protein MRG X. Mol Cell Neurosci. 19:477-484.2002.
- 23) Gultekin SH, Rosenfeld MR, Voltz R, et al. Paraneoplastic limbic encephalitis: neurological symptoms, immunological findings and tumour association in 50 patients. Brain 123:1481-1494, 2000.
- 24) Bataller L, Graus F, Saiz A, et al. Clinical outcome in adult onset idiopathic or paraneoplastic opsoclonus-myoclonus. Brain 124 (Pt 2);437-443,2001.
- 25) Buckanovich RJ, Yang YYZ, Darnell RB. The onconeural antigen Nova 1 is a neuron-specific RNA binding protein, the activity of which is inhibited by paraneoplastic antibodies. J Neurosci. 16:1114-1122, 1996.
- 26) Tanaka K, Tanaka M, Onodera O, et al.: Passive transfer and active immunization with the recombinant leucine-zipper (Yo) protein as an attempt to establish an animal model of paraneoplastic cerebellar degeneration. J Neurol Sci 127: 153-158, 1994.
- 27) Albert ML, Austin LM, Darnell RB. Detection and treatment of activated T cells in the cerebrospinal fluid of patients with paraneoplastic cerebellar degeneration. Ann Neurol 47:9-17,2000.
- 28) Tanaka M, Tanaka K, Tokiguchi S, et al. Cytotoxic T cells against a peptide of Yo protein in patients with paraneoplastic cerebellar degeneration and anti-Yo antibody. J Neurol Sci 168:28-31, 1999.
- 29) Tanaka M, Tanaka K. Cytotoxic T cell activity against peptides of Hu protein in anti-Hu syndrome. J Neurol Sci 201:9-12, 2002.

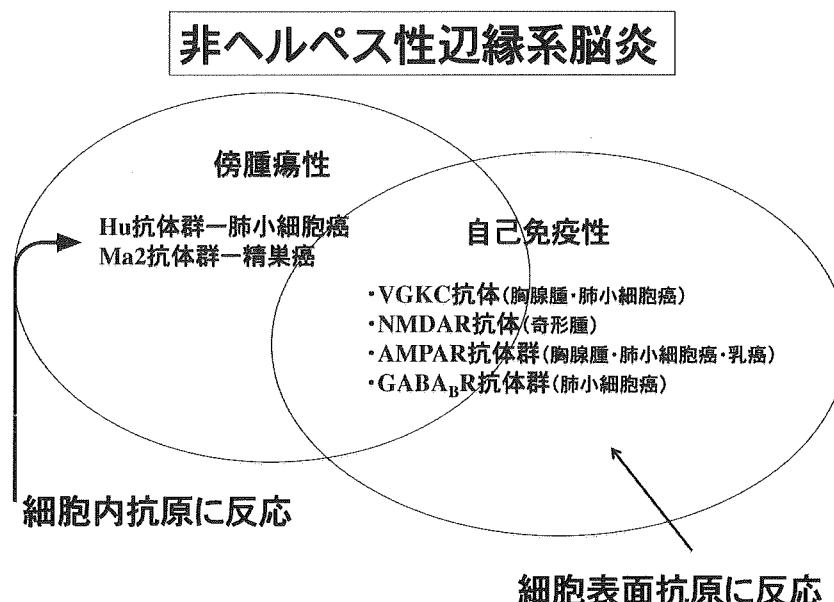
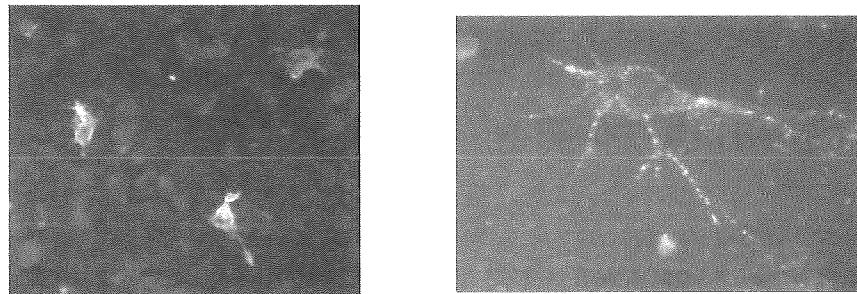


図1. 傍腫瘍性, 自己免疫性辺縁系脳炎



**患者髄液および抗NR1/2抗体を反応させ、FITC-抗ヒトIgGおよびPE-抗ウサギIgGを反応させた像を重ね合わせた図**

**培養ラット海馬細胞に患者髄液を反応させて、FITC-抗ヒトIgGを加えた蛍光免疫染色像**

**図2. 抗NMDA受容体抗体**

NMDA受容体 NR1/NR2各サブユニットを共発現させたHEK細胞および培養海馬細胞に患者髄液を反応させ、蛍光色素でラベルした抗ヒトIgGを反応させた蛍光免疫染色

**表1. 細胞内抗原/細胞表面抗原を認識する自己抗体を生じる群**

**<細胞内抗原 / 細胞表面抗原を認識する自己抗体を生じる群>**

細胞内抗原に対する抗体	主たる神経症状	主たる腫瘍	神経症状の治療反応性	
			腫瘍の治療	免疫療法
Hu	LE・PCD・SSN	肺小細胞癌	部分的	部分的
Yo	PCD	卵巣癌, 乳癌	不良	不良
Ri	POMS・PCD	乳癌, 肺小細胞癌	部分的	部分的
Ma-2	PLE	精巣癌 肺癌	一部良好	一部良好
CV2/CRMP-5	PCD・ON	肺小細胞癌, 胸腺腫	部分的	部分的
amphiphysin	SPS	乳癌, 肺小細胞癌	部分的	部分的

**細胞表面抗原**

**に対する抗体**

AChR	MG	胸腺腫	良好	良好
NMDAR	PLE	卵巣腫瘍(奇形腫)	良好	良好
VGKC	NMT	肺小細胞癌	良好	良好
	PLE	胸腺腫	一部良好	良好
VGCC	LEMS・PCD	肺小細胞癌	良好	良好

PLE:paraneoplastic limbic encephalitis, PCD:paraneoplastic cerebellar degeneration, SSN:subacute sensory neuronopathy, POMS:paraneoplastic opsoclonus myoclonus syndrome, ON:optic neuritis, SPS:Stiff-Person syndrome, MG:myasthenia gravis, LEMS:Lambert-Eaton myasthenic syndrome, NMT:neuromyotonia

表2. 抗NMDA受容体抗体関連脳炎100例の臨床的特徴

NMDAR抗体関連脳炎100例の特徴 (Dalmau J. Lancet Neurol.2008)	
男:女	9:91
平均発症年齢	23(5-76)
感冒様前駆症状	85.7%
精神症状	(初発時受診科:精神科77%, 神経内科23%)
けいれん	76% (全般性 45%, 部分発作 10%)
不随意運動	86% (orofacial 55, choreoathetosis 47, abnormal posture 47)
自律神経症状	69%
中枢性低換気	66%
脳波異常	徐波 71, てんかん性棘波 21
MRI異常	55% (側頭葉内側面 22%)
髄液	細胞增多 9 1%, 蛋白增加 32%, oligoclonal band 67%
腫瘍 (女性): (男性):	卵巣成熟奇形腫 35, 卵巣未分化奇形腫 14, 画像上奇形腫 4 睾丸奇形腫 1, 肺小細胞癌 1
治療	腫瘍摘出 51, 免疫治療 92, 対症療法 2

表3. 抗AMPA受容体抗体陽性辺縁系脳炎の臨床的特徴

抗AMPAR (GluR1/2) 抗体陽性辺縁系脳炎	
(Lai M. et al. Ann Neurol. 65:424,2009)	
男:女	1:9
平均発症年齢	60(38-87)
初発症状	混迷・記憶力障害, 睡眠障害, 行動異常
けいれん	複雑部分発作または全般性 3/10
腫瘍	肺小細胞癌 1/10, 胸腺腫 3/10, 非小細胞性肺癌 1/10, 乳癌 2/10
他の自己抗体	5/9 (ANA, GAD, CRMP5, VGCC, SOX1)
MRI異常	8/9 (側頭葉内側面)
髄液	細胞增多 7/10, 蛋白增加 7/10
脳波	徐波 4/8, 棘波 2/8, 正常 2/8
治療	腫瘍摘出 5/10, IVIG/PSL 9/10, PE 3/10
再発	6/10 (1~3回、間隔 7~101ヶ月)
経過	初回正常化 8/10, 再発後後遺症 5/10, 死亡 3/10

## 教育講演 3

# 中枢神経系の感染症と炎症の画像診断

## 柳下 章

**【要旨】**ウイルス感染症では、ウイルス感染に伴う血管症（血管炎）について記載した。帯状疱疹ウイルス、HIVウイルス、サイトメガロウイルスが血管症の原因として重要です。

神經梅毒において前頭葉から側頭葉にかけて、皮質下白質に多数の高信号をFLAIRにて認めるのは、比較的特徴的な進行麻痺の画像所見です。

進行性多巣性脳症（PML）に関しては、初期所見に関して記載した。HIVや血液疾患、種々の慢性消耗性疾患のある患者に、皮質下白質にT1強調像にて低信号を示し、mass effect および造影効果がなく、拡散強調像にてその一部（辺縁部）が高信号を示す症例はPMLを常に、考慮する必要がある。

Key words: 水痘・帯状疱疹ウイルス脳血管症 (varicella zoster virus cerebral vasculopathies)  
 HIV血管症 (HIV associated vasculopathy)  
 進行性多巣性脳症 (progressive multifocal leukoencephalopathy)  
 進行麻痺 (general paresis of the insane)、急性小脳炎 (acute cerebellitis)

### 1 ウィルス脳炎に伴う脳血管症

ウィルス脳炎に伴う脳血管症では帯状疱疹ウイルス（VZV）、ヒト免疫不全ウイルス（human immuno deficiency virus : HIV）、サイトメガロウイルスが血管症の原因として重要とされる<sup>1)</sup>。

帯状疱疹後のウイルスが再活性化、あるいは水痘後の原発性のウイルス感染後に、脳血管炎を起こすことがあり、免疫正常者にも、免疫不全者にも認められる<sup>2)</sup>。以前より高齢者における眼神経帯状疱疹の後および小児水痘後の一側性の血管炎は知られていたが、最近では、帯状疱疹の発疹とは離れた部位に、数ヶ月後に多巣性の血管炎を引き起こす病態が判明している。30例のVZVによる脳血管症をまとめた報告<sup>2)</sup>によると、皮疹が先行したのが19例（63%）、髄液細胞数增多は20例（67%）、画像所見に異常を認めたのが29例（97%）となっている。血管造影の異常は23例中16例（70%）に認められている、VZVによる脳血管症では出血と梗塞を認め、比較的大きな血管から小さな血管まで侵す<sup>1, 2)</sup>。出血もヘルペス脳炎のように点状出血ではなく、明瞭な脳出

血を示すことが多い（図1）。

HIVウイルスは脳梗塞やくも膜下出血を起こすことがある、HIVの多い国では小児から若年者のくも膜下出血および脳梗塞では考慮すべき疾患となっている<sup>3)</sup>。HIVウイルスによる脳血管症では頭蓋内および頭蓋外の内頸動脈に閉塞および優位な狭窄を示す<sup>4)</sup>。脳実質内では脳梗塞および脳内出血を示す。動脈瘤を伴う血管症ではWillis動脈輪に動脈瘤を認める<sup>3-5)</sup>。若年成人あるいは小児において脳血管障害（脳梗塞、脳内出血、くも膜下出血、動脈瘤）の原因の1つである。動脈瘤は多発性で紡錘状が多い。若年者ではより重症な形態を取る。

### 2 神經梅毒（進行麻痺）

進行麻痺は多彩な脳画像所見を示す。前頭葉から側頭葉にかけて、皮質下白質に多数の高信号領域をFLAIRにて認めるのは、比較的特徴的な進行麻痺の画像所見である<sup>6)</sup>。この画像所見がどのような病理所見を反映しているのかは不明である。

認知症で発症し、1ヶ月後に突然の意識障害を呈

した進行麻痺例がある。一側の側頭葉から後頭葉にかけて、大きな病巣が出現し、mass effect を示す。病変のADC値は上昇しており、慢性炎症の急性増悪と考えている。

左上肢の脱力発作にて発症した進行麻痺例を経験している。前頭葉内側皮質を中心に高信号をT2強調像にて認め、造影効果を認めている(図2A, B)。ペニシリン投与開始2日目に意識障害と髄膜刺激徵候を認め、Jarisch-Herxheimer反応が起ったと考えられた。脳MRIではT2強調像での高信号領域の増大、造影効果を認める範囲の増大を認めた(図2C)。同様な報告がある<sup>7)</sup>。

### 3 急性小脳炎

急性小脳炎は急性に発症し、小脳失調を基本とする。小脳内のT2強調像での高信号の存在と脳溝に

沿った造影効果が特徴である。脳梁膨大部にADC値の低下を伴う例も報告がある<sup>8)</sup>。

### 4 傍腫瘍性小脳変性症

急性に発症する小脳炎に対して、1ヶ月ほどの亜急性の発症をするのが、傍腫瘍性小脳変性症の特徴であり、T2強調像にて比較的淡い高信号をT2強調像にて示す。

### 5 進行性多巣性白質脳症(PML)

PMLの診断のポイントを以下に示す。①基礎疾患(HIV、血液疾患、慢性消耗性疾患など)がある。②皮質下白質にT1強調像にて低信号を示し、mass effect および造影効果がなく、拡散強調像にてその一部(辺縁部)が高信号を示す。③はモノクロ

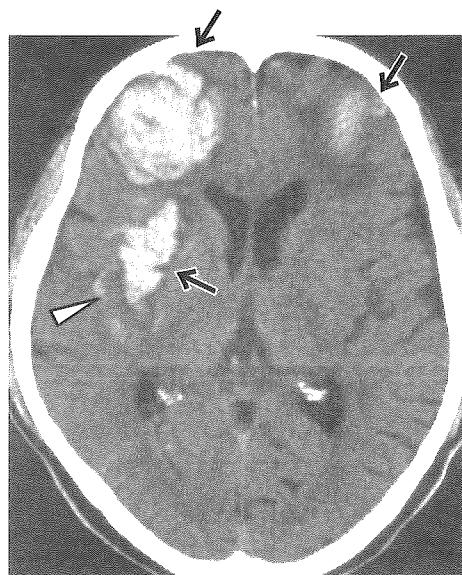


図1A

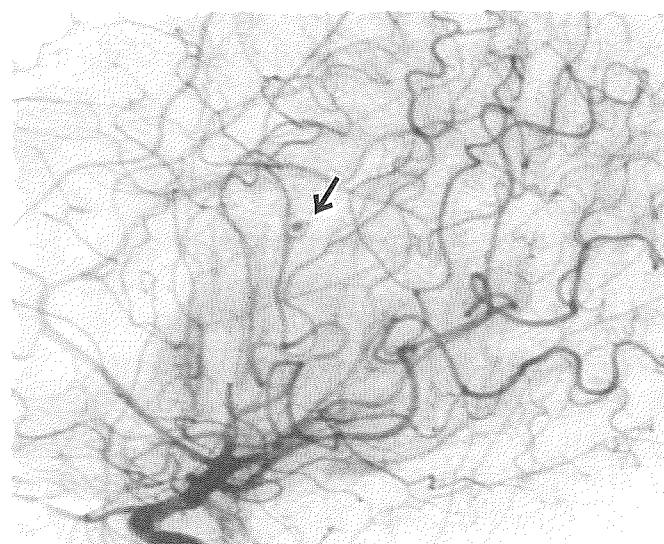


図1C

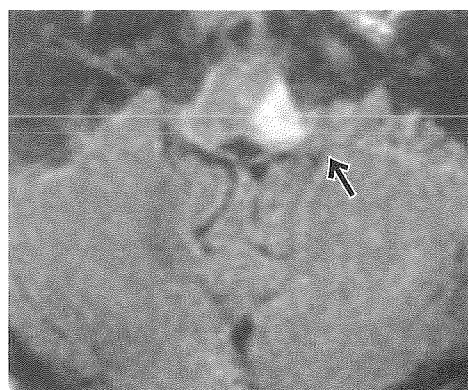


図1B

#### 図1 水痘・帯状疱疹ウイルス脳血管症 71歳、男性

20日ほど前より微熱があり、持続性吃逆、その後、緩徐進行性の意識障害、呂律不良、歩行障害が出現し、ほぼ同時に帯状疱疹が両下肢、両側顔面、後頭部に出現した。2週間前より尿閉、両下肢の麻痺。MRIにて馬尾に神經根炎を認めた。髄液中の細胞增多(175/3)、蛋白增加175mg/dl、抗VZV IgG抗体の上昇を認めた。

1A: CTにて多発性の時期の異なる脳内出血を両側前頭葉皮質下および右基底核に認める(矢印)。くも膜下出血を伴っている(矢頭)。

1B: FLAIR画像にて、延髓左に梗塞を認める(矢印)。拡散強調画像でも高信号領域を示し、新鮮な梗塞である(非掲載)。

1C:右内頸動脈造影にて中大脳動脈末梢領域に動脈瘤を認め(矢印)、血管炎によると考えた。

ーナル抗体製剤が原因となりうる<sup>9)</sup>。

大脳では病変は皮質下白質から始まることが多いが、基底核や視床などを侵すこともある。T2強調像あるいはFLAIRは異常を見つけやすいが、鑑別診断にはT1強調像がより重要であり、低信号を示し、mass effect および造影効果のないことが特徴である。拡散強調像では、T2強調像あるいはFLAIRでの高信号の一部（辺縁部）に高信号を認める（図3）。ADC値は様々である。拡散強調像での高信号はより新しい病変を示していると考えられる。

脳幹被蓋<sup>10)</sup>あるいは小脳半球においてもPMLの所見は同様である。

## 6 急性散在性脳脊髄炎（ADEM）

ADEMでは臨床症状出現と同時に病変が現れ、症状の改善とともに、病変が退縮するのが通常であるが、しばしば臨床症状出現とMRIにて異常所見が出てくるまでの期間が成人では1ヶ月かかる例もあり、小児でも同様な例を認める<sup>11,12)</sup>。初回のMRIにて異常がないときにもADEMを否定する根拠にはならない。脳炎との鑑別にはフォローのMRIが必要である。

自験18例の内、6例において、臨床症状が改善しているにもかかわらず、MRI所見の悪化が認められている<sup>12)</sup>。その6例はいずれも治療開始前にMRIが撮像されている。その内、3例では発症3日以内撮像

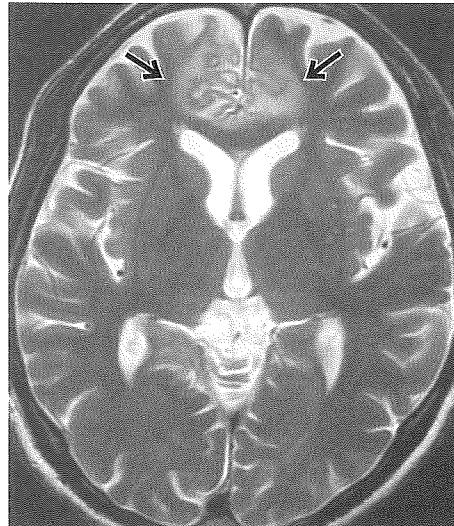


図2A

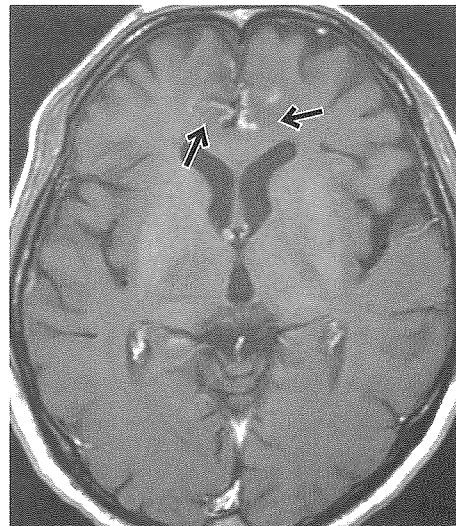


図2B

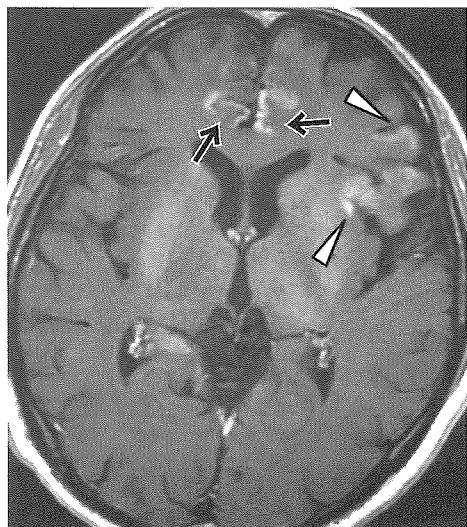


図2C

図2 進行麻痺 48歳、男性

約4ヶ月前に突然に左上肢の脱力発作があった。約2ヶ月前に他院受診し、MRIにて異常を指摘される（当院のそれとほぼ同様な所見であった）。2週間前より左手の動作時のふるえを認め、当院入院、MRIを撮像した。血液および髄液TPHA(treponema pallidum hemagglutination assay)が陽性で、神經梅毒と診断される。

2A: T2強調像にて両側前頭葉内側部に皮質から皮質下に高信号領域を認める（矢印）。病変には大きなmass effectはないが、軽い腫大が疑われる。前頭葉には軽い萎縮がある。

2B: 造影後のT1強調像にて両側前頭葉内側皮質を中心に造影効果を認める（矢印）。

2C: Jarisch-Herxheimer反応が起こったときの造影後T1強調像にて、両側前頭葉内側皮質（矢印）以外にも、左前頭葉外側皮質、島回皮質に新たな造影効果を認める（矢頭）。なお、後者にはT2強調像にて高信号を認めた（非掲載）。

されたが初回のMRIにて異常を認めていない。残りの3例はいずれも基底核に病変を認めている。6例において、発症後12日から82日に再検の画像が撮像され、全例に画像所見の悪化が認められた。内容は1例は頸髄に、5例は脳内に新しい病変認め、3例は側脳室周囲に、3例では中脳から延髄にかけて病変があった。2例では初回のMRIにて認めた基底核の病変が消失した。以上より、ADEMにおいては臨床症状の改善があつても、MRI所見の悪化がある。そのことによって、ステロイドの增量、治療方針の変更、入院期間の延長をする必要はない。また、再発性急性散在性脳脊髄炎と診断する根拠にはならない<sup>12)</sup>。

## 7 Rasmussen脳炎 (Rasmussen's encephalitis:RS)

### 【臨床と病理】

RSは5～10歳に好発し、85%が10歳以下でてんかん発作にて発症する。一側大脳半球を侵し、持

続性部分発作(epilepsia partialis continua)、患側大脳半球の進行性萎縮とこれによる進行性神経脱落症状を特徴とし、末期には半身麻痺、半盲、失語などに至る。両側性RSはきわめて稀である。てんかんの発症までは患児は正常発達を示す。てんかんは薬物に抵抗性であり、てんかんの外科的適応になることが多い<sup>13)</sup>。

病理組織像は基本的にはリンパ球浸潤が目立つ慢性脳炎の所見であり、病気により様々な所見を呈する。4つの指標(micoglia nodule, perivascular lymphocytes, subarachnoid inflammation, neuronal loss and gliosis)と罹患の長さにより関連していると考えられる4つのグループに分かれている<sup>14,15)</sup>。

グループ1 (active disease)は最も罹病期間の短い早期型であり、多数のミクログリア結節を伴う炎症所見である。グループ2 (active and remote disease)は多数のミクログリア結節、血管周囲の円形細胞浸潤にくわえて少なくとも一脳回の完全な壊死に特徴づけられる。グループ3 (remote disease)

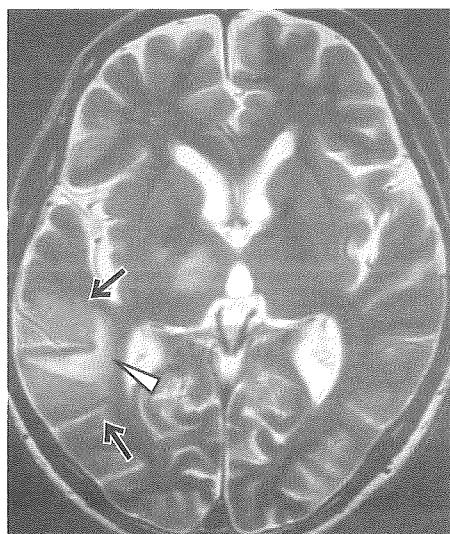


図3A

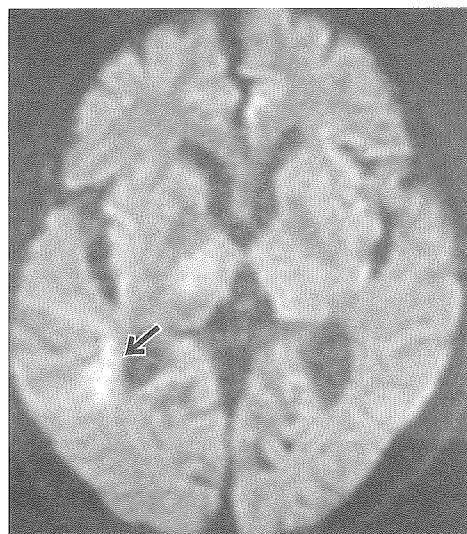


図3C

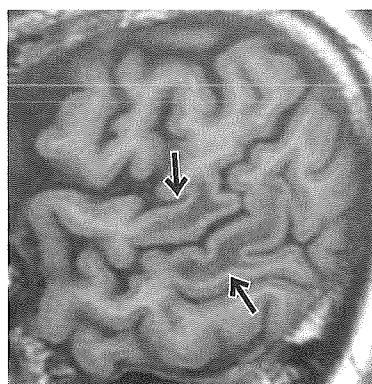


図3B

図3 進行性多巣性白質脳症 62歳、男性 HIV陽性、1ヶ月前より進行する運動障害、記憶障害、眼球運動障害、左片麻痺を認める。

3A: T2強調像にて右側頭葉皮質下(矢印)に高信号領域を認め、mass effectを認めない。信号強度は不均一で一部にはより信号強度の高い部位を認める(矢頭)。右視床にも高信号領域を認める。

3B: T1強調矢状断像(右)にて、上述した高信号領域はT1強調像では低信号を示し、上側頭回および中側頭回にある(矢印)。

3C: 拡散強調像では右側頭葉の病変は辺縁部で、内側よりが高信号を示す(矢印)。T2強調像にてより高信号を示す部位に相当する。右視床にも軽度高信号領域を認める。

は神經細胞脱落とグリオーシスがさらに強くなり、ミクログリア結節はほとんど認められない。グループ4 (nonspecific changes) は最終段階で円型細胞浸潤やミクログリア結節はほとんどなく、強いグリオーシスが形成された病理像である。

患者血清からAMPA型グルタミン酸受容体 (GluR) の中の GluR3 に対する自己抗体が検出され、RS は自己免疫的機序によって生じる脳炎であると考えられようになつた<sup>14)</sup>。

Bien らにより診断基準が提唱されている。表に示す<sup>14,16)</sup>。

表 Rasmussen脳炎の診断基準(14,16より改変)

Part A

- 1 臨床：限局性けいれんと片側大脳皮質機能欠損
- 2 脳波：片側半球の徐波(てんかん原性活動と片側けいれんの有無は問わない)

3 MR I : 片側半球萎縮と少なくとも次の1つを満たす

- 1) 大脳皮質あるいは白質でのT2/FLAIR高信号領域
- 2) 同側尾状核頭部の高信号領域あるいは萎縮

PartB

1 臨床：持続性部分てんかんあるいは進行性の片側大脳皮質機能欠損

2 MR I : 進行性の片側半球皮質の限局性萎縮

3 病理組織：活動性ミクログリア浸潤を伴う Tリンパ球優位の脳炎(ミクログリア結節の存在が典型であるが、必ずしも必須ではない)。

多数のマクロファージ、Bリンパ球、形質細胞、ウイルス封入体の存在は Rasmussen 脳炎を除外する。

注: Part A の内、3つとも当てはまるか、Part B の内、2つ以上が当てはまるか、まずは part A を先

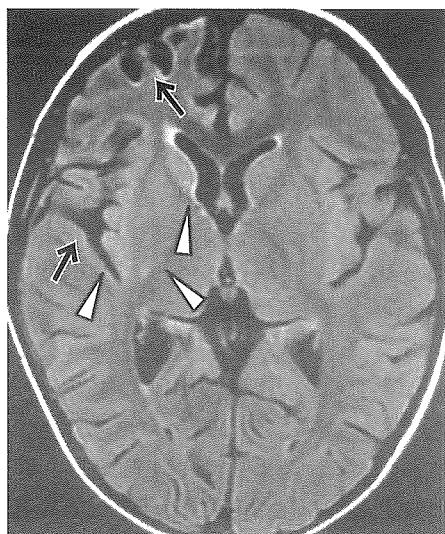


図4A

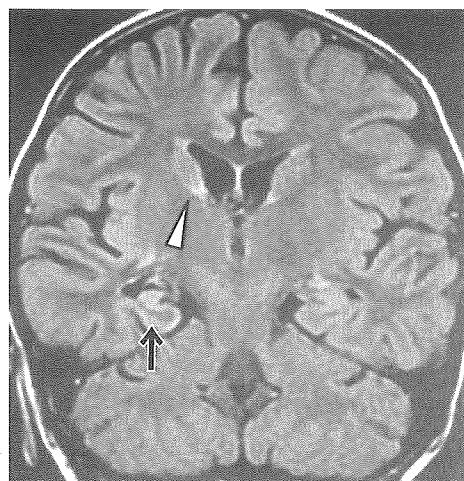


図4C

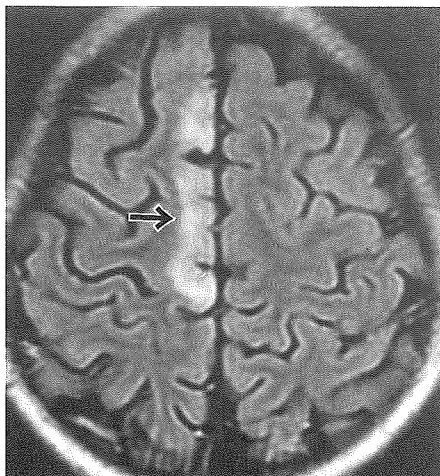


図4B

図4 Rasmussen脳炎 4歳、女子

7ヶ月前に左上肢のけいれん、4ヶ月前に全身発作、2ヶ月前に重積となり、他院に入院。その後、左下肢(>左上肢)の持続的けいれんがあり、嘔気と共に複雑部分発作が出現している。

4A:FLAIR画像にて、右前頭葉および側頭葉の萎縮を認める(矢印)。右尾状核、被殼、島回(矢頭)は左に比べて高信号領域を示す。右尾状核には軽い萎縮がある。

4B:FLAIR画像にて右上前頭回から中心前回皮質および皮質下白質に高信号領域を認める(矢印)。

4C:FLAIR冠状断像にて、右海馬の萎縮と信号強度の上昇を認める(矢印)。右尾状核に高信号を認める(矢頭)。

に検討し、次にpart Bで検討する。大脳生検が行われていないときには血管炎によるものを除外するために、MR Iにて造影効果がないこと、CTにて石灰化のないことを確認する必要がある。

### 【画像所見】

きわめて初期には画像では異常がない<sup>17)</sup>。その後、急性期には前頭・島回領域を中心に脳回の腫大を認め、皮質下の白質を含めてT2強調像にて高信号領域を示す(図4)。高信号領域は基底核(特に尾状核)や海馬にも認められる(図4)。さらに、尾状核の萎縮が加わる。慢性期では患側大脳半球の萎縮を示す。出血は伴わない。ADC値は軽度上昇し、造影効果は通常はない。MRSではNAAの低下、コリンとミオイノシトールの増加を認める<sup>17-19)</sup>。

Barkovichはそれまで正常発達を示した1～15歳(最も多いのは3～6歳)の小児が進行性の単純部分発作と発作後の欠落症状を示し、画像にて異常と認めないとときにはRSの可能性が高いとしている<sup>17)</sup>。しかし、上記の診断基準では画像の異常がないと診断できないことになっている。

### 文 献

- 1 Case records of the Massachusetts General Hospital. Weekly clinicopathological exercises. Case 36-1996. A 37-year-old man with AIDS, neurologic deterioration, and multiple hemorrhagic cerebral lesions. N Engl J Med. 335:1587-1595, 1996
- 2 Nagel MA, Cohrs RJ, Mahalingam R, et al. The varicella zoster virus vasculopathies: clinical, CSF, imaging, and virologic features. Neurology. 70:853-860, 2008
- 3 Rabinstein AA. Stroke in HIV-infected patients: a clinical perspective. Cerebrovasc Dis 15:37-44, 2003
- 4 Tipping B, de Villiers L, Wainwright H, et al. Stroke in patients with human immunodeficiency virus infection. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 78:1320-1324, 2007
- 5 O'Charoen P, Hesselink JR, Healy JF. Cerebral aneurysmal arteriopathy in an adult patient with acquired immunodeficiency syndrome. AJNR. 28:938-9, 2007
- 6 和田昭彦. 神経梅毒、進行麻痺 画像診断 30 : S 31,2010
- 7 Zhang SQ, Wan B, Ma XL, et al. Worsened MRI findings during the early period of treatment with penicillin in a patient with general paresis. J Neuroimaging. 18:360-363, 2008
- 8 Takanashi J, Miyamoto T, Ando N, et al. Clinical and Radiological Features of Rotavirus Cerebellitis. AJNR Am J Neuroradiol. 31:1591-1595, 2010
- 9 Bag AK, Curé JK, Chapman PR, et al. JC Virus Infection of the Brain. AJNR Am J Neuroradiol. 31: 1564 - 1576, 2010
- 10 Rubin DI, Norris S, Flint R. Isolated pontine progressive multifocal leukoencephalopathy: unusual magnetic resonance imaging features. J Neuroimaging. 12:63-66, 2002
- 11 Honkaniemi J, Dastidar P, Kähäri V, et al. Delayed MR imaging changes in acute disseminated encephalomyelitis. AJNR Am J Neuroradiol. 22:1117-24, 2001
- 12 中田安浩 柳下章 急性散在性脳脊髄炎のMR所見—臨床症状との乖離のある症例の検討— 第36回日本神経放射線学会抄録集 2007、p 105
- 13 大浜栄作 運動失調の病理 臨床のための神経形態学入門 後藤昇、柳下章、大浜栄作他 三輪書店 2008、p 311-2.
- 14 新井信隆、村上あゆみ、河内香江. Rasmussen脳炎. Clinical Neuroscience 28:248-9, 2010
- 15 Robitaille Y. Neuropathological aspects of chronic encephalitis. Chronic encephalitis and epilepsy. ed Andermann F. Butterworth-Heinemann, Boston, 1991, p79-110
- 16 Bien CG, Granata T, Antozzi C, et al. Pathogenesis, diagnosis and treatment of Rasmussen encephalitis: a European consensus statement. Brain. 128:454-471, 2005
- 17 Barkovich JS. Pediatric Neuroimaging. 4th. ed. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, 2005. p841-842

- 18 Chiapparini L, Granata T, Farina L, et al. Diagnostic imaging in 13 cases of Rasmussen's encephalitis: can early MRI suggest the diagnosis? *Neuroradiology*. 45:171-183, 2003
- 19 Grant PE. Rasmussen encephalitis. in *Pediatric Neuroradiology*. ed. Barkovich JS. Amirsys. Salt Lake, 2007, p1-1-212 ~ 215

## 教育講演 4

## 中枢神経感染症でみられるミオクローヌス

望月仁志・宇川義一

**【要旨】** ミオクローヌス myoclonus は、意識消失を伴わない、突然起きる、短く、とても速い、中枢神経由来の不随意運動と定義される。変性疾患、脳血管障害、脳炎、脳腫瘍、てんかん性疾患、薬物中毒などさまざまな要因で生じうる。神経系の感染症は、部位と病変の性質により、様々なミオクローヌスの原因となりうる。今回は、自験例を中心にいくつかの特徴的な所見を呈する感染症例でのミオクローヌスの病態生理に関して述べる。ロシア春夏脳炎の症例では、epilepsia partialis continua を認めたが、脳磁図における jerk-locked averaging 法にて大脳皮質一次運動野に起源があることを特定した。クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) と亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) の症例においては、脳波における周期性の異常脳波・複合波 (Periodic complexes; PC) の出現とランダムに磁気刺激を運動野に与え、運動野の活動性を検討した。PC 出現後早期の段階では、一次運動野の興奮性は低いが、後半以降は高くなった。CJD でも SSPE でも、脳波が周期的に出現する少し前から、運動野の興奮性が先行して上昇おり、PCにおいても、脳波変化の見える前から中枢神経系の興奮性が上昇していると考えられた。一言にミオクローヌスと言っても、その機序は様々で、未解の部分が多く、また発生の起源により性質は大きく異なる。神経生理学的な手法を用いて、その機序が少しづつ解明されつつある。

Key words: ミオクローヌス、ロシア春夏脳炎、クロイツフェルト・ヤコブ病、  
亜急性硬化性全脳炎、周期性複合波  
myoclonus、Russian spring summer encephalitis、Creutzfeldt-Jakob disease,  
subacute sclerosing panencephalitis, periodic complex

## 1. ミオクローヌスとは

ミオクローヌス myoclonus は、意識消失を伴わない、突然起きる、短く、とても速い、中枢神経由來の不随意運動と定義される<sup>1)</sup>。変性疾患、脳血管障害、脳炎、脳腫瘍、てんかん性疾患、薬物中毒などさまざまな要因で生じうる。筋肉が不随意に収縮することで生じるものと陽性ミオクローヌス、筋収縮が不随意に停止して生じるものと陰性ミオクローヌスという。

神経生理学的な起源により、ミオクローヌスは分類される。その特徴を表 1 に示した。一般的には大きくは、皮質性、皮質下性、脊髄性の 3 つに分類される。

皮質性ミオクローヌスは大脳皮質の一次感覚運動野の異常興奮により、皮質脊髄路を介して広がる。不規則なリズムで、持続時間の非常に短く、姿勢時や運動時に出現しやすく、しばしば刺激過敏性がある。皮質性ミオクローヌスは更に 2 種類の亜型に分類される。刺激過敏性があり、体性感覚、聴覚、視覚刺激などで誘発される場合は、皮質反射性ミオクローヌス (図 1)、刺激に無関係で自発的に生じている場合は自発性ミオクローヌスである。自発性で身体の一部に限局し持続性に持続の短い動きが生じる持続性部分てんかん発作 (epilepsia partialis continua; EPC) も自発性ミオクローヌスの一つと考えられる。図 1 には皮質反射性ミオクローヌスを呈する患者の右正中神経刺激時の体性感覚誘発電位 (右上

表1 ミオクローヌスの起源と特徴

	皮質性	皮質下性	網様体性	驚愕反応	固有脊髄路性	脊髄節性
起源	大脳皮質	?	脳幹網様体	脳幹	脊髄	脊髄
分布	遠位筋優位	?	体幹・近位筋	体幹・近位筋	体幹・近位筋	体幹・近位筋
リズム	不規則	不規則	不規則	不規則	不規則	規則的
		時に規則的				
筋電図	短い	短い～長い	短い	長い	長い	長い
出現順	下行性	同期性	上下行性	上下行性	上下行性	その部位で上下
JLA	棘波	鋭波	なし	なし	なし	なし
速度	50-60	?	50-60	10-20	5-10	?
伝導路	皮質脊髄路	?	網様体脊髄路	網様体脊髄路	固有脊髄路	なし

図1 皮質反射性ミオクローヌス

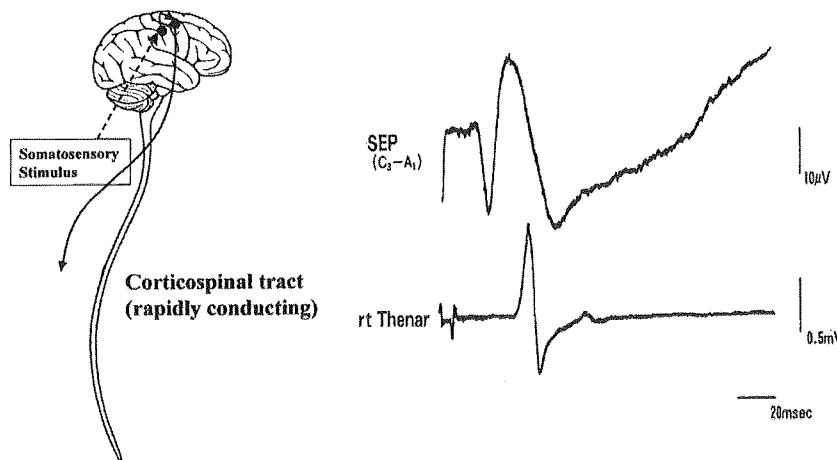


図1 皮質反射性ミオクローヌスの機序。体性感覚などの刺激が大脳皮質感覚野に到達すると近くに存在する一次運動野が反射的に興奮し、その信号が下降してミオクローヌスを生じる。右正中神経を刺激したSEP(体性感覚誘発電位)は、15-20msに皮質成分を認め、それは非常に大きな振幅でgiant SEPと呼ばれる。その後、右母指球筋では皮質からの反射である30-40msに筋電図の反応を認める。

段：somatosensory evoked potential; SEP) と右母指球筋の筋電図(右下段：rt Thenar)を示した。正中神経刺激にて体性感覚誘発電位は20ms近くにgiant SEPを示し、誘発される筋電図は刺激部位で直接末梢神経を刺激した結果の波形(CMAP)(数ms)と一度大脳皮質感覚野から一次運動野を介して誘発される成分(long loop reflex)(約40ms)を認めた。これらを来す疾患としては、進行性ミオクローヌステンカん、良性家族性ミオクローヌステンカん、無酸素脳症後のミオクローヌス(Lance-Adamus症候群)、アルツハイマー病、脊髄小脳変性症、代謝性脳症、プリオン病が挙げられる。

皮質下ミオクローヌスは、脊髄より上位で、大脳皮質よりも下位に起源をもつミオクローヌスを示す。多くは刺激過敏性がなく、本態性ミオクローヌス、周期性ミオクローヌス、網様体反射性ミオクローヌス、驚愕反応などが含まれる。周期性ミオクローヌス(図2)の典型的なものはプリオン病の患者でみられ、脳波では周期性の異常脳波・複合波(Periodic complexes; PC)を呈し、特にプリオン病におけるPCは周期性同期性放電(Periodic synchronous discharge; PSD)と呼ばれる。脳幹網様体・視床などの皮質下の起源からインパルスが発せられ、大脳皮質への信号はPSDを形成し、下降する信号は

ゆっくりと下降し、四肢にミオクローススを生じるという機序が想定されている。亜急性硬化性全脳炎(subacute sclerosing panencephalitis; SSPE)でも周期性のミオクローススを認める。

脊髄性ミオクロースス(図3)は、脊髄起源の異常な神経放電により生じる。脊髄の起源・病変から、上下方向にゆっくりと広がりミオクローススを生じる場合(A)と、髄節に沿って隣接する1,2髄節に支

配される筋群に限局して規則的にミオクローススを生じる場合(B)がある。

神経系の感染症は、部位と病変の性質により、上記のどのタイプのミオクローススの原因ともなりうる。今回は、自験例を中心にいくつかの特徴的な所見を呈する感染症症例でのミオクローススの病態生理に関して述べる。

図2 皮質下ミオクロースス

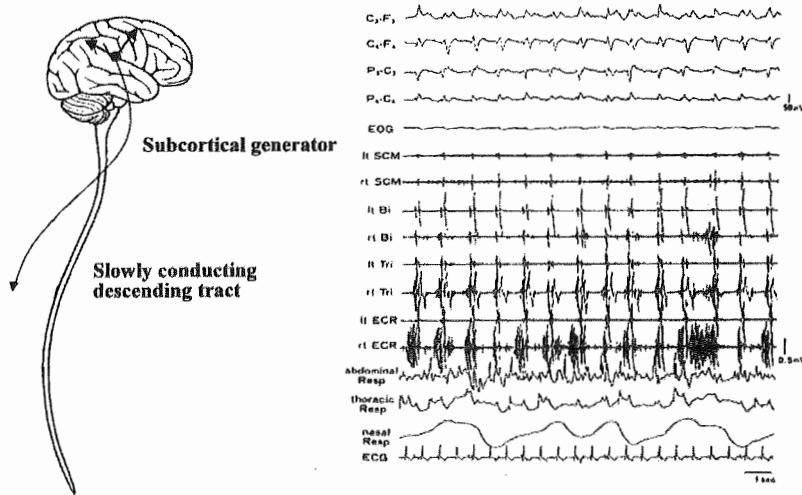


図2 皮質下ミオクローススの機序。Creutzfeldt-Jakob病患者の一例。脳幹網様体・視床などの皮質下の起源からインパルスが発せられ、大脳皮質への信号はPSDを形成し、下降する信号はゆっくりと下降し、四肢にミオクローススを生じるという機序が想定されている。

図3 脊髄性ミオクロースス

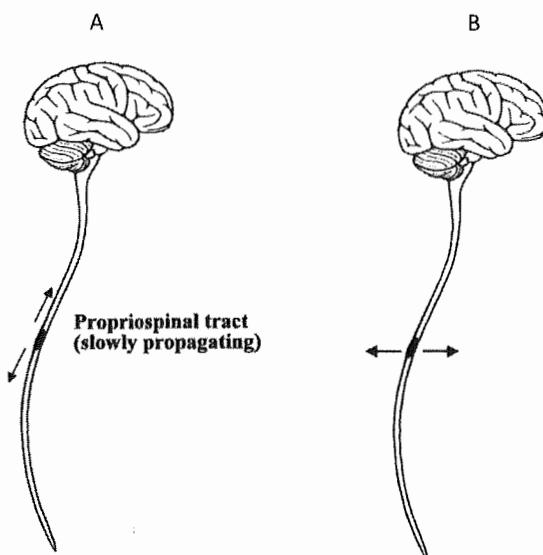


図3 脊髄性ミオクローススの機序。脊髄の起源・病変から、上下方向にゆっくりと広がりミオクローススを生じる場合(A)と、髄節に沿って隣接する1,2髄節に支配される筋群に限局してミオクローススを生じる場合(B)がある。

## 2. ロシア春夏脳炎での部分てんかん

ロシア春夏脳炎 (Russian spring summer encephalitis; RSSE) は、ダニ媒介性脳炎の一つで、マダニによって媒介されるフラビウイルス感染症である。シベリアおよびヨーロッパでみられるものであり、日本においては一例の報告<sup>2, 3)</sup>をみるのみである。潜伏期間は7～14日で、潜伏期の後に頭痛、発熱、恶心、嘔吐が見られ、極期には精神錯乱、昏睡、痙攣、麻痺などの脳炎症状が出現することもある。

ここに提示する症例は日本における発症例<sup>2, 3)</sup>である。38歳女性で、発熱、頭痛、吐気にて発症し、入院した。生活歴としては、酪農業を営み、搾取した未処理の牛乳を飲んでいたが、ダニに咬まれた記憶はなかった。入院後、意識障害と髄膜刺激症状が出現するようになり、構音障害と錐体路症状、全身の筋緊張亢進を伴っていた。更に全身の強直性間代性痙攣が頻発し、人工呼吸器管理下におかれました。髄液検査においては、蛋白167.5 mg/dl、細胞数 468 /mm<sup>3</sup> (リンパ球 99%) で、ウイルス性脳炎として治療開始された。その後意識状態は改善したが、四肢に弛緩性麻痺が出現した。第18病日人工呼吸器から離脱し、意識は清明であったが、球麻痺による構音障害と嚥下障害を認め、また頸部および上肢に弛緩性麻痺と両下肢の痉挛性麻痺を認めた。この時点で、

血清学的に原因ウイルスはロシア春夏脳炎ウイルスの可能性が高いとされた。第74病日の脳MRIでは両側視床にT1強調画像で低信号、T2強調画像で高信号の病変を認めた。

発症4カ月の時点では、これらの症状はやや改善を示したが、徒手筋力テスト (MMT) では頸筋は2、上肢では左のC5レベルの支配筋で特に強い筋力低下を認め MMT 1-2であり、その他は3であった。下肢では左側優位に MMT4程度の筋力低下を認めた。深部反射では、左側優位に両側上腕二頭筋反射の低下を認めたが、その他の深部反射は左優位に亢進していた。

不随意運動が左上肢に認められた。左上肢には、安静時でも左上肢全体を内旋させ手首と手指を屈曲するような鋭い速い動きが何回か続けて出現した。精神的負荷や運動を行おうとすると、振幅と頻度が増強し数分続けて出現した。この不随意運動の解析のために、ポリグラフを記録した。脳波は国際10-20法のF3、Fz、F4、C3、Cz、C4、P3、Pz、P4の単極誘導で記録し、表面筋電図は左右の第一骨間筋 (FDI)、橈側手根伸筋 (ECR)、尺側手根屈筋 (FCU) の筋腹と腱に電極を置き記録した(図4)。左上肢の速い動きに対応して、lt FDI、lt ECR、lt FCUに持続の短い振幅の大きな筋放電が約4Hz前後で同期してみられた。これらに先行して脳波ではP4、Cz優位に小

図4 ロシア春夏脳炎患者のポリグラフ

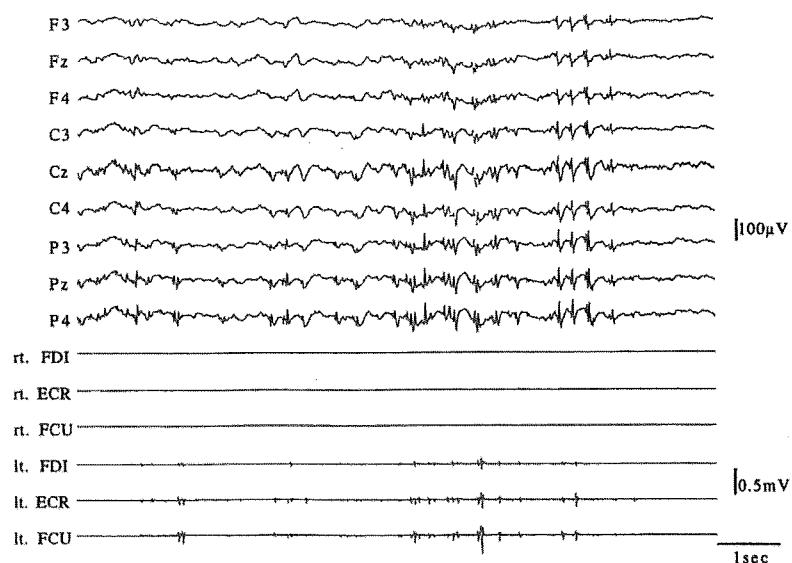


図4 ロシア春夏脳炎患者の左上肢のポリグラフ(文献3から引用)。上から9記録は脳波を示す。国際10-20法の誘導、不関電極は同側の耳たぶ。下の6記録は表面筋電図。左右第一骨間筋 (FDI)、橈側手根伸筋 (ECR)、尺側手根屈筋 (FCU)。左手の動きに対応して、左 FDI、ECR、ECU に持続の短い筋放電が同期してみられる。この筋放電に先行して脳波には小さな棘波が見られた。この棘波はP4、Cz優位に見られる。

図5 ロシア春夏脳炎患者の脳磁図

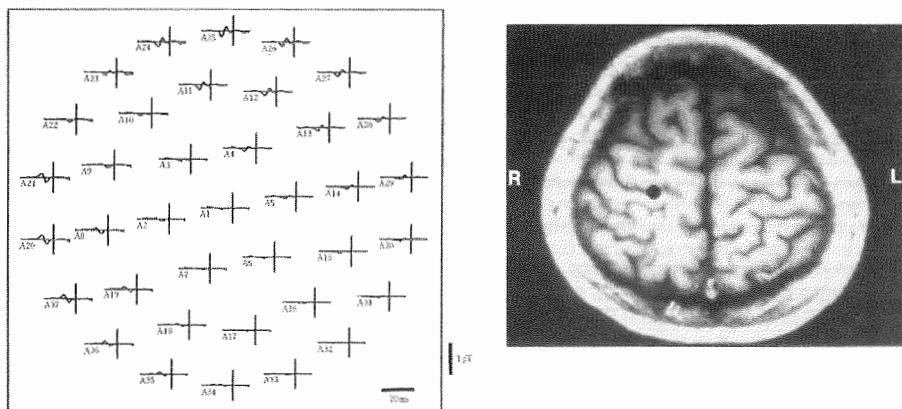


図5 ロシア春夏脳炎患者の脳磁図と脳MRI画像(文献3から引用)。左ECRに見られる筋放電をトリガーとして先行する脳磁場の変化を加算した波形(jerk-locked magnetic field)とその対応する位置を示した脳MRI画像。37チャンネルの記録をセンサーコイルの位置に対応して表示した。それぞれの記録で垂直な線がミオクローヌスの筋電図の開始を示している。ミオクローヌスに先行して、2相性の磁界の活動が認められた。

棘波が見られた。Jerk locked averaging法を行うと、lt ECRにみられる筋放電をトリガーとして、脳波を平均加算するとP4を中心に筋放電より9.6 ms先行して脳電位が見られた。また、脳磁図検査により、このpre-myoclonus spikeが運動野に局在することが証明(図5)された。即ち、頭頂部付近の大脳皮質の発火がこの不随意運動に関与していることが示された。左上肢に限局した速い動きが持続的であり、これに対応して脳波に棘波がみられることから、epilepsia partialis continua<sup>4)</sup>と考えられた。

### 3. プリオニン病(Creutzfeldt-Jakob病; CJD)

CJDはミオクローヌスを呈する代表的な疾患である。ヒトのプリオニン病は、その原因別に3型に分類される。即ち、原因不明の孤発性CJD、感染性プリオニン病、そして遺伝性プリオニン病である。孤発性のCJDはプリオニン病全体の約80%を占め、原因が不明で、平均60歳台に発症する。極めて進行の早い認知症および運動障害疾患である。感染性のプリオニン病は全体の約10%を占め、Kuru、変異型CJD、および医原性CJDの3つがある。Kuruとはパプアニューギニア原住民の宗教上儀式における死後脳を食べる風習により、女性と子供に発症し、病理学的なKuru斑が特徴とされる。変異型CJDとは英国を中心とする州で多発した型で、1996年に初めて報告され、「狂牛病」といわれる牛海绵状脑病(bovine spongiform encephalopathy; BSE)との関連が確実視されている<sup>5)</sup>。医原性プリオニン病は、プリオニン病に汚染されて

いたと推測されるヒト乾燥硬膜の移植後、数年～十数年の潜伏期を経て発症するプリオニン病である。遺伝性プリオニン病は全体の約10%を占め、臨床病型から、家族性CJD、Gerstmann-Sträussler-Scheinker症候群(GSS)、致死性家族性不眠症(FFI)に分けられる。

今回提示する症例は、65歳の男性で孤発性CJDの一例である。主訴は頭痛、意思疎通困難、歩行障害。病歴は■■■年3月頃より右側後頭部に頭痛が出現し、4月中旬からは独り言が増加した。5月上旬より傾眠傾向となり、食欲低下、体重が減少した。5月中旬には会話が成立しなくなり、精査目的入院となった。既往歴は50歳からの高血圧症のみで、手術歴はない。入院時の神経学的所見では、意識レベルは変動し、時に無為無動となっていた。高度に認知機能障害があり、意思表示も高度に障害されていた。前頭葉徵候、錐体路徵候はともに陽性で、筋固縮も認めた。尿失禁もあった。また、四肢にミオクローヌスが出現し、startle responseも増強されていた。髄液ではNSE 110 ng/ml、14-3-3蛋白(++)であったが、プリオニン蛋白遺伝子には変異はなかった。脳波所見の経過を図6に示した。当初は徐波が目立つ所見であったが、徐々に全般性に周期性同期性放電(periodic synchronous discharge; PSD)が目立ち始め、それ以外の徐波の部分は平坦化し始めた。最終的にはこのPSDさえも小さくなってきた。

CJD患者においては、ミオクローヌスを認めた患者の79%にPSDを認め、PSDを認めた際のCJDの診断は90%以上確実<sup>6)</sup>となる。PSDとミオクローヌ

図6 CJD患者の脳波



図6 CJD患者の脳波の推移。当初は徐波が目立つ所見であったが、徐々に全般性に周期性同期性放電(periodic synchronous discharge; PSD)が目立ち始め、それ以外の徐波は平坦化し始めた。最終的にはこのPSDの振幅も小さくなっている。

スは同期しないことが多いが、CJDのミオクローヌスについて jerk-locked averagingを行うと、PSDはミオクローヌス筋放電より50-80ms先行する。これは多くの皮質性ミオクローヌスが10-25ms先行するのに比較して長く、発生機序の違いが推測される<sup>7)</sup>。

上記の症例を含めたCJD患者4名での、大脳運動野の活動性とPSDの関連について検討した<sup>8)</sup>。図7のように、通常の脳波を記録しながら、磁気刺激(transcranial magnetic stimulation)をPSDのタイミングとランダムに一次運動野に与える方法である。磁気刺激によるmotor evoked potential (MEP)を評価した。PSD onsetからTMSまでの潜時間隔を求め、その間隔とMEPの大きさについて検討した(図7)。図8Aに潜時間隔とMEPの振幅のグラフを示した。間隔が短いほど(PSDの直後ほど)MEPは小さく、長いほど(PSD出現後から時間が開くほど)MEPは大きくなることが判明した。図8BにPSD出現間隔を四等分し、その中でどの時点で磁気刺激したかによりMEPの大きさを分析したものを示した。PSD出現後早期の段階と、後期の段階では、前者の方が一次運動野の活動性が低いと推測された。PSDの起源は未だに明らかではないが、

脳幹網様体・視床から皮質への投射が関連している<sup>6, 9)</sup>とされ、この投射により一次運動野の活動性がPSDの出現前から上昇していると考えられた。

#### 4. 亜急性硬化性全脳炎(subacute sclerosing panencephalitis; SSPE)

SSPEは、麻疹に感染してから5～10年の無症状期間を経て神経症状を発症し、発病後は数年の経過(亜急性)で徐々に悪化し、大脳皮質機能を喪失して死に至る中枢神経感染症で、遲発性ウイルス感染症である。発症のメカニズムはまだ正確には解明されていないが、2歳未満の乳幼児や免疫機能が低下している状態で麻疹に罹患した場合にSSPEを発症する割合が高くなることから、中枢神経系が発展途上にある時期に麻疹に感染し、免疫系の監視システムが十分でない場合に持続感染が成立すると考えられている。

発症後の経過はJabourにより4つの病期に分類される<sup>10)</sup>。第1期は、大脳皮質の機能障害期で、周囲への無関心、意欲の低下、学業の不振、第2期は、運動障害とけいれんの時期で、四肢の運動能力の低下とミオクローヌスを主体としたけいれん発作、

図7 PSDと磁気刺激による運動誘発電位

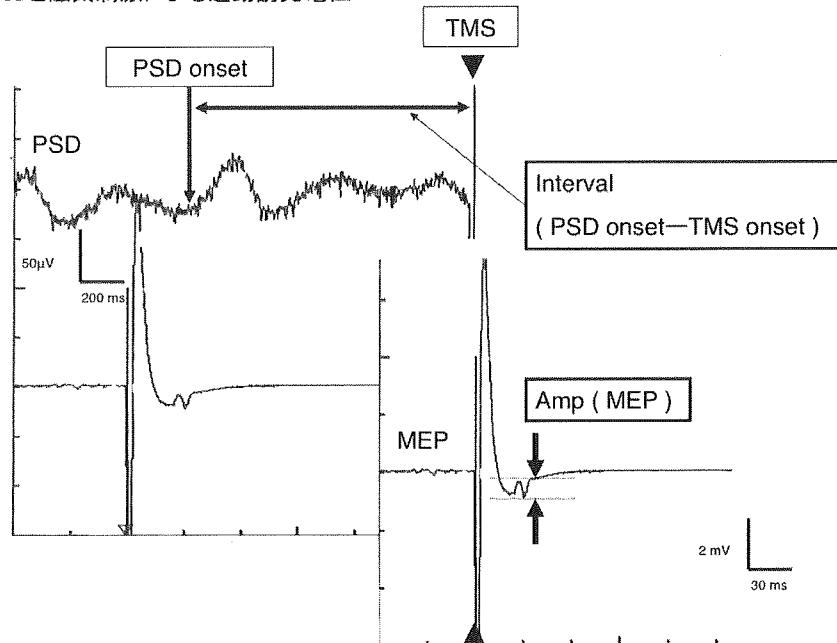


図7 CJD患者における脳波PSDと磁気刺激による運動誘発電位(文献8から引用)。磁気刺激をPSDとは無関係のタイミングで実施し、PSD onsetからのTMSの間隔と運動誘発電位MEPの大きさを検討した。

図8 PSDと磁気刺激による運動誘発電位の振幅

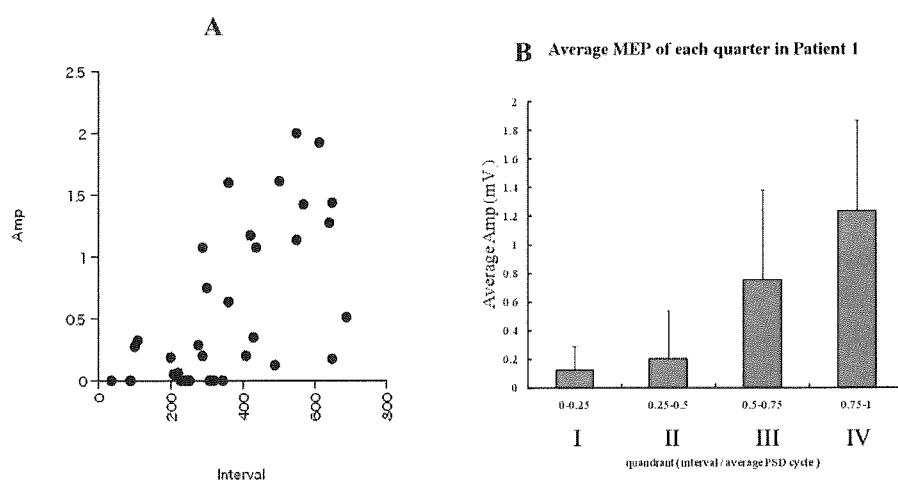


図8 CJD患者における脳波PSDと磁気刺激による運動誘発電位MEPの振幅(文献8から引用)。A: 潜時間隔(PSD onset - TMS)とMEPの振幅のグラフ。間隔が短いほど(PSDの直後ほど)MEPは小さく、長いほど(PSD出現後から時間が開くほど)MEPは大きくなつた。B: PSD出現間隔を四等分し、その中でどの時点で磁気刺激したかによりMEPの大きさを分析。PSD出現後早期の段階と、後期の段階では、前者の方が一次運動野の活動性が有意に低かつた。

第3期は、意識レベルは更に低下し、昏睡状態へと近づき、自律神経障害が著明、第4期は無言・無動状態で、ミオクローヌスは消失する時期である。脳波においては周期性複合波(Periodic complexes; PC)を認め、これはミオクローヌスと関連することが多く、病期においてもミオクローヌス出現の多い第2・3期、特に第3期に主に認められる<sup>11)</sup>。このPCを、CJDと同様にPSDと呼ぶかどうかは議論<sup>12)</sup>のあるところで、国際的にもその呼び方は統一されていない。そのため、この総説ではSSPE患者における周期性の異常脳波をそのまま周期性複合波(Periodic complexes; PC)と呼ぶ。

今回提示する症例は、16歳の男性で、臨床的には典型的な経過をたどったSSPEの一例である。15歳ころより徐々に成績が低下し、性格変化が出現した。数カ月後より四肢のミオクローヌスが出現。その後歩行障害出現し、2カ月で歩行不能となり、当科に精査加療目的で入院となった。血清、髄液の麻疹抗体価の上昇、髄液IgG indexの上昇、脳波でのPCを認め、SSPEと診断された。

SSPE患者のほとんどの症例に長期に渡って周期性複合波(PC)を認め<sup>11, 13)</sup>、その複合波は最初に振幅の大きい鋭波が出現し、続いていくつかの徐波が現れる波形(振幅は100～1000μV、持続は1～3

秒程度)で構成され、徐波が出現しない間欠期には平坦に近い脳波になる。CJD患者のPSDが2, 3相であるのと大きく異なる。また、両側同期性、左右対称性に出現し、3～10秒程度の間隔で反復する<sup>14)</sup>。この間隔は病初期には10秒以上のこともあるが、進行に伴い2秒程度まで短縮してくる(図9)<sup>13)</sup>。

当患者において、上記CJD患者における検討と同様に磁気刺激をPCとの間隔とランダムに行ったところ、図10のような結果を得た。即ち、PC出現後早期の段階では、一次運動野の興奮性は低いが、後半以降は高くなった。CJDでもSSPEでも、脳波が周期的に出現する少し前から、運動野の興奮性が先行して上昇おり、PCにおいても、脳波変化の見える前から中枢神経系の興奮性が上昇していると考えられた。出現する頻度の差はあるが、その原因は、PCの起源となる部位の周期性の差によるものと推測された。

以上、自験例を中心に中枢神経感染症にみられるミオクローヌスをその病態機序の解明とともに紹介した。一言にミオクローヌスと言つても、その機序は様々で、未解の部分が多く、また発生の起源により性質は大きく異なる。神経生理学的な手法を用いて、その機序が少しづつ解明されつつある。

図9 SSPE患者の脳波所見の経過

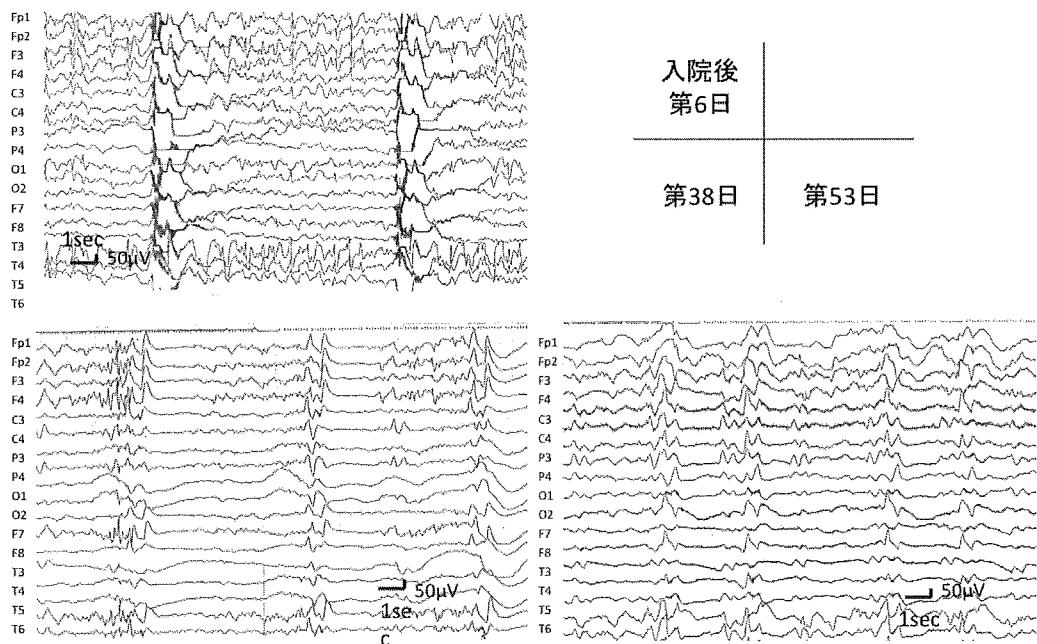


図9 SSPE患者の脳波所見の推移。CJD患者のPSDと異なり周期性の複合波といえる。症状の進行に伴い周期性複合波以外の部分の平坦化、および周期性複合波の間隔が短くなっている。

図10 SSPE患者のPSDとMEP

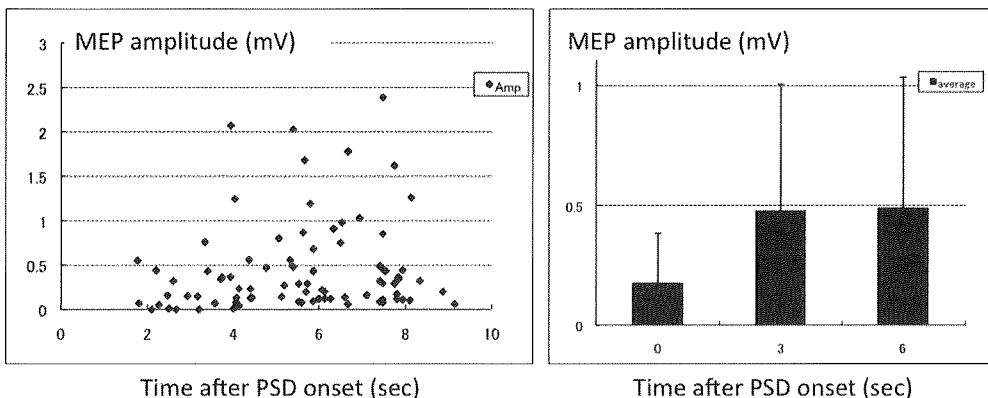


図10 SSPE患者における脳波周期性複合波と磁気刺激による運動誘発電位MEPの振幅。周期性複合波後早期(3秒未満)におけるTMSによるMEPは小さいが、後期以降(3秒以降)は大きい。

## 文 献

- 1) Fahn S, Marsden CD, Van Woert MH: Definition and classification of myoclonus. Adv Neurol 43: 1-5, 1986.
- 2) 竹澤周子, 佐藤達郎, 水谷保幸ら: ロシア春夏脳炎の1例. 神經内科 43: 251-255, 1995.
- 3) 花島律子, 寺尾安生, 宇川義一ら: 急性ロシア春夏脳炎例の回復期にみられた不随意運動の解析. 臨床神経 36: 571-576, 1996.
- 4) Bien CG, Elger CE: Epilepsia partialis continua: semiology and differential diagnoses. Epileptic Disord 10: 3-7, 2008.
- 5) Will RG, Ironside JW, Zeidler M, et al: A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. Lancet 347: 921-5, 1996.
- 6) Wieser HG, Schindler K, Zumsteg D. EEG in Creutzfeldt-Jakob disease. Clin Neurophysiol 117: 935-51, 2006.
- 7) Shibasaki H, Motomura S, Yamashita Y, et al: Periodic synchronous discharge and myoclonus in Creutzfeldt-Jakob disease: diagnostic application of jerk-locked averaging method. Ann Neurol 9: 150-6, 1981.
- 8) Sakuishi K, Hanajima R, Kanazawa I, et al: Periodic motor cortical excitability changes associated with PSDs of EEG in Creutzfeldt-Jakob disease (CJD). Clin Neurophysiol 116: 1222-6, 2005.
- 9) Moruzzi G, Magoun HW: Brain stem reticular formation and activation of the EEG. Electroenceph Clin Neurophysiol 1: 455-73, 1949.
- 10) Jabbour JT, Duenas DA, Modlin J: SSPE: clinical, staging, course, and frequency. Arch Neurol 32: 493-4, 1975.
- 11) Praveen-kumar S, Sinha S, Taly AB, et al: Electroencephalographic and imaging profile in a subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) cohort: a correlative study. Clin Neurophysiol 118: 1947-54, 2007.
- 12) 大沼歩: 脳波所見PSD (periodic synchronous discharge)に関する提言. 臨床神經生理 37: 25-6, 2009.
- 13) Wulff CH: Subacute sclerosing panencephalitis: serial electroencephalographic studies. J Neurol Neurosurg Psychiatry 45: 418-21, 1982.
- 14) Markand ON, Panszi JG: The electroencephalogram in subacute sclerosing panencephalitis. Arch Neurol 32: 719-26, 1975.

## 教育講演 5

## 神経感染症ガイドラインの検証

亀井 聰

【要旨】単純ヘルペス脳炎：転帰不良が多い。最近の欧米ガイドラインは、アシクロビル(Acv)が2～3週と延長し、米国は新生児では倍量投与が推奨されている。しかし、遷延例の解析から、投与延長では限界があり初期量の再検討も必要と考える。ステロイド併用は欧州で二重盲検が進行中である。この有用性の機序はサイトカイン・カスケードの抑制である。細菌性髄膜炎：2008年インフルエンザ菌、2009年肺炎球菌のワクチンが導入された。米国では導入後、これら髄膜炎の患者が減少した。本邦でもワクチンが広く導入された場合、発症抑制が期待される。結核性髄膜炎：英国の新たなガイドラインでは、INH・RFP・PZA・EBで2ヵ月、その後INH・RFPで10ヵ月となった。ステロイド併用のメタ解析から、HIV非感染例では併用が推奨される。神経感染症の病態や治療は変化し、日本のガイドライン改訂が望まれる。

Key words: 単純ヘルペス脳炎 herpes simplex encephalitis, 細菌性髄膜炎 bacterial meningitis, 結核性髄膜炎 tuberculous meningitis, 診療ガイドライン clinical guideline, 副腎皮質ステロイド薬 corticosteroid, ワクチン vaccine

## はじめに

中枢神経系感染症である髄膜炎・脳炎のガイドラインについて、(1)単純ヘルペス脳炎、(2)細菌性髄膜炎、および(3)結核性髄膜炎の順序で最近の動向を踏まえ検証する。

### 1. 単純ヘルペス脳炎 (herpes simplex encephalitis: HSVE)

最近公表された欧米のガイドラインとして、英国のリバプールガイドライン<sup>1)</sup>と米国感染症学会のガイドライン<sup>2)</sup>が挙げられる。これら最近のガイドラインにおける、従来のガイドラインとの変更点、本邦ガイドラインとの相違、および最近の動向を踏まえ、本症の診断と治療について述べる。

## 1) 診断

Polymerase Chain Reaction (PCR) は本症の標準的検査法として確立している。現在、PCRには通常のsinglePCR、nested PCR、およびreal time PCRがある。一般に、nested PCRは通常のsingle

PCRよりも最小検出感度が高い。本症ではサンプルあたり10～20コピーの感度が必要とされているが、本邦の外部検査の多くは通常のsingle PCRで十分な検出感度ではない。一方、nested PCRや高感度real time PCRは5コピーである。従って、本症の診断には、高感度PCRによる検索が必要である。しかし、PCRの陽性率は、発症48時間以内と発症14日以後、さらにアシクロビル投与1週間以後で低くなり、偽陰性を呈する可能性がある。従って、発症早期や発症2週間以後の陰性は本症を除外することはできない。高感度PCRでも本症の急性期に陰性を呈する場合もあり、臨床的に本症を疑う場合にはアシクロビル治療は継続し、繰り返し検査することが必要である。従来、本邦<sup>3)</sup>や欧州のガイドライン<sup>4,5)</sup>では、発症早期に陰性の場合には、図1に示すように再検が推奨されていた。一方、米国では、PCRは感度96-98%、特異度95-99%と高いので、その初回結果をもって、病因診断するとなつており、髄液の抗体診断は疑陽性あるからの理由で除外されていた。しかし、今回、このPCRの発症早期の陰性化を認識し、それを補完する意味において

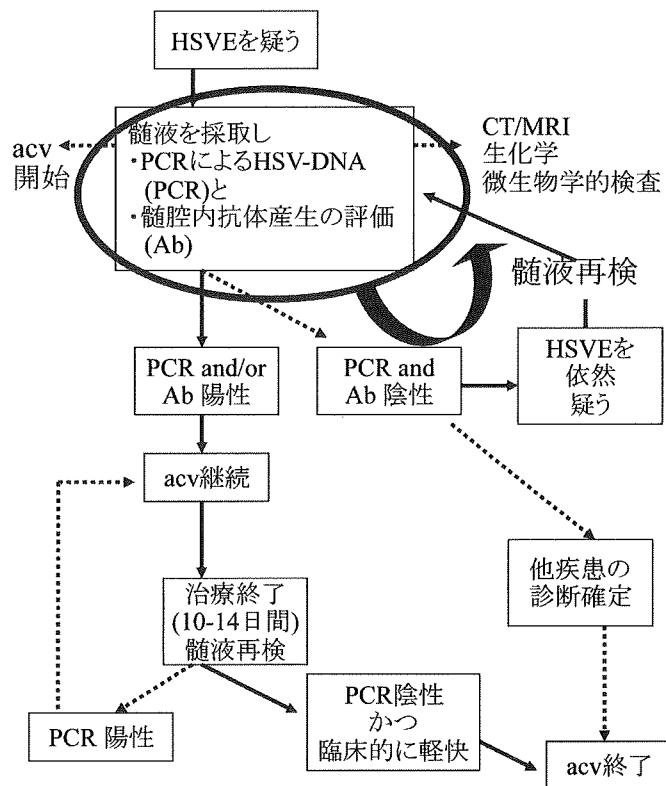


図1.

HSVE=単純ヘルペスウイルス脳炎、acv=アシクロビル、HSV=単純ヘルペスウイルス

#### 図1. 欧州ガイドラインにおける本症診断・治療のフローチャート

診断は、PCR法によるHSV-DNAの確認と抗体診断による髄腔内抗体産生所見の確認が並列で挙げられている。急性期にその両者が陰性でも、臨床的に本症が疑われる場合は、アシクロビルは継続し、再度髄液を採取し再検することが薦めている(文献4、5を改変)。

髓液の抗体診断の有用性も認識され、欧洲や本邦のガイドラインと同様になった。

従来、米国では転帰不良要因として年齢が30歳以上、発症から抗ウイルス薬開始までの期間が4日以上、抗ウイルス薬開始時の意識障害が、Glasgow Coma Scaleで6点未満、CTにて病巣を検出、初回髄液のPCRによるHSV-DNAが1ml中100コピー以上の各要因を引用していた。しかし、いずれもcut off値が設定されている群間比較であった。例えば、99コピーと100コピーで本当に影響度が異なるといえるのかとの疑問があった。髓液中ウイルス量と転帰との関連は、もし髓液中のウイルス量と転帰が相関するなら、初回のPCR定量結果で、アシクロビルの量を変えるという治療指針が成り立つことが考えられ、その真偽は重要である。そこで、自験例を対象に髓液中のウイルス継時的に測定し報告<sup>6)</sup>した。その結果を図2に示す。図2に示したごとく、髓液中のウイルス量と転帰とは必ずしも関連を示さないと報告した。この結果を踏まえ、今回の米国のガ

イドラインでは、本症の転帰不良要因として、PCRによる髓液ウイルス量は削除となった。

#### 2) 治療

日本のガイドライン<sup>3)</sup>では、アシクロビルは一日あたり10mg / kg、1日3回で2週間が推奨されている。アシクロビルにより死亡率は未治療における60～70%から19～28%と低下したが、死亡と高度後遺症を含めた転帰不良率は33～53%と未だ高く、社会復帰率も半数である。以上から、更なる改善を目指した新たな治療薬や治療指針の構築が望まれる。最近の欧米のガイドライン<sup>1,2)</sup>において、第一選択薬であるアシクロビルの推奨されている投与期間が従来の2週間から2～3週間にと投与期間が延長している。最近、我々は抗ウイルス薬の投与期間の追加延長だけで本当に十分であるのかとの問題意識から、本症の遷延例の検討<sup>7)</sup>を報告した。初回アシクロビル治療の2週間終了の時点での神経所見の改善を認めないのを遷延例と規定した場合、遷延8例と非遷延15例に区分し、その臨床像を比較し

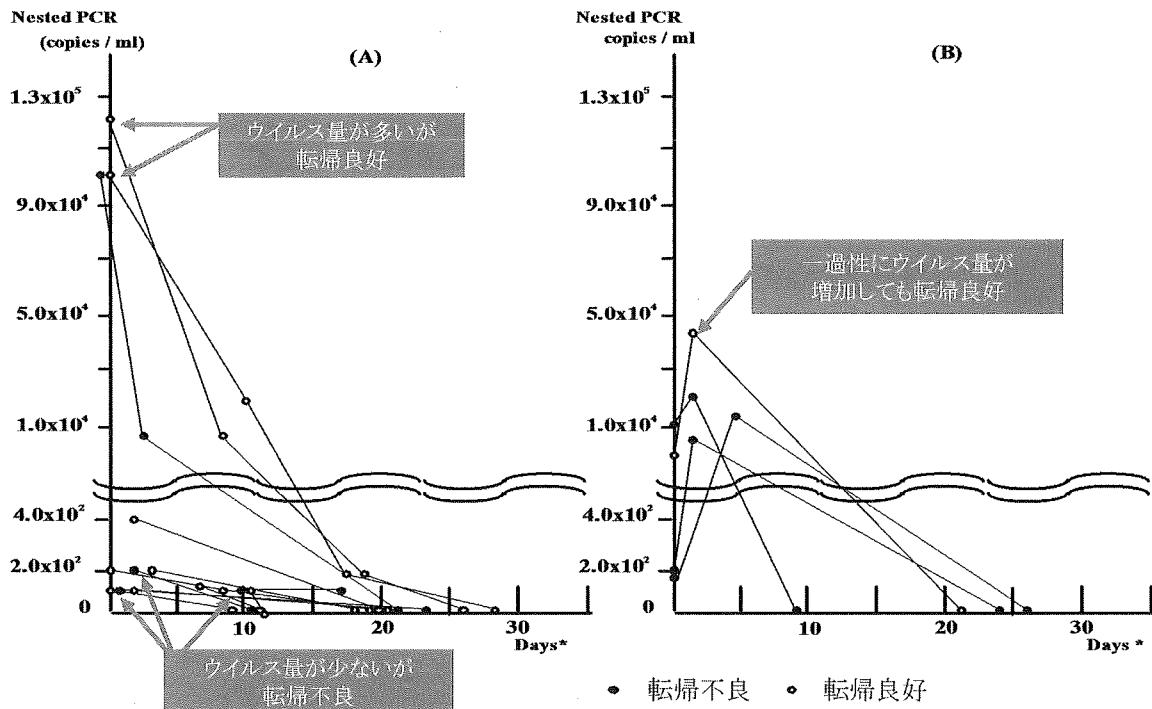


図2.

#### 図2. 繰時的な髄液中のウイルス量と転帰との関連

グラフは、縦に髄液中のウイルス量を対数で示し、横に病日を示してある。左のグラフ(A)は、継時にウイルス量が減少した症例(14例)、右のグラフ(B)は継時に一度ウイルス量が増加した症例(4例)である。白丸は転帰良好、黒丸は不良である。結果は、グラフ(A)に示したように、ウイルス量が多くても転帰良好例はあり、ウイルス量が少くとも不良例はある。また、グラフ(B)のごとく、一過性に増加する症例では転帰不良との過去の報告もあるが、転帰良好例も存在した。(文献6)。

た。その結果、遷延例は非遷延例に比較し、治療開始時の意識障害が高度でCTにて病巣を検出する頻度が高く、かつ転帰不良であった。この意識障害とCTにおける病巣検出という遷延例の要因は、従来指摘されている転帰不良要因と同様であった。そして、これら遷延例8例は全例抗ウイルス薬の追加延長をおこなっていた。抗ウイルス薬の追加投与で半数は改善し、転帰良好であった。特に、転帰良好4例中3例がadenine-arabinosideを追加投与していた事実は、アシクロビル耐性株を考慮すると注目された。しかし、残り半数は転帰不良であり、抗ウイルス薬の追加投与のみでは限界があると考えた。従って、今後、初回アシクロビル用量の再検討、例えば、高齢者や意識障害高度な例におけるアシクロビルの增量も検討すべきと考える。

我々は、2005年に多変量解析による転帰影響要因の検討から、図3に示すように急性期の副腎皮質ステロイド薬併用の有用性を臨床的に初めて報告<sup>8)</sup>した。最近公表されている欧米のガイドライン<sup>1,2)</sup>

は、この論文を引用し、その併用を考慮しても良いとされている。現在、この論文を基に欧州において副腎皮質ステロイド薬併用の有用性の確認が多施設無作為二重盲検が成人例372例を目標症例数として進行中である<sup>9)</sup>。その概要によれば、デキサメタゾンとプラシーボの二重盲検で、デキサメタゾンは40mg / 日×4日間投与である。この副腎皮質ステロイド薬の容量設定は、細菌性髄膜炎の本薬の有用性の検討における設定量に準拠しており、この用量ではプラセボ群との間で消化管出血の頻度が有意差がなかったことから、倫理的にクリアできると考え、設定されている。なお、評価のエンドポイントはrandomizationの6か月後と12か月後に、modified Rankin Scale、Glasgow outcome scale、EuroQoLなどにて機能評価するとなっている。その結果が待たれる。

一方、最近公表された欧州のガイドライン<sup>10)</sup>では、副腎皮質ステロイド薬の有用性の機序が今後の研究課題として指摘されていた。この課題に対し

検討要因	単変量 ロジスティック解析		多変量 ロジスティック解析	
	Odds 比	危険率	Odds 比	危険率
性	0.992	0.989	—	—
年齢	2.04	0.002	2.157	0.007
アシクロビル開始時の発症からの病日	1.097	0.144	—	—
アシクロビル開始時の意識障害の程度	1.424	0.002	1.434	0.013
初回髄液細胞数	1.000	0.784	—	—
経過中の髄液細胞数の最高値	1.000	0.801	—	—
初回髄液の蛋白濃度	1.001	0.730	—	—
経過中の髄液蛋白濃度の最高値	1.002	0.495	—	—
入院時頭部CTでの病巣検出の有無	6.222	0.044	4.131	0.181
初回頭部MRIでの病巣検出の有無	5.400	0.135	—	—
脳波における一側てんかん型放電の検出	1.050	0.936	—	—
副腎皮質ステロイド薬の併用の有無	3.467	0.041	7.877	0.045

図3.

## 図3. 単純ヘルペス脳炎の転帰影響要因の解析結果

東北大学と日本大学との共同で、本症成人例45例の転帰影響要因を多変量解析した結果。検出された有意な要因を矢印で示してある。年齢が若いほど、治療開始時の意識障害が軽度なほど、副腎皮質ステロイド薬を併用した方が転帰良好という結果であった(文献8)。

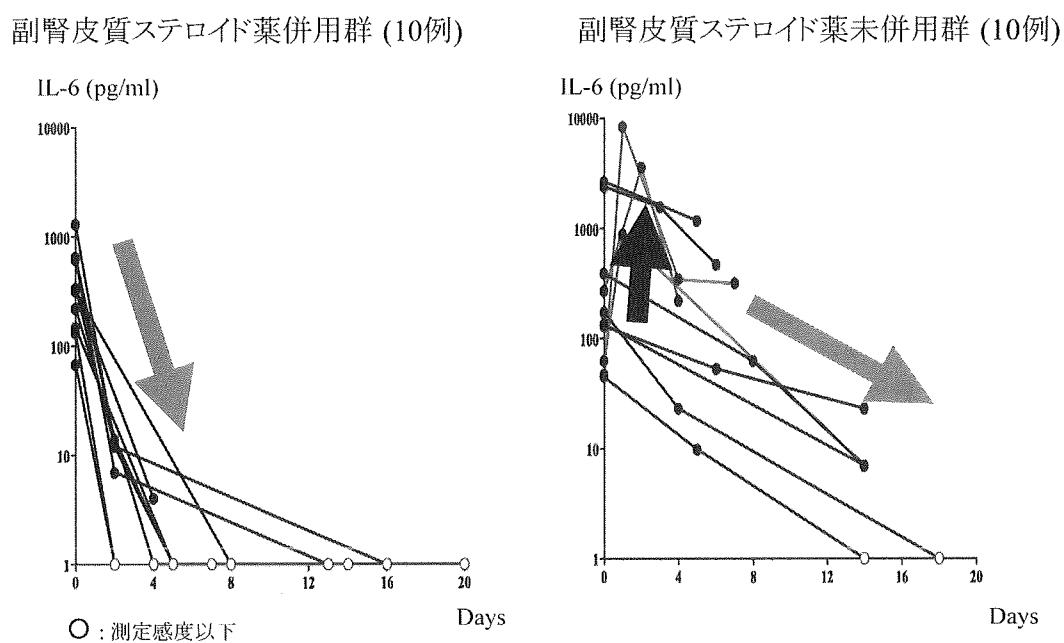


図4.

## 図4. 単純ヘルペス脳炎における髄液インターロイキン(IL)-6の継時的実測

縦に髄液中のIL-6濃度を対数で示し、横に病日を示してある。左図の副腎皮質ステロイド薬併用群では、炎症性サイトカインの一つであるIL-6が投与後急速に減衰していた。一方、右図の未併用群では急激に増加する症例や減衰例でも緩やかに減少を呈していた。両群間の減衰率の相違は統計学的に有意であった(文献10)。

て、我々は、昨年、髄液サイトカインの検討をおこないその機序を報告<sup>10)</sup>した。本症急性期において、髄液中のInterferon(IFN)-γの初回値およびInterleukin(IL)-6経過中最高値は転帰不良群で有意に高値であり、さらに図4に示すとく髄液IL-6濃度が副腎皮質ステロイド薬併用群で未併用群より有意に急速に減衰することを明らかにした。以上の結果から、髄液IFN-γの初回値やIL-6経過中最高値は転帰を予測するbiomarkerになり得ること、および副腎皮質ステロイド薬の有用性の機序としてpro-inflammatory cytokineの産生抑制にあることを立証した。

## (2) 細菌性髄膜炎

費用対効果や耐性菌の頻度からも、ワクチン接種により発生数を減らすことが最善である。日本でも、2008年にヘモフィルスb型インフルエンザ菌ワクチンが発売され、2009年に7価肺炎球菌結合型ワクチン(PCV-7)が製造承認された。従来の23価肺炎球菌多糖体ワクチン(PPV)では、乳児や低年齢児、Human immunodeficiency virus(HIV)患者や血液腫瘍患者、骨髄移植患者などでカバーできない問題があった。しかし、PCV-7はこれらの患者もカバーし、十分な免疫反応を誘導することができる。米国では2000年にPCV-7が導入され、肺炎球菌性髄膜炎の発生数が10万人あたり1.13人から0.79人へと3割減少している<sup>11)</sup>。本邦の肺炎球菌性髄膜炎における血清型<sup>12)</sup>によればPCV-7のカバー率は小児で76.2%、成人で43.9%であり、PCV-7の接種が広く導入された場合には、肺炎球菌性髄膜炎に対する発症予防が期待される。しかし、現時点のPCV-7の出荷ベースにおける摂取率でも、未だ15%未満であり、今後本ワクチンの摂取率の向上が課題と考える。

本症は、多くの抗菌薬が開発されている現在においても、死亡率15～35%、後遺症率10～30%と未だ満足すべき治療成績ではない。従来、本症の転帰影響要因の多くは群間比較であった。多変量解析による解析としては、オランダから多数例での報告<sup>13)</sup>がされており、年齢、耳炎や副鼻腔炎、皮疹の欠如、意識障害の程度、頻脈、血培での菌検出つまり菌血症、血沈の亢進、血小板の減少、髄液細胞数の低値が挙げられている。しかし、オランダの耐性菌の頻度は0.9%と著しく低値であり、耐性菌の頻度が半数以上の症例でみられる米国や本邦の検討はなかった。最近、我々は自施設の市中感染による71例を検討して報告<sup>14)</sup>した。結果は、多変量解析にて

治療開始時の意識障害の程度と血小板数の減少が有意な要因であった。耐性菌の有無は有意な要因ではなかった。

本症の病態を図5に示す。今回の転帰影響要因の解析から得られた影響要因である意識障害の程度が図5の下段に示した脳障害の重症度を反映していると考えた場合、早期の副腎皮質ステロイド薬投与によるサイトカイン・ケモカインカスケードおよび酸化窒素の抑制は、患者の転帰の上から重要であるといえる。一方、もう一つの要因である血小板の減少が有意な要因であったことからは、図5の右側に示されているDisseminated Intravascular Coagulationなど凝固異常を呈するカスケードに対し早期からの治療的介入が、本邦における本症での転帰の点から併せ重要なと考えられた。

## (3) 結核性髄膜炎

英国感染症学会より本症の新たなガイドライン<sup>15)</sup>が公表された。従来の英国の治療指針はisoniazide(INH)・rifampicin(RFP)・pyrazinamide(PZA)の3剤で開始し、必要であればEthambutol(EB)またはstreptomycin(SM)を追加するとしていた。今回のガイドラインでは、最初の2ヵ月間はINH・RFP・PZA・EBの4剤で治療し、その後10ヵ月間INHとRFPの2剤の継続治療に変更されている。このEBを第一選択に加えた理由は、EBによる視神經障害の出現率が、通常投与量では3%未満と比較的少数であることが明らかになったこと、および世界的にSMの感受性が低下(耐性化)していることがWHOから報告されていることが挙げられる。一方、本症の副腎皮質ステロイド薬の併用はその是非について長い間議論されてきたが、今回、従来報告されている7つの無作為比較試験のメタ解析結果が報告<sup>16)</sup>された。その結果、HIV陰性の小児と成人では、副腎皮質ステロイド薬併用群が未併用群より有意に転帰が良好であったことが明らかにされた。以上より、本症では重症度にかかわらずHIV非感染者の本症の場合、全例で重症度に拘わらず副腎皮質ステロイド薬の併用が推奨されると考える。

以上、中枢神経系感染症における病態と治療の動向は大きく変化しており、今後、日本におけるこれら疾患のガイドラインの改訂が望まれる。

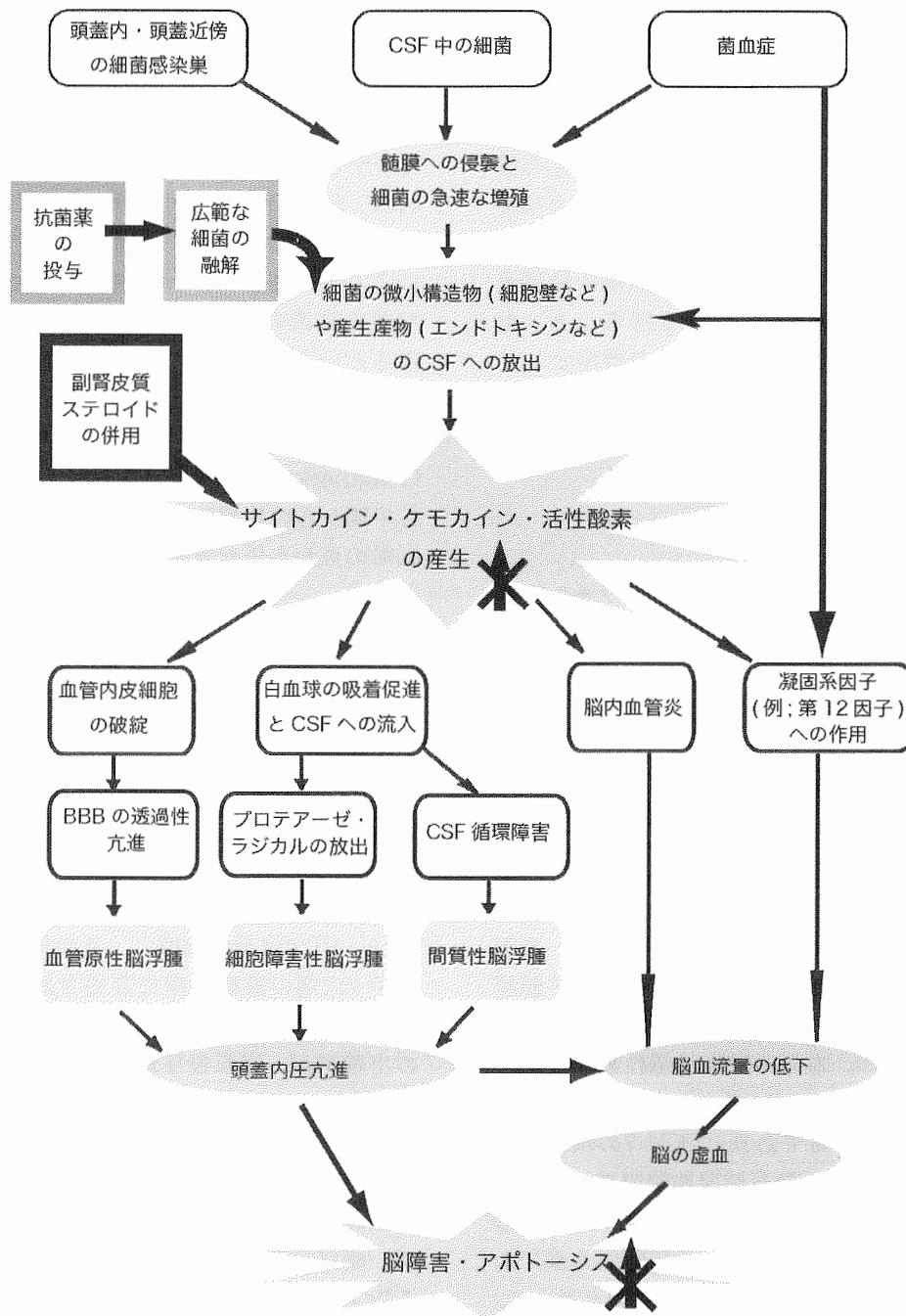


図5. 細菌性髄膜炎の病態

註: CSF=髄液、BBB=血液脳関門

病原菌が髄膜へ播種し急速な増殖をすると、細菌の細胞壁や膜関連産物(タイコ酸、ペプチドグリカン、エンドトキシンなど)が髄液内へ遊離する。抗菌薬の投与は、細菌壁に作用し急速な菌融解を呈するが、その際に壁産物の放出が増強される。これら産物は、腫瘍壞死因子(tumor necrosis factor: TNF)- $\alpha$ 、インターロイキン(interleukin: IL)-1 $\beta$ 、IL-6、血小板活性化因子(platelet activating factor: PAF)、酸化窒素、プロスタグランデインなど炎症性サイトカイン・ケモカイン・活性酸素の産生を惹起する。これらの放出は、脳血管内皮細胞の破綻や白血球の吸着促進受容体を活性化させ、血液脳関門の透過性亢進による血管原性脳浮腫やプロテアーゼやラジカルの放出による細胞障害性脳浮腫を惹起する。さらに、蛋白濃度や細胞数の増加により、髄液の粘稠度は上昇し、髄液循環障害を起こし間質性脳浮腫が出現する。以上より脳浮腫は増強し、頭蓋内圧亢進を呈する。頭蓋内圧亢進は、髄液循環障害の増強、脳内の虚血の増悪、脳の代謝および脳血流の変化をきたし、脳障害やアポトーシスが進行する。一方、末梢血管拡張作用のあるメディエーターを介した炎症亢進による血管炎の併発からも脳内の虚血をもたらす。抗菌薬と副腎皮質ステロイド薬を併用すると、TNF- $\alpha$ やIL-1 $\beta$ のmRNA転写およびプロスタグランデインやPAFの産生を抑制し、脳浮腫を軽減し酸化窒素の産生がおさえられ、結果として脳障害が軽減される。

## 文 献

1. Solomon T, Hart JI, Beeching NJ: Viral encephalitis: a clinician's guide. *Pract Neurol* 7: 288-305, 2007.
2. Tunkel AR, Glaser CA, Bloch KC, et al: The management of encephalitis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 47: 303-27, 2008.
3. 日本神経感染症学会: ヘルペス脳炎のガイドライン. *Neuroinfection* 10:78-87, 2005.
4. Cinque P, Cleator GM, Weber T et al: The role of laboratory investigation in the diagnosis and management of patients with suspected herpes simplex encephalitis: a consensus report. The EU Concerted Action on Virus Meningitis and Encephalitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 61:339-45, 1996.
5. Linde A, Klapper PE, Monteyne P et al: Specific diagnostic methods for herpesvirus infections of the central nervous system: a consensus review by the European Union Concerted Action on Virus Meningitis and Encephalitis. *Clin Diagn Virol* 8:83-104, 1997.
6. Kamei S, Takasu T, Morishima T, et al: Serial changes of intrathecal viral loads evaluated by chemiluminescence assay and nested PCR with aciclovir treatment in herpes simplex virus encephalitis. *Intern Med* 43: 796-801, 2004.
7. Taira N, Kamei S, Morita A, et al: Predictors of prolonged clinical course in adult patients with herpes simplex virus encephalitis. *Intern Med* 48: 89-94, 2009.
8. Kamei S, Sekizawa T, Shiota H et al: Evaluation of combination therapy using both aciclovir and corticosteroid in adult patients with herpes simplex encephalitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76, 1544-1549, 2005.
9. Martinez-Torres F, Menon S, Pritsch M, et al: Protocol for German trial of Acyclovir and corticosteroids in Herpes-simplex-virus-encephalitis (GACHE): a multicenter, multinational, randomized, double-blind, placebo-controlled German, Austrian and Dutch trial [ISRCTN45122933]. *BMC Neurol* 8: 40, 2008
10. Kamei S, Taira N, Ishihara M et al: Prognostic value of cerebrospinal fluid cytokine changes in herpes simplex virus encephalitis. *Cytokine* 46: 187-193, 2009.
11. Hsu H E, Shutt KA, Moore MR, et al : Effect of Pneumococcal Conjugate Vaccine on Pneumococcal Meningitis. *N Engl J Med* 360: 244-256, 2009.
12. Ubukata K, Chiba N, Hasegawa K, et al : Antibiotic susceptibility in relation to penicillin-binding protein genes and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* strains responsible for meningitis in Japan, 1999 to 2002. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 1488-1494, 2004
13. van de Beek D, de Gans J, Spanjaard L, et al. Clinical features and prognostic factors in adults with bacterial meningitis. *N Engl J Med.* 351(18):1849-59, 2004.
14. Ishihara M, Kamei S, Taira N, et al: Hospital-based study of prognostic factors in adult patients with acute community-acquired bacterial meningitis in Tokyo, Japan. *Intern Med* 48: 295-300, 2009.
15. Thwaites G, Fisher M, Hemingway C, et al. British Infection Society guidelines for the diagnosis and treatment of tuberculosis of the central nervous system in adults and children. *J Infect* 59(3):167-87, 2009.
16. Prasad K, Singh MB. Corticosteroids for managing tuberculous meningitis. *Cochrane Database Syst Rev*. Jan 23(1):CD002244, 2008.

〈シンポジウム1〉 プリオニン病の疫学から治療まで

## プリオニン病のサーベイランスと疫学

坂井健二・山田正仁

**【要旨】**わが国における現行のCJDサーベイランスは1999年4月より開始された。2010年8月までに2005例の情報が収集され1552例がプリオニン病と判定された。孤発性CJD 1192例(76.8%)、遺伝性プリオニン病 271例(17.5%)、硬膜移植後CJD(dCJD) 83例(5.3%)、変異型CJD(vCJD) 1例(0.1%)、分類不能CJD 5例(0.3%)で、人口100万人対の罹患率は1.01人/年だった。遺伝性プリオニン病ではV180I変異が最も多く、dCJDは過去の調査で確認された症例を加えると141例となつた。vCJDは2005年に英国への滞在歴がある1例目が確認されたのみであった。

Key words: プリオニン病、クロイツフェルト・ヤコブ病、サーベイランス、プリオニン蛋白  
prion disease, Creutzfeldt-Jakob disease (CJD), surveillance, prion protein

### はじめに

プリオニン(proteinaceous infectious particles: prion)は“蛋白性の感染粒子”を意味し<sup>1)</sup>、異常プリオニン蛋白(prion protein: PrP)がその本体と考えられている。感染因子プリオニンが関与する疾患群はプリオニン病と総称され、人獣共通感染症であり、動物からヒトへの感染、ヒトの臓器や組織の移植、輸血による医原性感染などが世界的に問題になっている。プリオニン病の感染予防には感染源となるヒトや動物のプリオニン病の発生動向の把握が重要である。

プリオニン病に関するわが国における疫学的な情報として、特定疾患治療研究事業による臨床調査個人票のデータ、感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律(感染症法)によって行われている感染症発症動向のデータ、死亡診断書の死因を集計した人口動態統計などがある。しかし、これらの統計データではプリオニン病の診断は担当医の判断に任されており、プリオニン病の診断が正確になされていない場合がある。

英国における変異型Creutzfeldt-Jakob病(Variant CJD: vCJD)の発生を受け<sup>2)</sup>、1996年に厚生省「クロイツフェルト・ヤコブ病に関する緊急調査研究班」によって全国の疫学的調査が初めて実施された。その後、1997年から1999年3月にかけて厚生省

「クロイツフェルト・ヤコブ病およびその類縁疾患調査」が行われた。これらの調査はいずれもアンケートによる調査であり、プリオニン病についての現行のサーベイランスは1999年4月から開始された<sup>3),4)</sup>。わが国において現在行われているプリオニン病のサーベイランスとこれまでに得られた結果について概説する。

### 対象と方法

1999年より厚生労働省・難治性疾患克服研究事業「プリオニン病及び遅発性ウイルス感染症に関する調査研究班」に、神経内科医、精神科医、病理学者、疫学者などからなるCJDサーベイランス委員会が設置され、1999年4月より全例の実地調査、統一した診断基準を用いた診断とその病型分類、診断確実性の評価を行う、現在のサーベイランスが開始された。わが国を10地域に分割してそれぞれに担当サーベイランス委員を配置し、厚生労働省により依頼されている各都道府県のCJD担当専門医と協力してプリオニン病が疑われた全患者を調査している(図1)。プリオニン病が疑われる患者についての情報がCJDサーベイランス委員長に提供されると、CJDサーベイランス委員長から患者が居住または入院している地域担当サーベイランス委員に調査が依頼さ

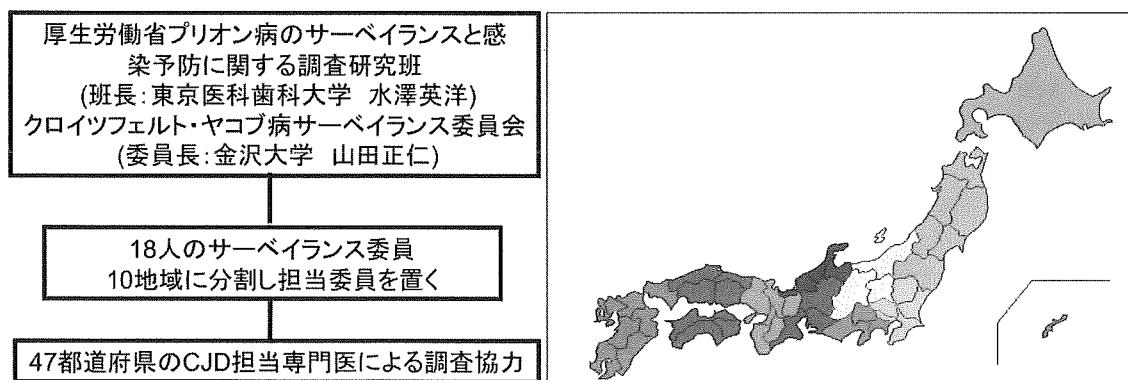


図1

図1 わが国におけるプリオント病サーベイランス体制 (2010年8月現在)

れ、都道府県のCJD担当専門医と協力して実地調査を行い、結果をCJDサーベイランス委員長に報告する。2010年からは「プリオント病のサーベイランスと感染予防に関する調査研究班」・CJDサーベイランス委員会となった。地域担当の委員以外に疫学者、神経病理医、脳脊髄液マーカーやPrP遺伝子検査担当者、神経放射線医、脳外科医(二次感染担当)も加わって調査と審議を行っている。

プリオント病が疑われる患者についての情報提供ルートには以下の4ルートがあり、匿名化が行われたうえで患者情報がCJDサーベイランス委員会に提供される。1. 特定疾患治療研究事業の臨床調査個人票による(特定疾患ルート)。患者によるプリオント病の特定疾患の申請および臨床調査個人票の情報の研究利用の同意が得られた場合、都道府県によりCJDサーベイランス委員会へ情報が提供される。2. 感染症法に基づく届け出による(感染症法ルート)。感染症法によりプリオント病は発生後に届け出が必要であり、サーベイランスの同意が得られた患者に関して、厚生労働省よりサーベイランス委員会に情報が提供される。3. プリオント蛋白遺伝子検査や脳脊髄液検査を行う際の患者情報の提供。4. 地域での患者情報の入手による。

患者またはその代諾者よりサーベイランスの同意が得られた場合、病院などを訪問して患者を直接診察し、画像や脳波などの検査データの確認を行って、サーベイランス調査票に結果を記入する。変異型CJDが疑われる場合などではサーベイランス委員長などによる緊急調査が実施されることがある。記入されたサーベイランス調査票はサーベイランス

委員会事務局へ集められ、1年に2回開催されるCJDサーベイランス委員会において個々の症例について診断と病型、その確実性などの評価を行い、登録が行われる。現在使用しているプリオント病の診断基準を示す(表1)。

## 結 果

1999年4月から2010年8月までにプリオント病疑いとして2005例の情報が収集され、CJDサーベイランス委員会にて判定が行われた。そのうち1552例がプリオント病と判定された。病型別の内訳を示す(図2)。孤発性CJD (sporadic CJD: sCJD) は1192例(76.8%)と最も多く、遺伝性プリオント病 (genetic prion disease) が271例(17.5%)、獲得性プリオント病 (environmentally acquired prion disease) が84例(5.4%)であった。獲得性プリオント病は83例(5.3%)が硬膜移植後CJD (dura mater graft-associated CJD: dCJD) であり、vCJDは1例(0.1%)であった。5例(0.3%)は分類不能のCJDと判定された。dCJDは過去の調査で判明した症例を合計すると141例となつた。

全プリオント病では年間120-160例程度が発症し(図3)、これまでの全体の罹患率は人口百万人対1年間で1.01人であった。また、プリオント病の剖検率はプリオント病全体において19.2%で、sCJD 15.9%、遺伝性プリオント病は27.1%、dCJD 43.8%であった。

sCJDの平均発症年齢は68.1歳、男女別の症例数は男性494例、女性698例だった。診断の確実性に

表1 CJDサーベイランス委員会で使用しているプリオント病の診断基準

孤発性CJD	
確実例 (definite)	特徴的な病理所見、またはウェスタンプロット法や免疫染色法で脳に異常プリオント蛋白を検出
ほぼ確実例 (probable)	A. 進行性認知症があり、次の4項目中2項目以上を満たし、脳波にて周期性同期性放電 (periodic synchronous discharge: PSD) を認める 1. ミオクローヌス、2. 錐体路/錐体外路症状、3. 視覚異常/小脳症状、4. 無動性無言 B. 疑い例に入る症例で、脳脊髄液14-3-3蛋白陽性で、臨床経過が2年未満
疑い例 (possible)	ほぼ確実例と同じ臨床症候を示すが、PSDを欠く
硬膜移植後CJD	硬膜移植歴があること、診断確実度に関しては孤発性CJDの診断基準に準拠する
変異型CJD	
WHOの診断基準に準拠する	
遺伝性プリオント病	
確実例 (definite)	プリオント蛋白遺伝子変異を認め、病理で異常プリオント蛋白が証明された症例
ほぼ確実例 (probable)	病理所見はないが、プリオント蛋白遺伝子変異を認め、臨床所見が遺伝性プリオント病として矛盾しない症例
疑い例 (possible)	遺伝性プリオント病を示唆する家族歴と遺伝性プリオント病として矛盾しない臨床所見がある症例

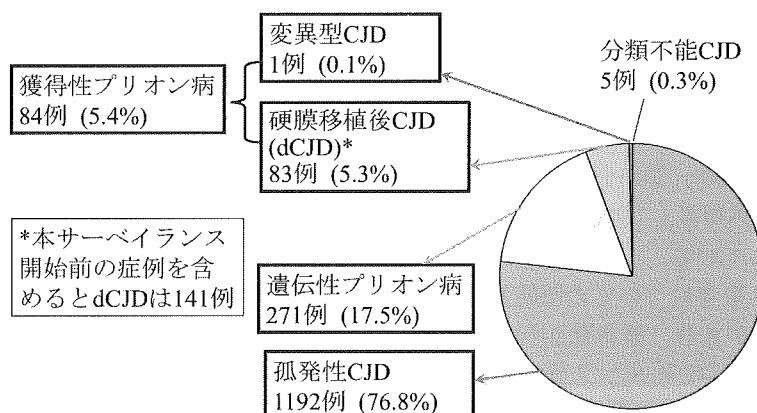


図2

図2 現行のCJDサーベイランスシステムによって同定されたプリオント病  
1552例の診断分類(1999年4月から2010年8月)

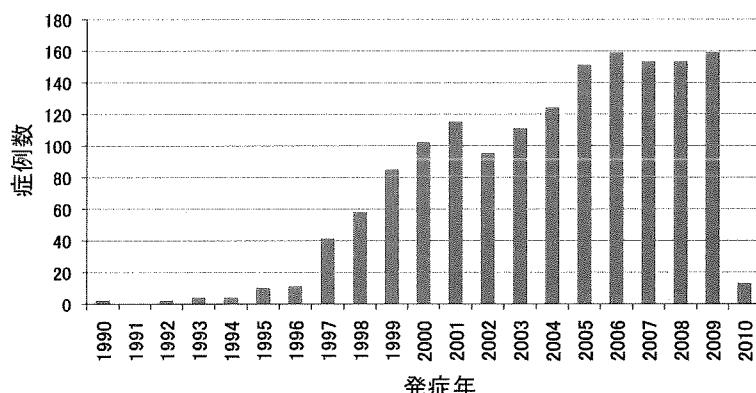


図3 現行のCJDサーベイランスシステムにより同定された全プリオント病の発症年ごとの症例数(1999年4月から2010年8月)

について、確実例は124例(10.4%)、ほぼ確実例が942例(79.0%)、疑い例が126例(10.6%)であった。sCJDの病像の多様性はPrP遺伝子コドン129の多型(メチオニン(M)とバリン(V)の2種類のアリル、MM, MV, VVの3種類の遺伝子型がある)と脳のプロテアーゼ抵抗性PrP(PrPres)のウェスタンプロットパターン(1型と2型に大別される)に関連し、両者による6型の分類(MM1, MM2, MV1, MV2, VV1, VV2)(Parchi分類)が報告されている<sup>5)</sup>。sCJDと判定された症例で遺伝子検査が行われたのは742例(62.2%)で、その内訳はMMが701例(94.5%)、MVが36例(4.9%)、VVが5例(0.7%)であった。ウェスタンプロットが行われているのは49例で、Parchi分類の内訳はMM1 31例、MM2 7

例、MM1+2 5例、MM2+1 1例、MV2 3例、VV2 2例で、MV1とVV1の症例はなかった。

これまで確認された遺伝性プリオント病の内訳を示す(図4)。CJD病型をとるV180I変異(118例、43.5%)、E200K変異(40例、14.8%)、M232R変異(40例、14.8%)とGerstmann-Sträussler-Sch einker病(GSS)の病型をとるP102L変異(51例、18.8%)で9割以上を占めた。家族性致死性不眠症(fatal familial insomnia: FFI)の病型をとるD178N-129M変異は4例(1.5%)のみであった。

dCJDはこれまでに141例が確認されている(表2)。硬膜移植が行われた時期は1983年から1987年が多く、1988年以降はほとんど見られなくなっている(図5)。硬膜移植から発症までの期間(潜伏期

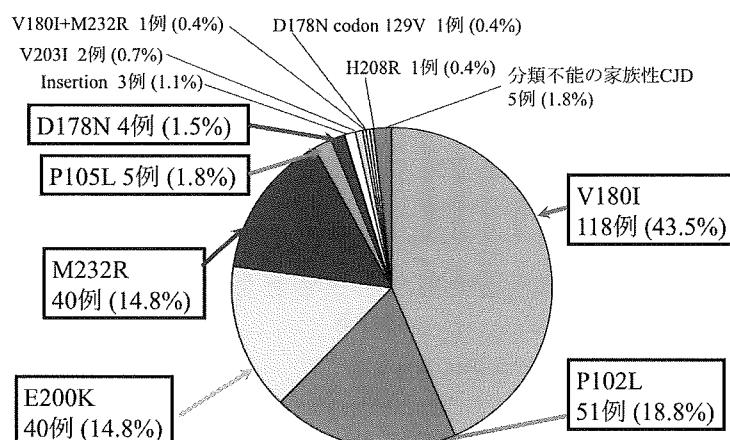


図4

図4 現行のCJDサーベイランスシステムによって同定された遺伝性プリオント病271例の変異別の頻度

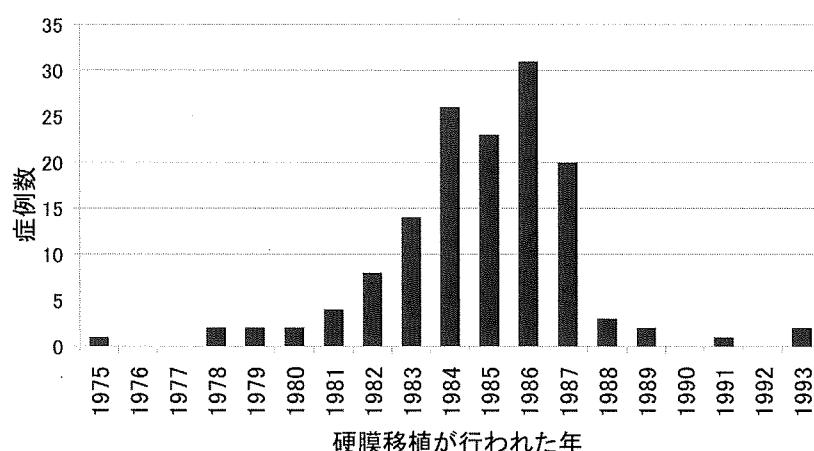


図5 硬膜移植後CJDにおける硬膜移植年数と患者発生数

表2 わが国における硬膜移植後CJD(2010年8月現在)

全症例数	141例
硬膜移植についての情報	
硬膜移植が行われた年	1975年-1993年
ブランド名	判明している全例がLyodura®
移植を受けた年齢	1-70歳(平均43.1歳)
原因疾患	脳腫瘍62例、脳出血31例、顔面痙攣19例など
CJDの発症	
発症年の分布	1985年-2009年
移植後から発症までの年数	1-30年(平均12.0年)
発症年齢	15-81歳(平均55.7歳)

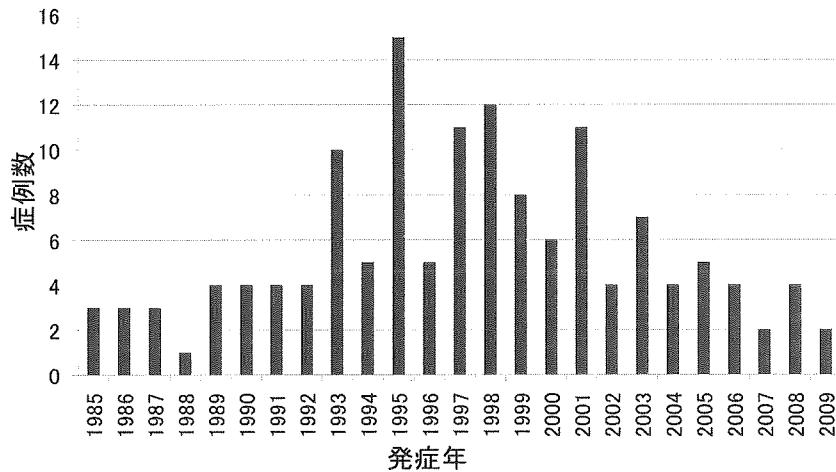


図6 硬膜移植後CJDの年ごとの患者発生数

間)は16ヶ月から30年であり、平均は12.0年であった(表2)。患者発症年の分布では近年減少傾向がみられるが、発生が持続している(図6)。dCJDの臨床病理学的な特徴は、古典型のsCJDと区別できない非plaques型と緩徐進行性で脳波検査において周期性同期性放電(periodic synchronous discharge: PSD)がなく、神経病理学的にplaquesの形成が認められるplaques型に分けられ、約2/3は非plaques型で、残りの約1/3がplaques型である<sup>6),7)</sup>。

わが国におけるvCJDは英国滞在歴のある48歳の男性例が2005年に確認されたのみであり<sup>8),9)</sup>、その後は確認されていない。

### 考 察

1996年に英国において初めてvCJDの発生が確認されてから、わが国を含めた各国において様々なCJDサーベイランスシステムが構築され、その結果が報告されている<sup>4)</sup>。わが国におけるプリオント病の

特徴としては以下のものがあげられる。すなわち、コドン129多型では約95%がMMであること、遺伝性プリオント病の変異の分布が西欧諸国と比較して著しく異なること、dCJDの発生が多いこと、vCJDは英國滞在歴のある1例しか確認されていないこと、そしてプリオント病全体の剖検率が低いことである。

わが国ではsCJDが約77%を占めるが、このうち遺伝子検査が行われてPrP遺伝子に変異のないことが確認された症例は62.2%であり、浸透率の低い家族性CJDの症例が含まれている可能性は否定できない。正確なサーベイランスのためには、遺伝子検索を行う率を上げる努力が必要である。遺伝子検査が行われた症例では、sCJDにおけるコドン129多型はMMが約95%を占めている。アジア各国からの報告も同様であるが<sup>10),11)</sup>、西欧諸国やオーストリア、カナダからの報告では67.2%とされており<sup>12)</sup>、アジアの結果と大きく異なっている。Parchi分類では典型的なCJDの病型を示すMM1およびMV1

以外は非典型的な経過や検査結果を示すとされている<sup>5)</sup>。わが国のサーベイランスでは剖検まで行われてウェスタンプロット解析が行われ、Parchi分類まで検討された症例は少ないが、わが国における非典型例はMM2型が多い。MM2型は病理学的に皮質型と視床型に分けられ<sup>5)</sup>、CJDの臨床診断基準を満たさない場合があり診断に注意が必要である<sup>13)</sup>。特に、視床型では脳血流SPECTやFDG-PETにて視床に限局する血流低下や代謝低下以外の異常所見が見られないため臨床診断が極めて困難である<sup>13)</sup>。プリオント病の確定診断は現時点においても病理学的診断に頼らざるを得ないのが現状であり、正確なサーベイランスには剖検率の向上が欠かせない。

遺伝性プリオント病における変異の部位別頻度はわが国と欧米諸国で大きく異なっている。わが国ではCJDの病型をとるV180I変異、E200K変異、M232R変異、GSSの病型をとるP102L変異が多い<sup>3),4)</sup>、西欧諸国ではE200K変異、FFIの病型となるD178N変異、CJD病型のV210I変異や8アミノ酸反復配列部への挿入変異が多い<sup>14)</sup>。わが国で多いV180I変異の報告は西欧諸国で少なく、M232R変異の報告はわが国以外ではポーランド、中国、韓国からの3家系の報告しかない<sup>4)</sup>。逆に、わが国ではFFIの症例は少なく、西欧諸国に多いV210I変異が確認された症例はわが国にはない。中国や韓国における変異別の頻度もわが国と異なっている可能性が報告されており<sup>4)</sup>、プリオント病発症における人種差などの影響を考える上で興味深い。なお、わが国で多いV180I変異やM232R変異のほとんどは家族歴がなく<sup>4)</sup>、正確な診断のためには遺伝子検査が必須である。

dCJDは1988年に最初の症例が報告され<sup>15)</sup>、これまでに全世界で200例以上が報告されているが、半分以上はわが国からの報告が占めている<sup>7)</sup>。その発症数は年々減少傾向にあるが、近年においても年間数例の発生が確認されている(図6)。約2/3は古典型CJDの病像を示す典型例(非plaques型)であるが、約1/3は非典型的な経過をとり(plaques型)<sup>6)</sup>、非典型例の臨床診断に注意が必要である。dCJDの診断には手術歴の有無や過去の手術においてヒト屍体由来乾燥硬膜が使用されたかどうかの確認が重要であるが、移植から発症までの潜伏期間の平均は12.0年で、最長の症例は30年であり(表2)、過去に行われた手術記録が廃棄されている場合が多く、サーベイランスにおいてdCJDかどうかの判定が困難な症例が多い。手術記録で確認ができない場合には剖検時に移植された硬膜の有無を確認する必要がある。わ

が国におけるdCJDの剖検率は43.8%と他の病型よりも高いが、正確な診断を行うためにはやはり剖検率の向上が必要である。また、dCJDは医原性感染症であり、CJDサーベイランス委員会では厚生労働省の指示により、dCJDであることが判明した場合には、dCJDであるということを患者本人またはその家族に対して、患者支援情報とともに伝えるように主治医に対して依頼し、主治医から患者(家族)に伝えたことを確認する連絡をいただいている。

現行のサーベイランスシステムは全例において実地調査を原則的に行うという画期的なシステムであるが、精度の高いサーベイランスを行うためには遺伝子検査が行われた率や剖検率が低いといった点についての改善が必要である。幸いにしてわが国ではこれまでにvCJDの発生は1例しか確認されていないが、わが国におけるプリオント病の特徴を明らかにし、感染予防や病態を明らかにするためには、高精度のサーベイランスを長期間にわたって継続する努力が必要である。

## 謝 辞

サーベイランスデータの収集と管理を担当されてきましたCJDサーベイランス委員会事務局担当の金沢大学神経内科・浜口毅先生、篠原もえ子先生、野崎一朗先生、事務局担当秘書の澤田和子さんに深謝します。また、症例の情報収集やCJDサーベイランス委員会での判定にご協力いただきましたCJDサーベイランス委員の先生、実地調査にご協力いただいている全国のCJD担当専門医の先生に深謝いたします。

## 文 献

- Bolton DC, McKinley MP, Prusiner SB: Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* 218: 1309-1311, 1982.
- Will RG, Ironside JW, Zeidler M, et al: A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 347: 921-925, 1996.
- 三條伸夫, 水澤英洋: プリオント病—本邦の特徴と診断のポイント—. *臨床神経* 50: 287-300, 2010.
- Nozaki I, Hamaguchi T, Sanjo N, et al: Prospective 10-year surveillance of human

- prion diseases in Japan. *Brain* 133: 3042-3057, 2010.
5. Parchi P, Giese A, Capellari S, et al: Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann Neurol* 46: 224-233, 1999.
  6. Noguchi-Shinohara M, Hamaguchi T, Kitamoto T, et al: Clinical features and diagnosis of dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 69: 360-367, 2007.
  7. Yamada M, Noguchi-Shinohara M, Hamaguchi T, et al: Dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease in Japan: Clinicopathological and molecular characterization of the two distinct subtypes. *Neuropathology* 29: 609-618, 2009.
  8. Yamada M, on behalf of the Variant CJD Working Group, Creutzfeldt-Jakob Disease Surveillance Committee, Japan: The first Japanese case of variant Creutzfeldt-Jakob disease showing periodic electroencephalogram. *Lancet* 367: 874, 2006.
  9. Shinde A, Kunieda T, Kinoshita Y, et al: The first Japanese patient with variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD). *Neuropathology* 29: 713-719, 2009.
  10. Jeong BH, Lee KH, Kim NH, et al: Association of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease with homozygous genotypes at PRNP codons 129 and 219 in the Korean population. *Neurogenetics* 6: 229-232, 2005.
  11. Shi Q, Gao C, Zhou W, et al: Surveillance for Creutzfeldt-Jakob disease in China from 2006 to 2007. *BMC Public Health* 8: 360, 2008.
  12. Ladogana A, Puopolo M, Croes EA, et al: Mortality from Creutzfeldt-Jakob disease and related disorders in Europe, Australia, and Canada. *Neurology* 64: 1586-1591, 2005.
  13. Hamaguchi T, Kitamoto T, Sato T, et al: Clinical diagnosis of MM2-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 64: 643-648, 2005.
  14. Kovács GG, Puopolo M, Ladogana A, et al: Genetic prion disease: the EUROCDJ experience. *Hum Genet* 118: 166-174, 2005.
  15. Thadani V, Pernar PL, Partington J, et al: Creutzfeldt-Jakob disease probably acquired from a cadaveric dural mater graft. *J Neurosurg* 1988;69:766-769.

〈シンポジウム1〉 プリオント病の疫学から治療まで

## 発症機序：異常化プリオントモデルの検討

齊藤美保子

**【要旨】** プリオント説を支持する実験事実は蓄積されたが、感染能の本質である異常型PrP<sup>SC</sup>構造については、いまだ電顕像以上の分解能の情報は得られていない。X線回析等の間接的な構造情報の組合せから、いくつかのPrP<sup>SC</sup>モデルが提案されたが、モデル構築方法や根拠とする実験事実の相違から、モデル間の統一的な比較は困難であった。本研究では、モデル構造の3Dプロファイルと網羅的アミノ酸点変異体の異常型転換実験データの相関により、既存の5種類のPrP<sup>SC</sup>モデル構造を比較し、Bonvinらのモデルが実験結果と比較的よく対応する事を見出した。

Key words: PrP<sup>SC</sup>構造、 $\beta$ ヘリックス、蛋白質構造モデリング、3D1dプロファイル法

### はじめに

プリオント説は、プリオント蛋白質が正常型構造(PrP<sup>C</sup>)から異常型構造(PrP<sup>SC</sup>)に転換され、纖維状構造をとることで細胞毒性を持つ事を予想する。<sup>1)</sup>この説は近年浸透したが、構造転換メカニズムやPrP<sup>SC</sup>立体構造は未だ推測の域をでない。これは、多くの実験事実が報告されているにも関わらず、実験条件の違いやPrP<sup>SC</sup>構造の多型性もあって、コンセンサスが形成されない事による。現在のコンセンサスは、構造転換によって2次構造含量が変化し $\beta$ シートが増加する事、<sup>2)</sup>およびPrP<sup>SC</sup>纖維は4.8A間隔で纖維伸長方向に積み上がる $\beta$ ストランドからなる事<sup>3)</sup>の2点程度に過ぎない。

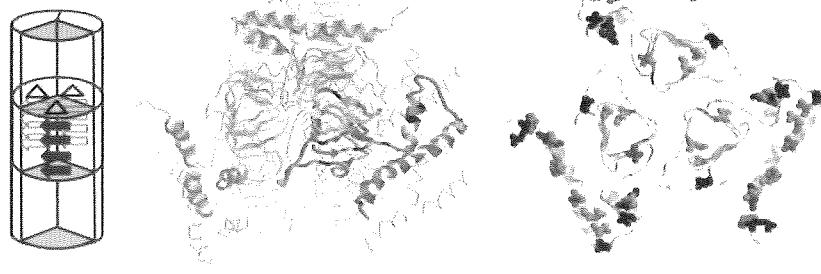
PrP<sup>SC</sup>構造モデルが得られれば、既存の実験データを統合し、感染プロセスの解明につながることが期待される。2002年に発表された纖維断面の電顕像<sup>4)</sup>に基づく構造モデルをきっかけに、PrP<sup>SC</sup>構造モデルが複数の研究グループから提唱された。2004年Prusinerらは、 $\beta$ コアを持つ既知蛋白質構造とPrP配列との適合性をスレディング法により検討し、1辺6残基の三角形 $\beta$ シートである $\beta$ H( $\beta$ ヘリックス)とPrP[残基番号89-176]の類似性を示した。<sup>5)</sup>さらにPrP[143-170]欠損変異体の電顕像、糖鎖修飾の情報を総合して、4巻きの $\beta$ HとC末端 $\alpha$ 2- $\alpha$ 3束からなるモデル(以下、Prモデルと呼ぶ)を提

案した(図1)。2006年、Bonvinらは同じく $\beta$ Hフォールドに対する配列比較と分子動力学(MD)計算による構造安定性の情報から、PrP[104-143]が2巻きの $\beta$ Hをとるモデル(Boモデル)を示した。<sup>6)</sup>DaggettらはMD計算により、ストランド $\beta$ 1と $\beta$ 2の伸展と、新たに生じる $\beta$ ストランドによりバレル状の $\beta$ シート構造を予測した(Daモデル)。<sup>7)</sup>これら3モデルでは構造転換はPrP<sup>C</sup>のN端側のみで、C末端の $\alpha$ 2- $\alpha$ 3は転換後の纖維構造において維持される。

しかし、2006年Tattumらが発表したヒトPrP<sup>SC</sup>纖維の電顕3次元再構築像では、2002年の2次元電顕像と全く異なるはしご状の纖維構造が見られた。<sup>8)</sup>これに基づき2006年、SinghらはPrPのC末端側[89-143]とN末端側[154-227]が双方 $\beta$ H構造をとり、それらの間がリンカーで結ばれたSiモデルを、<sup>9)</sup>2007年Surewiczeらは、PrP[160-220]の電子スピントン共鳴測定による残基間距離情報から、アミロイド纖維に見られるin-register stackingタイプのSuモデルを提唱した(図1)。これらのモデルでは $\alpha$ 2- $\alpha$ 3も $\beta$ シート構造に変化する。<sup>10)</sup>

これらのPrP<sup>SC</sup>モデルは、お互いにかなり異なる立体構造を想定している。また、それぞれ蓄積された実験事実に部分的に対応するものの、多数存在する既知データの矛盾の無い統合には至っていない。これらのモデルを総合的に相互比較した研究はなく、

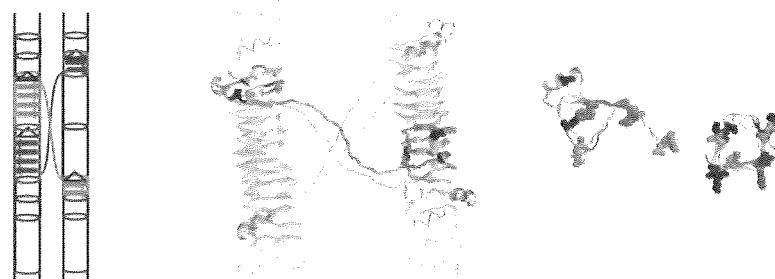
Prusiner model



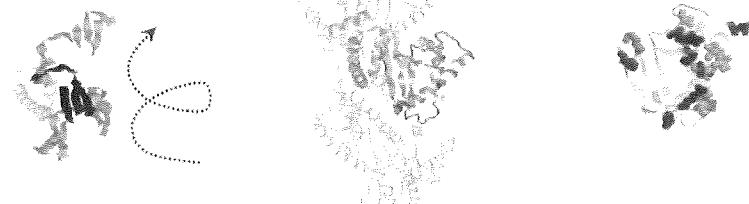
Bonvin model



Singh model



Daggett model



Surewicz model

図1 PrP<sup>SC</sup>モデル

これまでに提唱された5つのPrP<sup>SC</sup>モデルを示した。(左図)各モデルで転換後生じる纖維構造及を模式的に表した。濃く示した部分がPrP<sup>SC</sup> 1分子に相当する。(中央図)転換後の纖維構造中のPrP<sup>SC</sup> モデル。纖維の基本単位をリボンモデルで示した。(左図)中央図の纖維構造から1分子を取り出し、有意な相関スコア(<-0.4)を示したアミノ酸を空間充填モデルで示した。アミノ酸サイトは図右下に示した相関スコア(1 ~ -1)スケールに従って濃淡を付けて示した。

現在 $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ 立体構造モデルは大きな混乱状態にあると言える。

東北大学の北本らの研究グループは、 $\text{PrP}$ ほぼ全長における網羅的点突然変異実験を行い、それらの $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ 転換効率の変化を測定した（未発表データ）。これは、同一条件下で測定され、各モデルに統一的に適用できる初めての大規模データセットである。そこで本研究ではバイオインフォマティクスの手法を用い、網羅的点突然変異実験がいずれの $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ モデルに最も適合するか調査した。既存の5つの $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ モデル構造を構築し、3D1dプロファイル法により各アミノ酸サイトごとに構造安定性と転換効率との相関を調べ、モデル全長にわたって転換実験との適合性を評価した。

## 対象・方法

### $\text{PrP}$ 変異体と $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ 転換効率測定

アミノ酸点変異株の転換効率は、東北大学の北本らにより酵母N2a細胞 $\text{PrP}$ 変異体発現系を用いて測定されたものを用いた（未発表データ）。これは $\text{PrP}^{27-30}$  [102-231] の各野生型アミノ酸を、それ

以外の19アミノ酸にすべて置換し、転換効率の変化を野生株での $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ 収量に対する変異株での同収量の割合とした値（ $\Delta T$ ）である。

### $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ 構造モデリング

5種類の $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ 構造座標は、文献の記述をもとに独自に構造モデリングしたものを使用した（図1）。モデリングには分子計算ソフトMOEを、エネルギー極小化にはAmber98を使用した。手動によるモデリングにはCootを用いた。 $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ 構造モデルの座標はPDB verify 3Dにより化学構造の妥当性を確認した。また、文献から分子間相互作用についての十分な情報が得られないモデルについては、Patch Dockによりドッキングシミュレーションを行い、もっとも安定な会面を採用した。

### 3D1dプロファイル法

3D1dプロファイル法とは、既知構造情報から抽出した、20種類のアミノ酸の構造環境への傾向値を利用して、蛋白質フォールドとアミノ酸配列の間の適合度を評価する手法である（図2）。まず、蛋白質立体構造における残基間相互作用を、数個の環境パラ

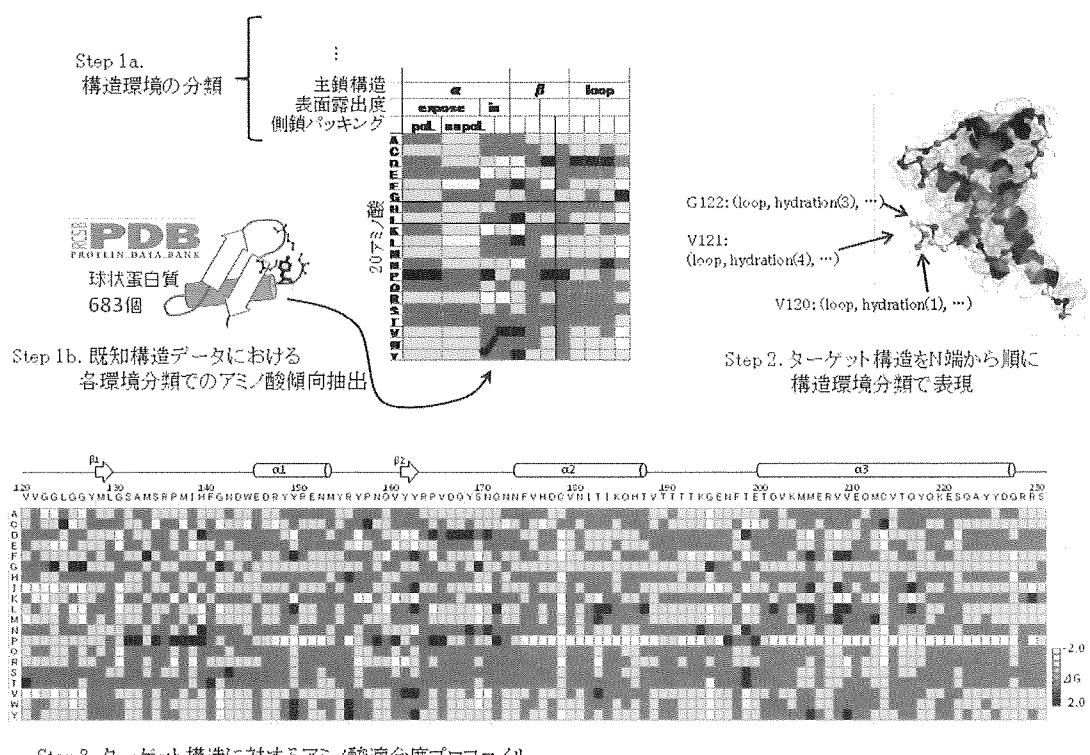


図2 3D1dプロファイル法の概要

3D1dプロファイル法は残基環境とアミノ酸の適合度を経験的に評価する手法である。下段に例として挙げた3Dプロファイルは $\text{PrP}^{\text{C}}$ のものであり、横軸が残基番号、縦軸がアミノ酸を示し、濃色であるほどアミノ酸が $\text{PrP}^{\text{C}}$ の該当するサイトに適合していることを示す。

メータ(分子内部に埋もれている、2次構造を形成しているなど)の組合せで分類する(図2のStep 1a)。既知構造データセットから、各構造環境分類における20アミノ酸の出現頻度を求め、各環境におけるアミノ酸傾向値を数値化する(図2のStep 1b)。任意の蛋白質のアミノ酸の構造環境から、各アミノ酸サイトに対するアミノ酸の適合度を $20 \times N$ (Nは比較する蛋白質の残基数)のスコア行列で記述する(図2のStep 2,3)。このスコア行列(3Dプロファイル)を用いて、立体構造(3D)と、構造未知のアミノ酸配列(1d)の適合度を算出することで構造予測を行う。本来この方法は、アミノ酸配列からのフォールド予測法として開発されたが、リゾチーム点変異体と温度変性測定値との比較により、3D1dプロファイル法により見積もられた適合度と温度安定性の間に有意な相関が確かめられており、点変異と構造安定性の相関解析に用いることが可能である。<sup>11)</sup>

本研究では太田らにより開発されたプログラム<sup>11)</sup>を使用し、各PrP<sup>sc</sup>[120-230]構造の3Dプロファ

イルを作成した。各アミノ酸サイトにおける点変異体3D1dスコアと野生型3D1dスコアの差を疑似構造安定化工エネルギーとみなし、点変異による構造安定性の変化を $\Delta G = \{\text{変異体}3D1d\text{スコア}\} - \{\text{野生型}3D1d\text{スコア}\}$ と定義した。 $\Delta G < 0$ は変異によりPrP<sup>sc</sup>が安定化されることを示す(図3)。

#### 相関スコア

点変異による構造安定性の変化量( $\Delta G$ )と転換効率の変化( $\Delta T$ )の相関を評価するために、アミノ酸サイトごとに以下の処理を行った。まず、ノイズ軽減のため置換後の転換効率が0.20以下となった置換体データを除外したのち、1アミノ酸サイトにつき点変異のサンプル数が4以上となった76アミノ酸サイトを解析対象とした。i番目のサイトにおいて、n個のデータ( $n \leq 20$ )から算出される $\Delta G$ と $\log \Delta T$ から求められる相関係数を $r_i$ とし、 $r_i$ とその $-\log P$ 値の積( $rPi = -\log P \times r_i$ )を相関スコアとした。 $rPi < 0$ はそのサイトの変異実験結果が該当するPrP<sup>sc</sup>モデルを支持することを示す(図3)

#### 結果と考察

5つの既存PrP<sup>sc</sup>モデルを構築し、構造座標から3Dプロファイルをそれぞれ作成し、3Dプロファイルが予測する構造安定効果と転換促進の間の相関を調べた。転換後の纖維構造において、構造安定化( $\Delta G < 0$ )をもたらすと3Dプロファイルが予測したアミノ酸変異で、転換の促進( $\Delta T > 0$ )が見られた場合、その変異は該当するモデルを支持すると考えられる(図3)。すなわち、負の相関スコアを示すアミノ酸サイトの占める割合が最も多いモデルが、一番良く転換実験の結果を説明できるモデルである。

プリオン説では、PrP<sup>sc</sup>において増加した $\beta$ 構造が、分子間で $\beta$ シートを形成し纖維状構造をとるとされている。これはX線回折で確認されている4.8Å間隔で纖維伸長方向に積み上がる規則構造(= $\beta$ シート)という知見と一致する。そのため提唱されたモデルはすべて分子間 $\beta$ シートを中心構造( $\beta$ コア領域)として持っている(表1)。そこで、各モデルにおける $\beta$ コア領域の相関スコアを主に調査した。

Pr、Bo、Siモデルは、 $\beta$ シートが左まきらせん状に巻きながら積み上がる左旋回 $\beta$ H( $\beta$ ヘリカル)コアを持つが、それぞれ $\beta$ Hの巻き数などの詳細は異なるモデルである(図1)。Prモデルでは、4段の $\beta$ Hが積み重なって纖維を形成し、その纖維が3本寄合された複合体をとる。モデルに含まれる全

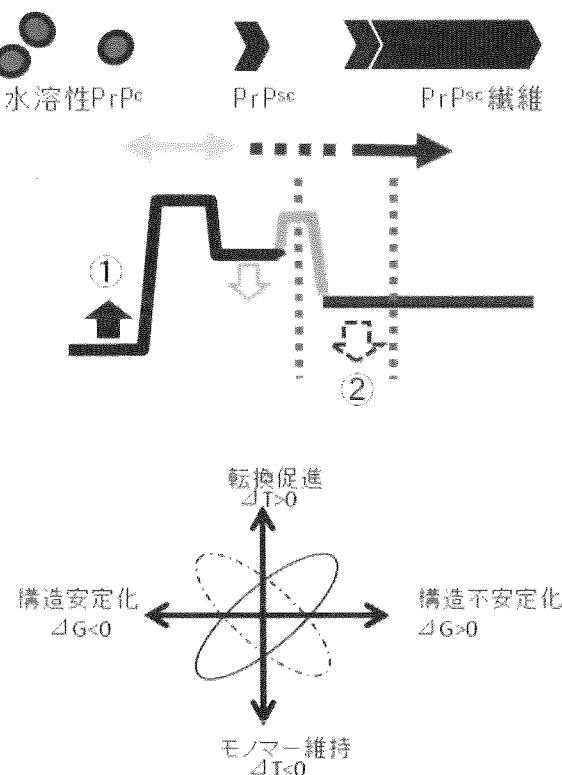


図3 3DプロファイルとPrP<sup>sc</sup>転換効率  
(上段) PrP<sup>c</sup>はPrP<sup>sc</sup>に構造変化し纖維化すると考えられる。(下段)アミノ酸置換がPrP<sup>sc</sup>を安定化し、その結果転換効率が促進される場合(図中点線の楕円)は、評価に用いたPrP<sup>sc</sup>が妥当であることを指示する。相関が逆である場合(図中実線の楕円)はモデルを指示しない。

94残基の内、3Dプロファイルと転換効率が適合すると判断された残基は18%であったが、 $\beta$ H領域では8.8%に過ぎず、構造変化しないとされるC末端側 $\alpha$ 2- $\alpha$ 3ヘリックス領域(図2下参照)でも多く適合していた(表2)。

Boモデルは2巻きの $\beta$ Hが積み重なって纖維を形成し、その纖維が3本寄合わされた複合体をとり、全長の20.7%が適合していた(表2)。BoモデルはPrモデル同様に、 $\alpha$ 2- $\alpha$ 3ヘリックス領域の構造は変化しないとされているが、この部分の具体的な立体配置が特定されていないので、上記の値には反映されていない。

Siモデルでは、N、C末端が独立に3、4巻きの $\beta$ Hを形成し、それらがはしご状の纖維を形成すると言われる(図1)。適合度は全長で18.9%であり、C末端側が比較的良好く適合していた(図4)。

Daモデルは、ほぼPrP<sup>c</sup>の構造を維持したまま纖維化するモデルであり、転換前から存在する $\beta$ シート( $\beta$ 1- $\beta$ 2)が伸長し、新たに形成される $\beta$ スト

ラントがパレル様の構造をとりながら纖維化する。このモデルの適合度は全長で19.5%であったが、Prモデルと同様に、構造変化しないとされる $\alpha$ 2- $\alpha$ 3ヘリックス領域でより多く適合残基が認められた(表2)。

Suモデルは、PrP<sup>c</sup>の全体が大きく構造変化しin register stacking(1分子が1ストランドとなり積み重なることで $\beta$ シート=纖維が形成される)を想定する。このモデルでは適合残基は全体の11.9%に過ぎなかった。

この結果から、既存の5つのPrP<sup>sc</sup>モデルは、網羅的変異実験と全長において際立った適合性を示すことはなかった。しかし、部分的構造に着目するといくつかの傾向が認められた。第一の傾向は、Pr、DaモデルなどのC末端 $\alpha$ 2- $\alpha$ 3ヘリックスが構造変化しないモデルでは、比較的C末端側の適合度が高いことである(表2、図4)。この事は、PrP<sup>sc</sup>転換では $\alpha$ 2- $\alpha$ 3の構造が維持される事を示唆する。

第二の傾向は、 $\beta$ コア領域に限定して見ると、2

表1 PrP<sup>sc</sup>モデルの $\beta$ コア領域

モデル	モデル全長残基	$\beta$ コア(シート)形成範囲	PrP <sup>sc</sup> $\beta$ コアの形状	文献
Prusiner	89-231	89-176	$\beta$ ヘリカル4巻き	5)
Daggett	109-231	115-118, 128-131, 134-139, 159-163	パレル状 $\beta$ シート	6)
Bonvin	104-141	104-141	$\beta$ ヘリカル2巻き	7)
Surewicz	158-219	158-219	In-register 1段	10)
Singh	89-227	89-143, 165-227	$\beta$ ヘリカル3/4巻き	9)

表2 PrP<sup>sc</sup>モデルの3D1dプロファイル法による評価

モデル	全長		$\beta$ コア領域	
	対象残基数	適合残基(%)	対象残基数	適合残基(%)
Prusiner	94	18.1	34	8.8
Bonvin	29	20.7	29	20.7
Daggett	87	19.5	15	6.7
Surewicz	42	11.9	42	11.9
Singh	90	18.9	68	16.2

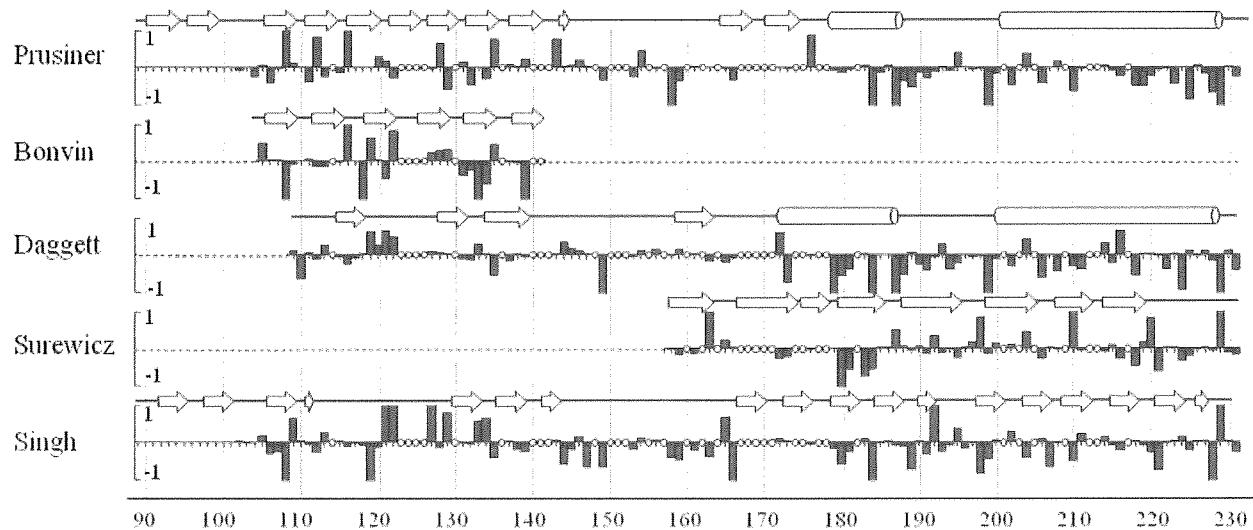


図4 PrP<sup>sc</sup>モデルから求めた3D1dプロファイル相関スコアの分布  
各モデルの相関スコアをサイト毎に棒グラフで示した。2次構造をグラフの上に模式図で示した。

～3巻き $\beta$ Hを持つBo(20.7%)、Si(16.2%)モデルが比較的に適合が良いことである。特にBoモデルにおいては、 $\beta$ H構造を安定化するために重要な疎水性コアや分子界面に位置する残基で良い適合を示した(図1)。この事から、Boモデル様の $\beta$ H構造に、適切に $\alpha$ 2 $\alpha$ 3ヘリックスを配置することができれば、より網羅的変異実験の結果をうまく説明できると期待できる。

以上の様に、結論として異常型プリオントンPrP<sup>sc</sup>において膨大に蓄積された実験データをすべて説明できる構造モデルは未だ存在しない。今後は、網羅的変異実験の結果を利用し、既知のモデルを改良してゆく必要がある。

## 文 献

- 1) Prusiner SB: Prions. Proc Natl Acad Sci U S A. 95: 13363-13383 1998.
- 2) Ostapchenko VG, Eisenberg D, Baskakov IV, et al: Two amyloid States of the prion protein display significantly different folding patterns. J Mol Biol. 400: 908-921, 2010.
- 3) Nguyen JT, Prusiner SB, Kirschner DA, et al: X-ray diffraction of scrapie prion rods and PrP peptides. J Mol Biol. 252: 412-422, 1995.
- 4) Wille H, Cohen FE, Prusiner SB, et al: Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallography. Proc Natl Acad Sci U S A. 99: 3563-3568, 2002.
- 5) Govaerts C, Prusiner SB, Cohen FE, et al: Evidence for assembly of prions with left-handed beta-helices into trimers. Proc Natl Acad Sci U S A. 101: 8342-8347, 2004.
- 6) Langedijk JP, Fuentes G, Bonvin AM, et al: Two-rung model of a left-handed beta-helix for prions explains species barrier and strain variation in transmissible spongiform encephalopathies. J Mol Biol. 360: 907-920, 2006.
- 7) DeMarco ML, Daggett V: From conversion to aggregation: protofibril formation of the prion protein. Proc Natl Acad Sci U S A. 101: 2293-2298, 2004.
- 8) Tattum MH, Cohen-Krausz S, Saibil HR, et al: Elongated oligomers assemble into mammalian PrP amyloid fibrils. J Mol Biol. 357: 975-985, 2006.
- 9) Kunes KC, Clark SC, Singh RR, et al: Left handed beta helix models for mammalian prion fibrils. Prion. 2: 81-90, 2008.
- 10) Cobb NJ, Sönnichsen FD, Surewicz WK, et al: Molecular architecture of human prion protein amyloid: a parallel, in-register

- beta-structure. Proc Natl Acad Sci U S A.  
104:18946-18951, 2007.
- 11) Ota M, Isogai Y, Nishikawa K, et al:  
Knowledge-based potential defined for  
a rotamer library to design protein  
sequences. Protein Eng. 14: 557-564,  
2001.
- 12) Choi JH, Govaerts C, Cohen FE, et al:  
Analysis of the sequence and structural  
features of the left-handed beta-helical  
fold. Proteins. 73: 150-160, 2008.

〈シンポジウム1〉 プリオニン病の疫学から治療まで

## Real-time QUIC法による髄液中異常プリオニン蛋白の測定

新竜一郎<sup>1)</sup> 佐藤克也<sup>1)</sup> 佐野和憲<sup>1)</sup> 布施隆行<sup>1)</sup> 山口尚宏<sup>1)</sup>  
 石橋大輔<sup>1)</sup> 松原岳大<sup>1)</sup> 中垣岳大<sup>1)</sup> 山中仁木<sup>1)</sup> 調漸<sup>2)</sup>  
 山田正仁<sup>3)</sup> 水澤英洋<sup>4)</sup> 北本哲之<sup>5)</sup> 西田教行<sup>1)</sup>

**【要旨】**近年、試験管内で異常型プリオニンタンパク (Scrapie Prion Protein: PrP<sup>Sc</sup>) を増幅する方法が開発され、プリオニン病の診断法への応用が摸索されてきた。しかし、クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) を始めとするヒトのプリオニン病での高感度なPrP<sup>Sc</sup>検出の成功例は報告されていなかつた。今回我々は新たにReal-time QUIC法 (real-time quaking-induced conversion : RT-QUIC)と名付けた、新しい異常型プリオニンタンパク (Prion Protein: PrP) 増幅アッセイを開発し、このRT-QUIC法によって脳脊髄液中ヒトプリオニンの超高感度検出が可能であることを明らかにした。

### はじめに

プリオニン病(別名:伝達性海綿状脳症)は、致死性的神経変性疾患であり、また感染性(伝達性)でもあるという、特異な疾患である。代表的な疾患にヒトのクロイツフェルト・ヤコブ病(Creutzfeldt-Jakob diseases: CJD)、羊のスクレイピー(Scrapie)、牛の牛海綿状脳症(Bovine Spongiform Encephalopathy: BSE)などが挙げられる。プリオニン病を引き起こす感染病原体は、プリオニンと呼ばれ、ウイルス・細菌などの微生物とは異なり、病原特異的な核酸(DNAあるいはRNA)は見つかっておらず、おそらくは単一のタンパク質であるPrP<sup>Sc</sup>のみから構成されている、とするタンパク単独仮説が提唱され、現在ではそれを支持する多くの実験結果の集積と共に、その仮説が受け入れられるようになっている。タンパク単独仮説によれば、外部より侵入した、あるいは自発的に生成したPrP<sup>Sc</sup>が宿主細胞内で恒常に発現する正常型PrP(Cellular PrP: PrP<sup>C</sup>)に作用し、PrP<sup>C</sup>からPrP<sup>Sc</sup>への構造変化が誘導され、PrP<sup>Sc</sup>が蓄積しプリオニン病が引き起こされると考えられてい

る。ヒトプリオニン病、特にCJDは痴呆症状を中心とした神経症状が急速に進行し、死に至る神経難病であるため、発症早期に正確に診断することが重要であり、治療法開発とともに、診断法の確立特に生前確定診断法の確立が望まれている。本稿では、CJD患者由来の髄液中の異常型プリオニンタンパクを増幅し検出する新規アッセイ法(Real-time QUIC法)によるCJD診断への有用性について概説する。

### 研究方法

大腸菌からヒト配列のリコンビナントPrP(rPrP)をアフィニティクロマトグラフィーにより精製し、変換反応の基質として用いた。CJD患者由来のbrain homogenateをシードとしてQUIC反応の条件検討を行った。変性剤(グアニジン塩酸、尿素)の濃度、塩濃度、pH、rPrPの濃度などを中心として行い、real-time QUIC法の最適条件を決定した。

その後、実際に日本でのCJDのdefinite case由来髄液18例と非CJD症例由来髄液35例を用いてreal-time QUIC法を行い、感度、特異度について検

1) 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 感染免疫学講座 感染分子解析学分野

2) 長崎大学医学部・歯学部附属病院 へき地病院再生支援・教育機構

3) 金沢大学大学院医学系研究科 脳病態医学講座脳老化・神経病態学(神経内科学)

4) 東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科 脳行動病態学 脳神経機能病態学分野

5) 東北大学大学院 医学系研究科附属創生応用医学研究センター プリオニン蛋白研究部門

証した。さらにオーストラリアのメルボルン大学との共同研究により提供された30例の髄液について盲検テストを行い、この方法の有用性について検討した。

### 新たな異常型 PrP 高感度増幅法 (Real-time QUIC 法) の確立

これまでプリオント病の髄液を用いた補助診断としては14-3-3蛋白などの髄液生化学的マーカーが用いられ感度・特異度から見て、ある程度診断法として有用なことが示されていた<sup>1,2)</sup>が、生前確定診断に至るには現在も脳生検により、最も確実なプリオント病のマーカーであるPrP<sup>Sc</sup>の直接的な証明が必要である。またこれらの生化学マーカー検査はニューロンが破壊される際に髄液中に漏出する蛋白を測定しているものであり、基本的にプリオント病において急速に進行する神経細胞死の過程を反映しているのであって、100%プリオント病特異的とはいえない点が存在する。したがって、できるだけ非侵襲的に診断を確定する方法として採取が容易な患者由来検体である髄液等に存在すると予想される、ごく微量のPrP<sup>Sc</sup>の検出が焦眉の課題であった。

近年、PrP<sup>C</sup>を反応基質として、試験管内で微量のPrP<sup>Sc</sup>を検出が容易なレベルまで増幅することが可能なことが報告され、それを用いた新たな診断法の開発が検討されてきた<sup>3,4,5)</sup>。しかしそれぞれの動物種やプリオント株により増幅効率が異なることもあり、CJDでの高効率の増幅は達成されていなかつ

た。今回我々は、新たなPrP<sup>Sc</sup>高感度増幅法(Real-time QUIC 法と命名)を開発し、CJD患者由来髄液中のPrP<sup>Sc</sup>を検出することに成功した<sup>6)</sup>。この方法は、ごく少量のPrP<sup>Sc</sup>を、大腸菌に発現させ精製したリコンビナントPrP(rPrP)と相互作用させ、そのrPrPにPrP<sup>Sc</sup>依存的な凝集(フィブリル形成)反応を起こさせることにより、サンプル(例えば髄液)中のPrP<sup>Sc</sup>の有無を判定するという方式である。感度を上げ、疑陽性反応をなくすためには、シード(異常型PrP)依存的な反応は抑制せず、自然発生的なフィブリル形成反応のみを可能な限り抑制する条件を見出すことが必要であったが、多くの試行錯誤の後それを達成することができた。このrPrPフィブリルの増幅過程は、アミロイドフィブリルに特異的に結合し、蛍光を発する、チオフラビンT(ThT)の蛍光強度により測定される(図1)。このReal-time QUIC 法を用いると、サンプルが多数の場合でも非常に簡便に、かつreal-timeに測定可能なシステムを構築することが可能となった。

### CJD 診断への Real-time QUIC 法の応用

我々は、このReal-time QUIC 法により代表的ヒトプリオント病であるCJDの生前確定診断が可能であるか検証するため、日本において確定診断されたCJD患者由来の髄液を用いて、異常型PrPの検出を試みたところ、18症例中15例で陽性であった。一方、プリオント病以外の疾患由来の髄液35症例ではすべて陰性であった(表1)。さらにオーストラリアのメルボルン大学との共同研究として髄液30サンプルを無作為に送付してもらい、盲検試験を行った結果、Real-time QUIC 法の感度は87.5%、特異度は100%であった(表1)。これらの試験においてReal-time QUIC 法の陽性例には現在のプリオント病の髄液診断マーカーである、14-3-3蛋白陰性症例も含まれており、Real-time QUIC 法は、生存中でのCJD疑い例を評価する高い診断能力が期待できることが示された。

これまでのプリオント病の診断補助として用いられてきた14-3-3蛋白等の髄液中生化学的マーカー測定やMRI検査と今回のReal-time QUIC 法を組み合わせて行うことによりCJDを中心としたヒトプリオント病の早期発見、早期確定診断が可能となる日が近いことが予想され、今後は現在不治な疾患であるプリオント病に対する有効な治療法の開発が強く望まれよう。

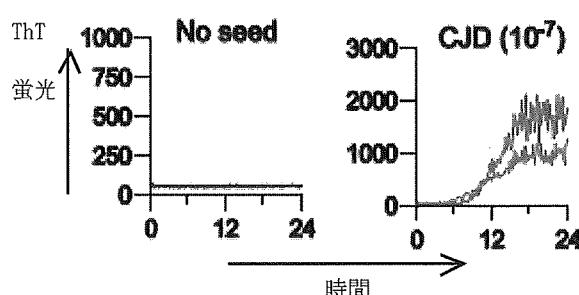


図1：Real-time QUIC 法での反応の例  
No seed；異常型 PrP なしでの反応(蛍光値の上昇は見られない)  
CJD；CJD 脳乳剤の希釈液( $10^{-7}$ )を添加した場合(蛍光値の上昇が観察される)

表1 隆液を用いたCJD診断におけるReal-time QUIC法と14-3-3蛋白生化学的マーカーの感度・特異度の比較

日本の隆液検体53例		オーストラリアの隆液検体30例 (盲検試験)	
	RT-QUIC	14-3-3	RT-QUIC
感度	83.3% (15/18)	72.2% (13/18)	87.5% (14/16)
特異度	100% (0/35)	85.7% (5/35)	100% (0/14) 71.4% (4/14)

括弧内は陽性 / サンプル数をしめす。

## 文 献

- 1) Zerr I, Bodemer M, Gefeller O, et al: Detection of 14-3-3 protein in the cerebrospinal fluid supports the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. Ann Neurol 43:32-40, 1998.
- 2) Satoh K, Tobiume M, Matsui Y, et al: Establishment of a standard 14-3-3 protein assay of cerebrospinal fluid as a diagnostic tool for Creutzfeldt-Jakob disease. Lab Invest 90(11):1637-44, 2010.
- 3) Saborio GP, Permanne B, Soto C: Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. Nature 411: 810-813, 2001.
- 4) Atarashi R, Moore RA, Sim VL, et al: Ultrasensitive detection of scrapie prion protein using seeded conversion of recombinant prion protein. Nat Methods 4: 645-650, 2007.
- 5) Colby DW, Zhang Q, Wang S, et al: Prion detection by an amyloid seeding assay. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 104: 20914-20919, 2007.
- 6) Atarashi R, Satoh K, Sano K, et al: Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluid by real-time quaking-induced conversion. Nat Med 17(2):175-178, 2011.

## &lt;シンポジウム1&gt; プリオノ病の疫学から治療まで

## プリオノ病の画像診断

藤田浩司<sup>1</sup>・原田雅史<sup>2</sup>

**【要旨】** プリオノ病では二次感染予防・治療導入のため、精度の高い早期診断が課題である。拡散強調画像 (DWI) では Creutzfeldt-Jakob 病 (CJD) の病初期から大脳皮質、線条体などに高信号病変が検出され、診断に有用である。CJDにおけるMRSの所見としては、N-acetyl aspartate低下、myo-Inositol上昇が知られ、特に視床ではDWI変化が乏しくともMRSで異常を検出しうる。本邦に比較的多いと考えられるMM2視床型CJDでは、DWIで異常を認めずSPECTやPETでようやく視床に異常を指摘できる。CJDを示唆するDWI所見からの鑑別診断には自己免疫性脳炎も含まれる。

## 1.はじめに

プリオノ病における画像検査の有用性は今日では広く知られる。改めて、プリオノ病における画像検査の役割は何であろうか。現時点では診断への活用が主である。そこで本稿では、プリオノ病の主たる病型であるCreutzfeldt-Jakob病 (CJD) の診断、特に早期診断におけるMRIの役割に焦点を当てる。一方、病勢評価への活用はあまり意識されていないが、今後プリオノ病への治療介入が現実化すれば、大きな課題になりうる。

CJDの診断においてMRIは、正式な診断基準<sup>1)</sup>には未だ採用されていないながら、実地臨床で広く活用されている。ただしMRIも万能ではなく、そのピットフォールを認識しておくことが大切である。

## 2.従来のMRI

孤発性CJDのT2強調画像所見として、両側対称性の線条体高信号<sup>2)</sup>が指摘されていたが、感度は67-79%と低い。かつて大脳皮質に比べて線条体がより高信号であることが重視された。しかしこの所見は発症早期には陰性のこと多く、実際は大脳皮質にも高信号が出現する。FLAIR画像ではその大脳皮質病変がより明瞭に描出される<sup>3)</sup>。経過とともに全般

的な脳萎縮を呈し、しばしば大脳白質にも高信号がみられる。

## 3.拡散強調画像

CJDの拡散強調画像 (DWI) 所見として、大脳皮質のリボン状高信号、線条体前方優位の高信号がよく知られる。これらは孤発性だけでなく、家族性、獲得性のCJDでも見られる。DWIでの異常出現は従来のMRIに比べ圧倒的に早い。最短で発症3週後に異常が出現するとの報告<sup>4)</sup>、更には、発症2ヶ月前からDWIで異常を認めたとの症例報告<sup>5)</sup>もある。脳波PSDは診断基準<sup>1)</sup>で重視されているが、孤発性CJDの30-40%で出現しない<sup>6)</sup>。それらPSD陰性例でもDWIでは何らかの異常を認めることが多い (MM2視床型CJDは例外)。このようにDWIは、脳波や従来のMRIより明らかに診断能に優れる。従って進行性認知症やCJDの可能性が否定できない症例では、早急にDWIを含めた画像検査を行う必要がある。

ここでCJDの典型的な画像所見を述べる。DWIでは主として大脳皮質と線条体に高信号が現れる。淡蒼球には異常を認めない<sup>7)</sup>。視床では信号変化を認めることがある<sup>8)</sup>。初期の高信号は多くは非対称性で、片側性のことや大脳皮質・線条体の一方のみのこともある。しかし経過とともに高信号域は拡大して

1 德島大学病院 神経内科・2 放射線科 (〒770-8503 德島市蔵本町2-50-1)

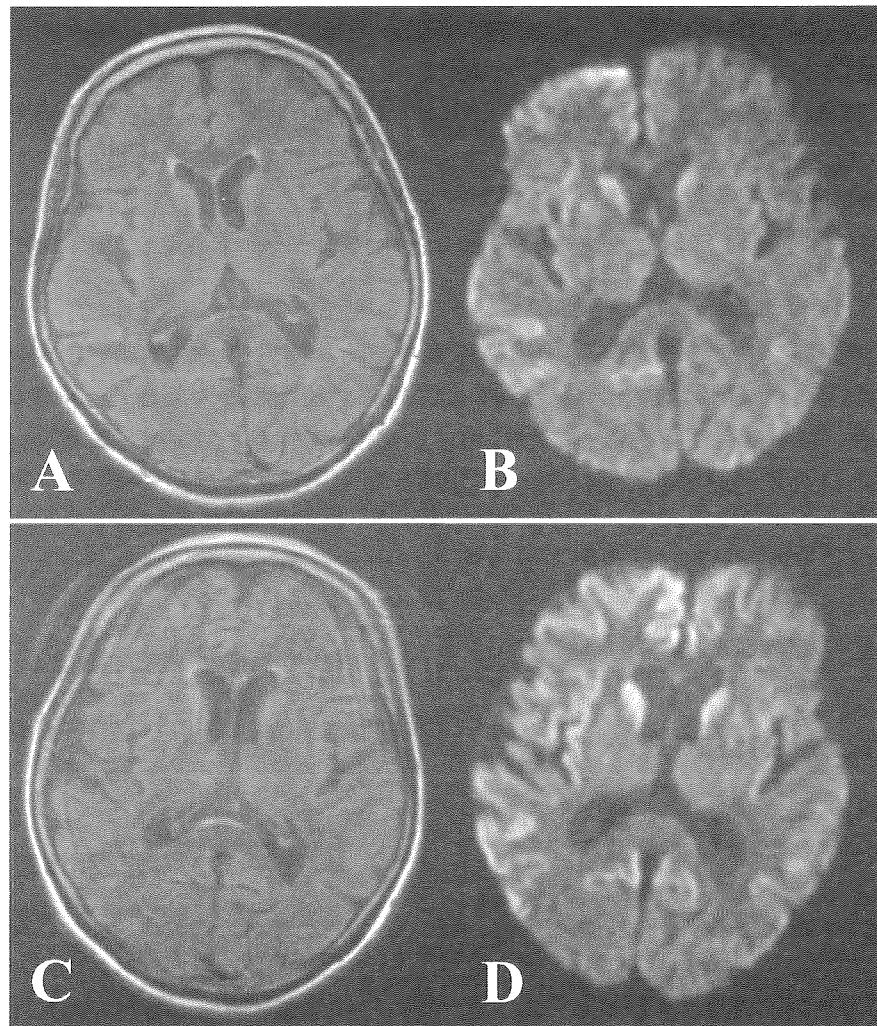


図1 孤発性CJDにおけるMRIの経時変化

症例は70歳女性、視覚異常で発症した。発症3ヶ月後、FLAIR画像では軽微な所見である(A)が、DWIでは右側優位に大脳皮質、線条体の明瞭な高信号を確認できる(B)。その17日後、DWIでは高信号域が広がり信号強度も増している(D)。

両側性となり、また大脳皮質・線条体の両者に出現する。線条体ではまず尾状核頭部、次に被殼の前方から後方へと徐々に高信号が出現する<sup>9)</sup>(図1)。DWIの高信号は、一定期間ののち徐々に軽減する。DWI高信号域において、見かけの拡散係数(apparent diffusion coefficient: ADC)は低下する。

これらDWI高信号・ADC低下がいかなる病態を反映するかについてはまだ結論が得られていない。理論的には組織内での水分子拡散低下を示すが、その病理学的背景は均一ではないと考えられる。進行に伴いT2強調画像でも高信号が出現するため、この段階ではT2 shine throughの影響も考慮する。これまでに、DWI高信号は海綿状変化の程度と関連する<sup>10,11)</sup>、異常プリオントン蛋白の沈着部位と一致する<sup>12)</sup>、ミクログリアの増生を反映する<sup>13)</sup>、など

の報告がなされている。

以上のように有用なDWIであるが、普遍的に診断に用いるには解決すべき課題もある。DWIの表示条件は装置・施設・担当者によって大きく異なるため、軽微な早期病変の見逃しや正常構造と病変の誤認の原因となることが危惧される。そこでDWI表示条件の標準化による画像診断の精度向上が試みられている<sup>14)</sup>。

#### 4. MR spectroscopy

Proton MR spectroscopy(MRS)では、neuronal markerとしてN-acetyl aspartate(NAA)の信号を、glial markerとしてmyo-Inositolの信号を利用する。CJDでは神経細胞障害を反映してNAA低

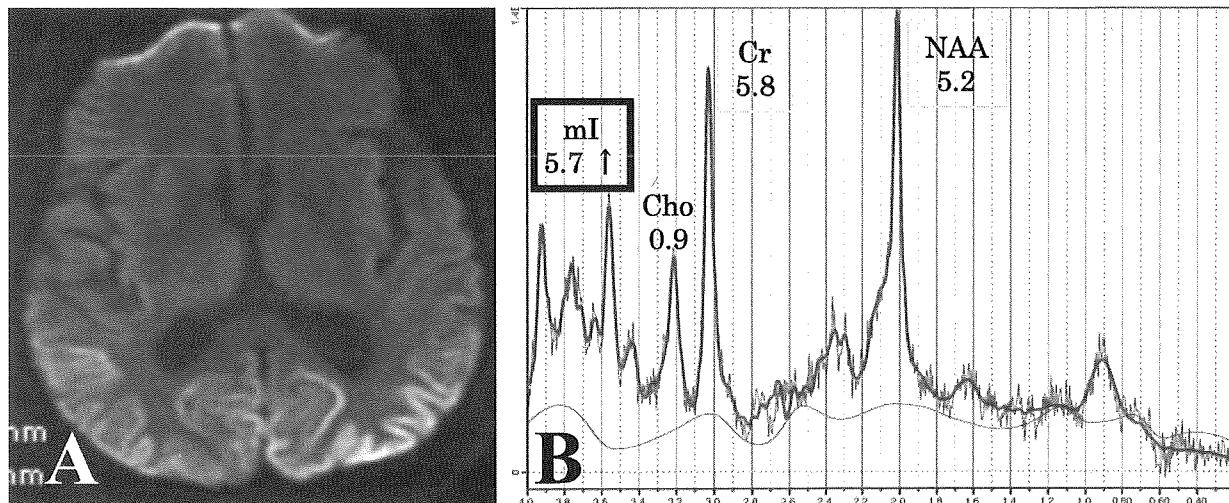


図2 M232R CJD 急速進行型のMRS所見

症例は60歳男性、視覚異常と記憶障害で発症したM232R CJD確実例(codon 129 MM, PrP<sup>Sc</sup> type 1)である。発症4ヶ月後、DWIでは後方優位に大脳皮質高信号を認める(A)。後頭葉皮質に閑心領域を設定したMRS(3T Signa HDx, single voxel method, TR/TE = 5000/15 ms)では、myo-Inositolの上昇を認める(B)。この時点ではNAAは比較的保たれている。

下、またastrocyteの増加によりmyo-Inositol上昇を認める(図2)。従来CJDにおけるMRSの報告は非常に限られていたが、最近その有用性が認識され始めている。2009年のBrain誌に掲載された前向き研究<sup>15)</sup>では、孤発性CJDの臨床症状を呈する急速進行性認知症患者のシリーズで、MRI・MRSが鑑別診断に役立つかが検討された。その結果、DWIと視床のMRSの組み合わせが、CJDと他疾患の鑑別に有用とされた<sup>15)</sup>。

## 5. 非典型的CJDの画像所見

ここでは典型的CJDの定義を、急速に認知症が進行し全身性ミオクローススを呈し、脳波でPSDを認めるものとする。非典型的CJDは、こういった症状・検査所見を呈さない症例と定義する。非典型的CJDには特徴的な画像所見を呈する病型がある。

MM2孤発性CJD 皮質型と視床型がある。皮質型はDWIで大脳皮質に高信号を認めるが、特徴的なパターンは報告されていない。一方、視床型はDWIで異常高信号を認めず、SPECTやPETで視床の血流低下や糖代謝低下が特徴的である(図3A, B)<sup>16)</sup>。

MV2孤発性CJD 失調や認知症状で発症し進行は緩徐である。経過中に幻覚や落ち着きがないなどの精神症状、筋強剛や振戦などの錐体外路症状、ミオクローススなどが出現する。PSDは稀である。臨床的に変異型CJDとの鑑別が問題となるが、DWIで

は変異型CJDのhockey stick signに類似した両側視床内側の高信号を認める<sup>17)</sup>。

VV2孤発性CJD 失調症状で発症し、認知症状が加わっていく。全身性ミオクローススは稀であり経過も比較的緩徐である。PSDの出現は稀である。DWIでは両側視床の広範囲に高信号を呈するのが特徴的である(図3C)<sup>18)</sup>。

V180I家族性CJD 本邦では最多の家族性CJDである。家族内発症の報告はない。PSDは認めない。DWIでは広範囲の大脳皮質が臨床症状と不釣合に華々しい高信号を呈すること、T2強調画像やFLAIR画像で腫脹した大脳皮質が高信号を呈すること、初期には後頭葉内側面に異常を認めないことが特徴である(図3D)<sup>19)</sup>。

M232R家族性CJD 本邦に加え、韓国や中国でも報告されている。家族内発症の報告はない。大部分は典型的CJDで、脳波・画像所見も典型的である(急速進行型)。一方、進行が緩徐な亜型も存在し(緩徐進行型)、PSDがなく、DWIでは下記のMV2型孤発性CJDと同様の両側視床内側の高信号が特徴的である(図3E)<sup>20)</sup>。

## 6. 画像からの鑑別診断

DWIを含めたMRIはCJDの診断に有用であるが、画像所見から鑑別を要する疾患も多い。すなわち痙攣、低血糖脳症、ビタミン欠乏症、髄膜脳炎な

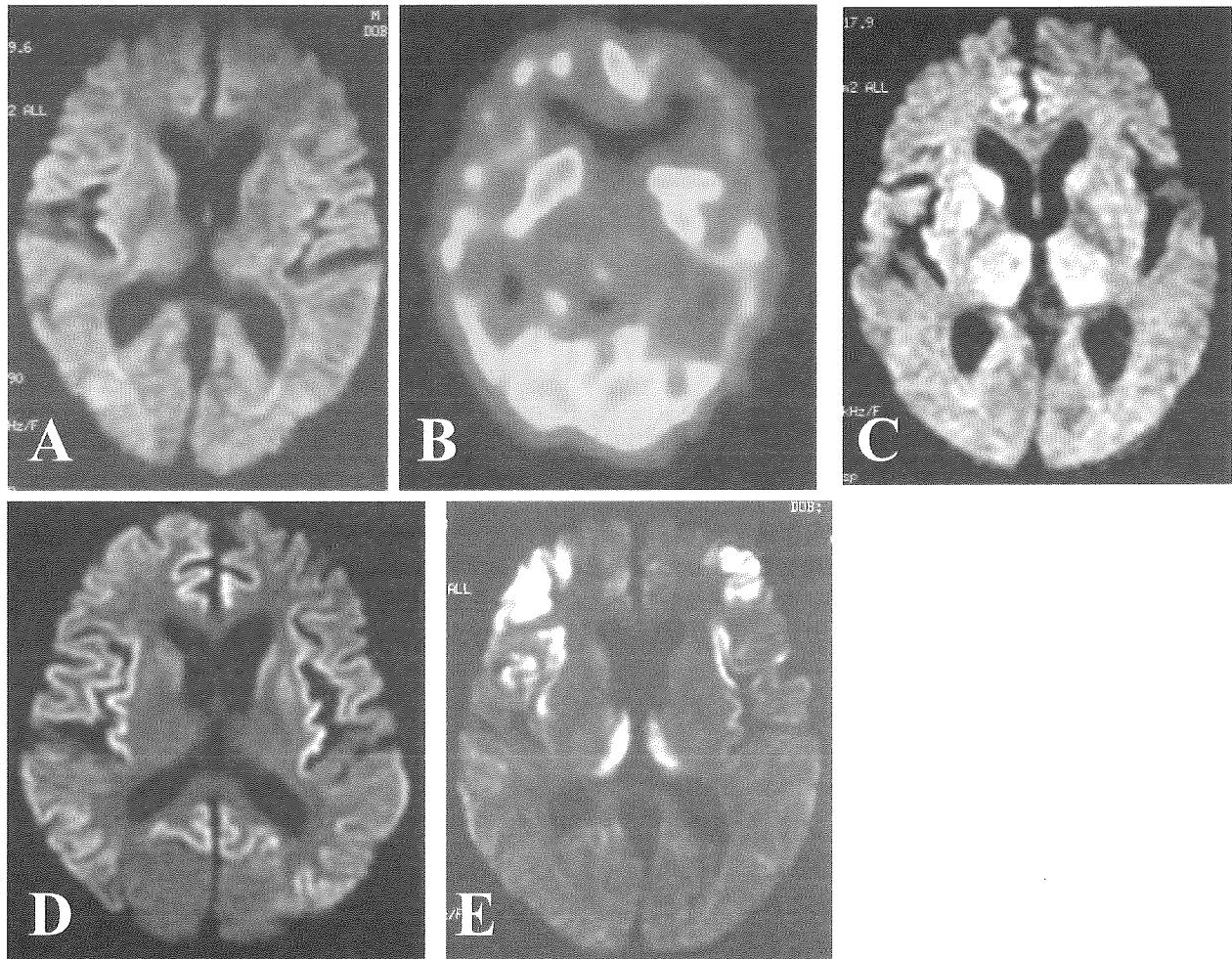


図3 非典型例の特徴的な画像所見

A, B: MM2視床型孤発性CJD DWI (A)で高信号を認めず、SPECT (B)で視床に血流低下を認めることが特徴である。

C: VV2孤発性CJD DWIで線条体、大脳皮質にも高信号を認めるが、両側視床全体に及ぶ高信号が特徴である。

D: V180I家族性CJD DWIで広範囲の大脳皮質が臨床症状と不釣合いに華々しい高信号を呈し、初期には後頭葉内側面に異常を認めないことが特徴である。

E: M232R家族性CJD（緩徐進行型）多くは急速に進行する急速進行型だが、進行が緩徐で脳波PSDのない非典型例が存在し、後者では視床内側部のDWI高信号が特徴である。

どの中枢神経感染症、抗VGKC抗体（最近の報告で抗原はLGI-1とされる）陽性脳炎を含む自己免疫性ないし傍腫瘍性辺縁系脳炎、橋本脳症、MELAS、低酸素性虚血性脳症、悪性リンパ腫などが挙げられる<sup>21)</sup>。これらの鑑別には発症様式や検査所見を総合した判断が必要である。抗VGKC抗体陽性脳炎は臨床症状すらCJDに類似し誤診されることがあるが、DWI高信号病変にてADC低下を伴わないことが重要である<sup>22)</sup>（CJDではADCが低下する）。

一定の間隔をおいて再検することで鑑別しやすくなる場合もある。例えば、CJDの早期では病変が徐々に拡大していくことから、follow upにて病変

が縮小あるいは消退している場合は他疾患の可能性が高くなる。

## 7.まとめ

ここまで、CJDのMR所見に重点をおいて、早期診断、CJD病型の鑑別、および他疾患との鑑別について述べてきた。早期に診断するには結局、早い段階で（それと疑って）DWIを施行することが重要である。認知症など可能性のある患者（あるいは全患者）でルーチンにDWIを施行し評価しておくことが望ましい。最近、髄液に基づくプリオント病の生前

診断の報告がなされており、診断については臨床と画像で拾い上げ、髄液検査で裏付けといった流れが考えられる。将来的には、治療開発を進める中で、治療効果判定における画像の新たな役割も出てくると推測する。

### 謝 辞

本発表は厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業「プリオン病及び遅発性ウイルス感染に関する調査研究班」研究代表者（水澤英洋）の助成によって行われた。また、プリオン病画像小委員会（委員長 湯浅龍彦）、プリオン病サーベイランス委員会（委員長 山田正仁）の協力を受けた。北本哲之先生（遺伝子検査、病理診断）、佐藤克也先生（髄液検査）、佐々木真理先生、志賀裕正先生、町田明先生、織田雅也先生（画像）に感謝致します。

### 文 献

- 1) World Health Organization.  
Human transmissible spongiform encephalopathies. WHO Weekly Epidemiological Record 73:361-372, 1998
- 2) Schroter A, Zerr I, Henkel K, et al:  
Magnetic resonance imaging in the clinical diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. Arch Neurol 57:1751-1757, 2000
- 3) Vranchen AFJE, Frijns CJM, Ramos LMP:  
FLAIR MRI in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. Neurology 55:147-148, 2000
- 4) Shiga Y, Miyazawa K, Sato S, et al:  
Diffusion-weighted MRI abnormalities as an early diagnostic marker for Creutzfeldt-Jakob disease. Neurology 63:443-9, 2004
- 5) Satoh K, Nakaoke R, Nishiura Y, et al:  
Early detection of sporadic CJD by diffusion-weighted MRI before the onset of symptoms. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2010 Jun 11. [Epub ahead of print] PMID: 20542932
- 6) Steinhoff BJ, Zerr I, Glatting M, et al:  
Diagnostic value of periodic sharp wave complexes in Creutzfeldt-Jakob disease. Ann Neurol 56:702-708, 2004
- 7) Young GS, Geschwind MD, Fischbein NJ, et al: Diffusion-weighted and fluid-attenuated inversion recovery imaging in Creutzfeldt-Jakob disease: high sensitivity and specificity for diagnosis. Am J Neuroradiol 26: 1551-62, 2005
- 8) Haik S, Brandel JP, Oppenheim C, et al:  
Sporadic CJD clinically mimicking variant CJD with bilateral increased signal in the pulvinar. Neurology 58:148-149, 2002
- 9) Murata T, Shiga Y, Higano S, et al:  
Conspicuity and evolution of lesions in Creutzfeldt-Jakob disease at diffusion-weighted imaging. Am J Neuroradiol 23: 1164-72, 2002
- 10) Mittal S, Farmer P, Kalina P, et al:  
Correlation of diffusion-weighted magnetic resonance imaging with neuropathology in Creutzfeldt-Jakob disease. Arch Neurol 59:128-134, 2002
- 11) Manners DN, Parchi P, Tonon C, et al:  
Pathologic correlates of diffusion MRI changes in Creutzfeldt-Jakob disease. Neurology 72:1425-1431, 2009
- 12) Haik S, Dormont D, Faucheu BA, et al:  
Prion protein deposits match magnetic resonance imaging signal abnormalities in Creutzfeldt-Jakob disease. Ann Neurol 51:797-799, 2002
- 13) 渡部雄治, 若林規良, 妹尾晴夫, ほか: 頭部MRI拡散強調画像上の高信号域病変はミクログリアの増生を反映している 一家族性Creutzfeldt-Jakob病の1剖検例から一. 神経内科 56:353-358, 2002
- 14) 湯浅龍彦, 佐々木真理: プリオン病におけるMRI診断のピットフォールとその対策. プリオン病及び遅発性ウイルス感染症に関する調査研究班 平成18年度 総括・分担研究報告書. p.99-100
- 15) Lodi R, Parchi P, Tonon C, et al: Magnetic resonance diagnostic markers in clinically sporadic prion disease: a combined brain magnetic resonance imaging and spectroscopy study. Brain 132:2669-2679, 2009.
- 16) Hamaguchi T, Kitamoto T, Sato T, et al:  
Clinical diagnosis of MM2-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. Neurology 64:643-648, 2005

- 17) Krasnianski A, Schulz-Schaeffer WJ,  
Kallenberg K, et al: Clinical findings and  
diagnostic tests in the MV2 subtype of  
sporadic CJD. *Brain* 129:2288-2296,2006
- 18) Fukushima R, Shiga Y, Nakamura M, et  
al: MRI characteristics of sporadic CJD  
with valine homozygosity at codon 129 of  
the prion protein gene and PrPSc type 2  
in Japan. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*  
75:485-487,2004
- 19) Jin K, Shiga Y, Shibuya S, et al: Clinical  
features of Creutzfeldt-Jakob disease  
with V180I mutation. *Neurology* 62:502-  
505,2004
- 20) Shiga Y, Satoh K, Kitamoto T, et al: Two  
different clinical phenotypes of Creutzfeldt-  
Jakob disease with a M232R substitution. *J  
Neurol* 254:1509-1517,2007
- 21) Tschampa HJ, Zerr I, Urbach H:  
Radiological assessment of Creutzfeldt-  
Jakob disease. *Eur Radiol* 17:1200-  
1211,2007
- 22) Geschwind MD, Tan M, Lennon VA,  
et al: Voltage-gated potassium channel  
autoimmunity mimicking Creutzfeldt-Jakob  
disease. *Arch Neurol* 65:1341-1346,2008

〈シンポジウム1〉 プリオニン病の疫学から治療まで

## プリオニン病の感染予防

岸田日帶、黒岩義之

**【要旨】** プリオニン病は稀少な神経疾患だが治療方法がなく致死的で、感染性の蛋白因子によって医療行為を介して感染する可能性を有する。厚生労働科学研究費「プリオニン病及び遅発性ウイルス感染症に関する調査研究(水澤英洋班長)」班では、プリオニン病感染予防ガイドライン(2008年版)を作成した。本ガイドラインでは、医療行為を介した二次感染予防を主眼として、特に注意すべきハイリスク手技を定義した。そして、それらの手技に使用する器具の滅菌・消毒法として、推奨される実用可能な複数の方法を呈示した。また各論では、各専門領域の日常診療に即した実用的な内容となっている。厚生労働省難病情報センターホームページよりダウンロードできる(<http://prion.umin.jp/guideline/index.html>)

Key words: プリオニン病、プリオニン病感染予防ガイドライン、孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病、変異型クロイツフェルト・ヤコブ病  
prion disease, infection prevention guideline for prion disease,  
sporadic Creutzfeldt-Jakob disease, variant Creutzfeldt-Jakob disease

### 1. はじめに

プリオニン病は認知症を主徴とする致死性の神経変性疾患であるが、病原蛋白が感染性を有している点で他の神経変性疾患とは大きく異なっている。プリオニン病は実験動物に伝播し、脳が病理学的に海綿状変化を呈することから、transmissible spongiform encephalopathy (TSE) と称されている。ヒトに発症するプリオニン病の代表がクロイツフェルト・ヤコブ病(Creutzfeldt-Jakob disease; CJD)である。

細菌やウイルスなどの病原体はセントラル・ドグマにしたがって、核酸を介したタンパク合成、自己増殖機能を備えている。しかし、プリオニン病の病原因子は、異常型プリオニン蛋白、いわゆる“prion”であり、この蛋白質は、熱や化学物質に抵抗性を有しており、核酸を介さずに増殖・感染(伝播)する。そのため、従来の滅菌・消毒法に対しては無効であるため、その変更が必要とされている。つまり、ガス滅菌、100度程度の高温処理、紫外線照射、ホルマリン固定などの従来の滅菌法は全く無効で感染性を減弱しない。

プリオニン病の病型には、孤発性 sporadic、遺伝性 genetic、感染性 infectious(獲得性 acquired)がある。感染性プリオニン病には、クールー、変異型クロイツフェルト・ヤコブ病(vCJD)、医原性CJDなどが知られている。医原性CJDの原因としては、硬膜移植、ヒト下垂体ホルモン投与、脳神経外科手術、脳波電極挿入、角膜移植、輸血(vCJDのみ)がある<sup>1)</sup>。

2003年厚生労働科学特別研究事業「医療機関におけるクロイツフェルト・ヤコブ病保因者(疑い含む)に対する医療行為についてのガイドライン策定に関する研究(金子清俊班長)」班で、CJD患者・CJD疑い患者に対する医療行為を対象としたプリオニン病患者に対する感染予防ガイドラインを示した<sup>2)</sup>。

2008-2009年には厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業「プリオニン病及び遅発性ウイルス感染症に関する調査研究(水澤英洋班長)」班が中心となって、すべての患者に対する感染リスクの高い医療行為を対象とした二次感染予防を目的として、プリオニン病感染予防ガイドライン(2008年版)

を改訂した<sup>3)</sup>。本ガイドライン作成にあたっては私達の教室で事務局をさせていただき、神経内科、脳神経外科、眼科、整形外科、病理、手術部など、多くの専門領域の先生方にご協力いただき、執筆をお願いした。このガイドラインは厚生労働省難病情報センターホームページ(HP)よりダウンロードできる(<http://prion.umin.jp/guideline/index.html>)。本シンポジウムでは主にこのガイドラインについて概説した。

## 2. プリオニン病の感染性

まず医療者として誤解してはいけないのは、日常生活や一般的なケアを介してプリオニン病が介護者や医療者に感染することはないということである。現在でも、プリオニン病患者に対して個室隔離をしたり、ケアの際にガウンテクニックをされたり、ということを耳にするが、そのような措置は全く不要である。今後、プリオニン病について医療者へ教育・啓蒙することも非常に重要である。

プリオニン病患者の組織感染性は脳・脊髄、神経節、視神経・網膜というハイリスク臓器・組織に限定されている(表1)。つまり、患者の中枢神経や眼球深部に接する特定の医療処置を行う医療者が二次感染対策に十分留意することが要求されるのみである。ただし、英国を中心に報告されているvCJDでは、輸血を介したvCJDの二次感染の報告が増加しており<sup>4)-6)</sup>、注意をしておく必要がある。このvCJDは牛海綿状脳症(Bovine spongiform encephalopathy; BSE)由来の食物を経口摂取したことによってヒト

に発症したプリオニン病であり、血液中にその感染性を有することが知られている。わが国ではvCJDは1例の報告があるのみであり<sup>7)</sup>、2010年の時点では輸血によるプリオニン病の感染リスクはほとんど考えなくてよいが、今後vCJD患者の発生次第では、さらにガイドラインを改訂せねばならなくなる可能性がある。

感染予防ガイドライン(2008年版)では、ハイリスク臓器つまり、脳、脊髄、脳神経節(三叉神経節を含む)、脊髄後根神経節、視神経および網膜に接触する可能性のある手技、をハイリスク手技と定義している。各領域におけるハイリスク手技を表2にまとめた。

## 3. プリオニン病の感染予防(図1)

この項ではわが国に最も多い孤発性CJD(sCJD)患者についての方針を述べる。遺伝性CJDやvCJDについてはエビデンスが不足しており、今後の研究成果が期待される。

### (1)sCJD患者、sCJD疑いの患者が対象の場合(表3)

まず、sCJD患者、sCJD疑いの患者に対し、その医療処置が絶対に必要かどうかを判断すべきである。たとえば、sCJD患者が経口摂取不良となった際に経鼻経管栄養ではなく胃瘻造設まで必要かどうか、プリオニン病を強く疑うが確定診断するために脳生検が必要なのか(いずれも私はNOと考える)、各位が処置の是非について再考するよういただきたい。

sCJD患者または、sCJD疑いの患者に対するハイリスク手技に使用した医療器具については、可能な

表1 孤発性CJD(sCJD)および変異型CJD(vCJD)における組織感染性(文献3)より改変引用)

組織	sCJD	vCJD
脳、脊髄、脊髄神経根、硬膜	高	高
視神経、網膜	高	高
その他の眼組織	中	中
脳脊髄液	中	中
虫垂	低	中
扁桃	低	中
脾臓	低	中
その他リンパ節	低	中
血液	低	中
その他の組織	低	低

表2 ハイリスク手技

<b>脳神経外科手術について</b>
1. 硬膜を切開または穿刺する手技
2. 松果体、または下垂体周囲組織を切開して下垂体自体に接触する手技
3. 脳神経節を包む周囲組織を切開して神経節自体に接触する手技
4. 硬膜外の手術であっても術中操作により、髄液の漏出が見られる等、結果的に硬膜を穿刺または切開した場合
<b>眼科手術について</b>
視神経または網膜に関する手技
1. 眼窩手術
(ア) 眼窩内容除去術
(イ) 眼球内容除去術
(ウ) 眼球摘出術（角膜移植のためのドナー眼球摘出も含む）
(エ) 眼球摘出及び組織又は義眼台充填術
(オ) 眼窩内異物除去術、眼窩内腫瘍摘出術および眼窩悪性腫瘍手術については術中操作により手術器具が視神経に接触した場合
2. 網膜・硝子体手術
(ア) 黄斑下手術
(イ) 硝子体茎顎微鏡下離断術
(ウ) 増殖性硝子体網膜症手術
(エ) 網膜復位術
(オ) その他の網膜硝子体手術において術中操作により手術器具が網膜に接触した場合
※ 角膜移植のためドナーから角膜を採取する手技については、視神経を切断する手技が含まれていることからハイリスク手技と分類
<b>整形外科手術について</b>
1. 硬膜を穿刺または切開する手技
2. 脊髓後根神経節を包む周囲組織を切開して神経節自体に接触する手技
3. 硬膜外の手術であっても術中操作により、髄液の漏出が見られる等、結果的に硬膜を穿刺または切開した場合
<b>その他の手術について</b>
1. 硬膜を穿刺または切開することにより内部のハイリスク組織に接触する手技

(厚生労働省 CJD 二次感染予防に関する対策検討会報告書「ハイリスク手技に用いた手術器具を介する CJD 二次感染予防について」より引用)

図1 二次感染防止の観点からみたハイリスク手技使用機器の洗浄・滅菌方法のまとめ

## 1. CJD 患者に対して使用した手術機器の滅菌

- ・可能な限りディスポーザブルの機器を使用し焼却
- ・廃棄不可能な機器 → 3% SDS 溶液にて → オートクレーブ滅菌 (プレバキューム方式)  
3 ~ 5 分間 100°C 煮沸 134°C, 8 ~ 10 分

## 2. CJD か否か不明の患者にハイリスク手技を行う場合の洗浄・滅菌

前処理として手術機器に付着した組織をていねいに拭き取った後、機器別に以下に示す方法のいずれかにより処理を行う。

- a. 適切な洗浄 + 3% SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) 溶液を用い 100°C で 3 ~ 5 分間煮沸、このうち機器に応じて日常的な滅菌
- b. アルカリ洗浄剤を用いたウォッシャーディスインフェクタ (90-93°C) 洗浄 + プレバキューム式によるオートクレーブ滅菌 134°C 8-10 分。  
なお、ウォッシャーディスインフェクタを用いることができない場合には、適切な洗浄剤による十分な洗浄 + プレバキューム式によるオートクレーブ滅菌 134°C 18 分もありうる。
- c. 軟性内視鏡については、  
適切な洗浄剤による十分な洗浄 + 過酸化水素低温ガスプラズマ滅菌 2 サイクル

表3 感染対策(各論)抜粋

医療行為	感染対策
看護ケア	<ul style="list-style-type: none"> <li>・隔離は不要</li> <li>・標準予防策 standard precaution</li> <li>・万一、血液でスタッフの手が汚染されたときには石けんを用いて水道水で十分洗浄</li> <li>・一般の医療廃棄物と同様に廃棄 (喀痰、尿)</li> </ul>
一般診療	<ul style="list-style-type: none"> <li>・標準予防策</li> <li>・針刺し事故：これまでに感染事例の報告なし</li> </ul>
脳脊髄液検査	<ul style="list-style-type: none"> <li>・メガネ、マスク、ガウンの着用</li> <li>・ディスポーザブルの器具を使用</li> <li>・計算板も、使い捨てが望ましい。再使用の際は、CJD 専用とし 3% SDS 溶液処理が望ましい。</li> </ul>
消化管内視鏡検査	<ul style="list-style-type: none"> <li>・プリオントラベルを示唆するエビデンスはない</li> <li>・ただし検査適応については十分に是非を検討する必要がある</li> <li>・vCJD の多発地域に居住歴があり、進行性の精神神経症状を有している患者では、内視鏡施行前に専門医にコンサルトすることを推奨</li> </ul>
歯科処置	<ul style="list-style-type: none"> <li>・可能な限りディスポーザブルの器具を使用</li> <li>・原則、再使用せず廃棄</li> <li>・歯科医療行為により CJD の感染が起りうるという証明はなされていない</li> </ul>
ハイリスク手技 ・脳神経外科 ・整形外科 ・眼科	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ハイリスク処置に使用した器具は原則廃棄</li> </ul>

限りディスポーザブルの機器を使用し、原則として廃棄・焼却することが望ましい。廃棄に当たっては感染性容器に密封し内容物が漏出しないよう搬送しなくてはならない。

廃棄不能な機器については、①使用後の器具を乾燥させない、②見える組織片をガーゼで拭き取る(ガーゼは焼却)、③十分に洗浄する。その後、3% SDS溶液で3～5分間100℃煮沸し、さらにオートクレーブ滅菌(プレバキューム方式)134℃、8～10分間、が推奨される。

厚生労働科学研究「プリオントウ病二次感染対策に対する現実的滅菌法開発研究班(北本哲之班長)」の平成20年度総括・分担研究報告書の中で、単独で $10^{-7}$ 以下に感染性を低下させる滅菌方法はないが、2つの汚染除去方法の組み合わせで $10^{-7}$ 以下の滅弱効果を認めることができた。そのうえで、報告書では原則として、廃棄・焼却が望ましい、としている。

看護・ケアの面では、患者の隔離は不要であり、標準予防策 standard precautionで十分対応可能である。万一、血液でスタッフの手が汚染されたときには石けんを用いて水道水で十分洗浄する。患者の喀痰や尿は一般的な医療廃棄物と同様に廃棄する。一般診療も、標準予防策での対応としている。針刺し事故については、記録に残すことは必要であるが、これまでにそれによる感染事例の報告はない。

脳脊髄液検査については、やや注意を要する。術者はメガネ、マスク、手袋、ガウンを着用する。髄液が垂れる可能性のある場所には液体を透過させない滅菌布を敷いて、全てディスポーザブルの器具を使用する。処置終了後に全ての器具を廃棄する。計算板も、使い捨てが望ましい(どうしても再使用する場合には、CJD専用とし3% SDS溶液処理が望ましい)。

消化管内視鏡検査を介して、プリオントウ病を示唆するエビデンスはこれまでにない。ただし検査の適応については十分検討する必要がある。vCJDの多発地域に居住歴があり、進行性の精神神経症状を有している患者では、内視鏡施行前にプリオントウ病の可能性を疑って専門医にコンサルトすることが推奨される。

歯科医療行為によりプリオントウ病の二次感染が起ったという報告はこれまでになされていない。しかし、sCJD患者の歯科処置の際には可能な限りディスポーザブルの器具を使用し、原則、器具を再使用せず廃棄することを推奨している。

sCJD患者または、sCJD疑いの患者に対するハイ

リスク手技(脳神経外科、一部の整形外科・眼科手術)に使用した医療器具については、原則廃棄することを推奨している。

剖検、病理標本作製については、日本神経病理学会の「プリオントウ病剖検・病理検査ガイドライン2008」を参考にされたい。同学会のHPよりダウンロード可能である([http://www.jsnp.jp/pdf/news\\_26.pdf](http://www.jsnp.jp/pdf/news_26.pdf))。

## (2) 全ての患者のハイリスク手技が対象の場合

プリオントウ病を発症した患者は視覚障害や運動障害、認知症などを呈するために、医療機関を受診され、手術を受ける可能性がある。術後、神経症状が増悪しプリオントウ病と診断されるケースが少なからず存在する。そのため、ハイリスク手技に利用した器具に対して、プリオントウを失活させる滅菌・消毒を施行することが重要である。

本ガイドラインでは、プリオントウ病の二次感染予防のため、全ての患者に対するハイリスク手技に使用した機器について表4のような滅菌・消毒法を推奨している。また、術中から器具を乾燥させないようにすること、付着した組織片は拭き取ること、よく洗浄することが、滅菌・消毒の前に推奨されている。

## 4. 問題点

中枢神経系を除く生体組織や使用した医療器具から感染性を有する異常型プリオントウ蛋白を迅速に検出することが、技術的に困難だった。しかし、わが国で最近になってQUIC法という異常プリオントウ蛋白のin vitroでの增幅法が開発され、迅速診断法として期待されている<sup>8)</sup>。

本ガイドライン作成にあたって引用した滅菌・消毒法についてのエビデンスは、ほとんどがマウスなどの実験動物によるものである。今後、ヒト型ノックインマウスを用いた基礎研究を含めたヒトプリオントウでのエビデンスの積み重ねが重要である。

また今後の課題としては、sCJDだけではなく、遺伝性プリオントウ病、vCJDへの対策も急務である。無症候性キャリアへの対応、具体的には輸血・血液製剤、観血的処置、針刺し事故の際の対応などは検討事項である。

多くの病院で実際に導入が容易かつ有効な滅菌・消毒法であるよう考慮して今回の感染予防ガイドライン作成にあたった。今後、さらに簡便な滅菌・消毒法の開発が期待される。新規知見が追加された場合にはガイドラインの改訂が必要となるが、その際にはプリオントウを失活させることはもちろん、実際の

表4 ハイリスク手技に用いられた手術器具等に対して現時点での推奨される処理方法

① 適切な洗浄 + 3 % SDS 溶液で 3 ~ 5 分煮沸処理、その後機器に応じた日常的滅菌・消毒.
② -1 アルカリ洗浄剤を用いたウォッシャーディスインフェクタ (90~93°C) 洗浄 + プレバキューム式によるオートクレーブ 134°C 8分~10分.
② -2 ウォッシャーディスインフェクタを用いることができない場合には、 適切な洗浄剤による充分な洗浄 + プレバキューム式によるオートクレーブ 134°C 18分.
③ 非耐熱性の機器に対しては、 アルカリ洗剤洗浄 + 過酸化水素低温ガスプラズマ滅菌 2サイクル.

※ いずれの場合にも、滅菌処理の前に組織片の除去、十分な洗浄が必要である

(厚生労働省 CJD 二次感染予防に関する対策検討会報告書「ハイリスク手技に用いた手術器具を介する CJD 二次感染予防について」より改変引用)

操作やコスト面も考慮し、具体的に全国津々浦々の病院へ導入することを見据えたガイドラインにする配慮が不可欠である。ガイドラインが絵に描いた餅になつてはならない。

## 文 献

- 1) Will RG.: Acquired prion disease: iatrogenic CJD, variant CJD, kuru. Br Med Bull. 66: 255-65, 2003.
- 2) クロイツフェルト・ヤコブ病感染予防ガイドライン、厚生労働科学特別研究事業 医療機関におけるクロイツフェルト・ヤコブ病保因者(疑い含む)に対する医療行為についてのガイドライン策定に関する研究(金子清俊班長), 2003.
- 3) プリオン病感染予防ガイドライン(2008年版)、厚生労働科学研究費補助金・難治性疾患克服研究事業 プリオン病及び遅発性ウイルス感染症に関する調査研究班(水澤英洋班長), 2008.
- 4) Llewellyn CA, Hewitt PE, Knight RSG, et al. Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. Lancet 363: 417-21, 2004.
- 5) Peden AH, Head MW, Ritchie JE, et al. Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patients, Lancet 364: 527-9, 2004.
- 6) Wroe S, Pal S, Siddique D, et al.: Clinical presentation and pre-mortem diagnosis of blood transfusion associated variant Creutzfeldt-Jakob disease. Lancet 368: 2061-7, 2006.
- 7) Yamada M; Variant CJD Working Group, Creutzfeldt-Jakob Disease Surveillance Committee, Japan. The first Japanese case of variant Creutzfeldt-Jakob disease showing periodic electroencephalogram. Lancet. 367: 874, 2006.
- 8) Atarashi R, Moore RA, Sim VL, et al. Ultrasensitive detection of scrapie prion protein using seeded conversion of recombinant prion protein. Nat Methods. 4:645-50, 2007.

〈シンポジウム1〉 プリオニン病の疫学から治療まで

## プリオニン病の分子標的治療薬の開発

逆瀬川裕二・木村朋寛・堂浦克美

**【要旨】**ヒトプリオニン病は蛋白質からなる病原体プリオニンによって引き起こされる致死性の中核神経変性疾患である。未発症者からの医療を介した2次感染や家族性プリオニン病の存在など潜在的な発症リスクが現実の問題となっており、早期診断や根本的な治療法・予防法の開発が強く望まれている。これまで開発が進んでいる治療薬候補化合物の多くは既存薬からの転用であるが、進行を完全に止めるような化合物は見出されていない。プリオニン病の発症機序には不明な点が多く、治療薬開発における標的分子は限られている。本稿では、治療薬開発の現状と我々の研究室で進められているプリオニン病の分子標的治療法の開発について解説する。

Key words: プリオニン、ヒトプリオニン病、分子標的治療、GABA受容体、Hsp90

### 1. はじめに

プリオニン病は、進行性の認知症や運動失調を主徴とし、最終的には無動性無言状態となる致死性の中核神経変性疾患である<sup>1)</sup>。ヒトのプリオニン病は地域や民族に関係なく年間100万人に1人の割合で発症し、その8割は孤発性のクロイツフェルト-ヤコブ病(CJD)が占めている<sup>2)</sup>。また、ゲルストマンーストロイスラー-シャインカー病(GSS)や家族性不眠性症(FFI)などの家族性プリオニン病<sup>3)</sup>や、ウシ海綿状脳症(BSE)<sup>4)</sup>からの感染とされる変異型CJD<sup>5)</sup>や硬膜移植後CJD<sup>3)</sup>などの感染性プリオニン病も知られている。現在、BSEや変異型CJD、硬膜移植後CJDは沈静化しつつあるが、発症前診断や根本的な治療法・予防法が確立していない現在、プリオニンに汚染した食材、医療材料・器具などによる2次感染や家族性プリオニン病など潜在的な感染リスクに十分対応するためにも、発症前診断・治療・予防法の確立が極めて重要な課題である。

本稿では、ヒトプリオニン病治療薬の開発の現状と、当研究室で進められているプリオニンの複製に関する宿主因子の探索と治療薬開発への応用について解説する。

### 2. プリオニン病治療法の開発

本格的にプリオニン病治療法の開発がはじまったのは、ヒツジやヤギのプリオニン病であるスクレイパーがマウスやハムスターなどに伝達できるようになってからである。これらの感染動物を用いることによって、接種から発症までの期間(潜伏期間)を指標にして治療薬候補化合物の評価が可能となった。

最初に見出された治療薬候補化合物は抗ウイルス作用をもつポリアニオン化合物HPA-23である<sup>6)</sup>。この化合物はプロテオグリカンの側鎖であるガラクトサミノグリカン(GAGs)と類似した構造をもっており、後に類似した構造をもつコンゴーレッドやペントサンポリサルフェート(PPS、図1)などの発見につながった。

1970年代後半になると、プリオニン持続感染細胞が確立され、より簡便に、多くの候補化合物について探索研究が行われるようになった<sup>7)</sup>。また、大規模スクリーニング系として、酵母プリオニン(2,500化合物)<sup>8)</sup>、蛍光ペプチド(10,000化合物)<sup>8)</sup>、in silico(320,000化合物)<sup>9)</sup>などが開発されている。これまで複数の大規模スクリーニングが行なわれ、多くの候補化合物が見出されているが、残念ながらヒトへの実験的治療に検討された例はない<sup>10,11)</sup>。

ヒトでの実験的治療については、既に安全性が確

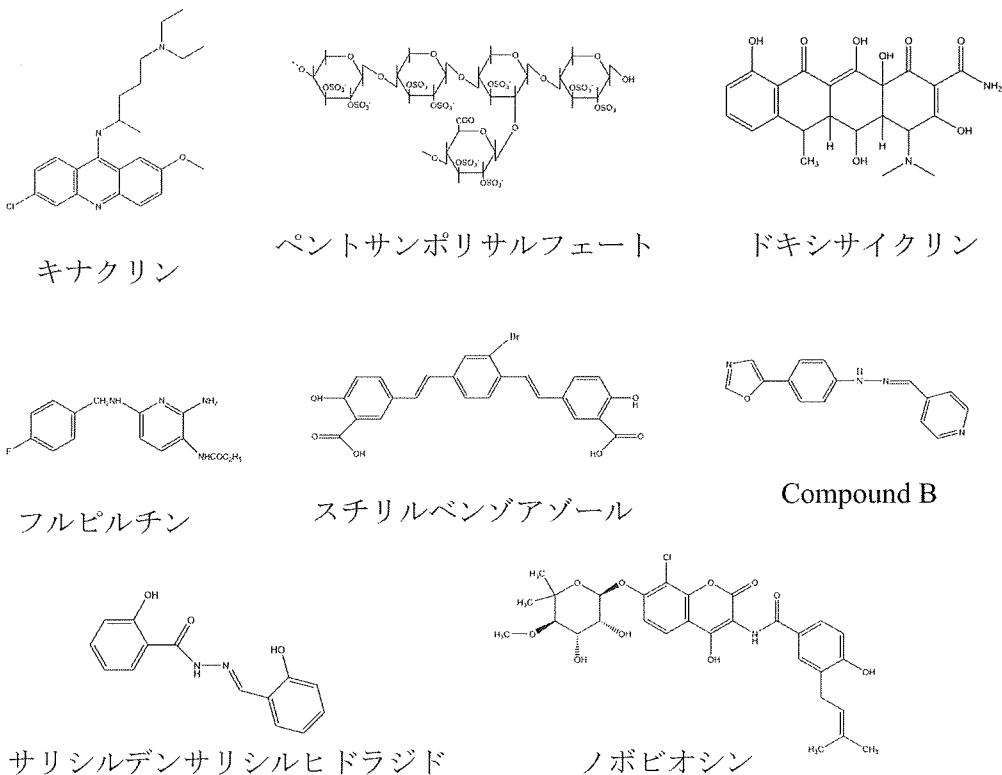


図1. プリオン病治療薬候補化合物とその構造。

表1. ヒトプリオン病治療薬開発の現状

ケースリポート

アシクロビル、静注（1984、1984）効果なし  
 アマンタジン、経口（1971、1973、1975、1979、1983、1983、1984）一部の症例で一過的な効果  
 アンフォテリシンB、静注（1992）効果なし  
 インターフェロン、皮下（1980）効果なし  
 キナクリン、経口（2003、2004、2004、2005）本邦の6症例中4例に一過的な効果  
 ビダラビン、静注（1982）3例中2例に一過的な効果

小規模実験的治療

ペントサンポリサルフェート（2005、2006、2007、2008）一部の症例で生存期間延長

ケースコントロール研究キナクリン

Prion-1（英国、2009）投与群に一過的な効果、有効性なし  
 CJD Quinacrine Study（米国、継続）

ダブルブラインド研究

フルピルチン（ドイツ、2004）有意差なし

認されている既存の他の疾患治療薬について複数検討されている<sup>11)</sup>(表1)。しかし、一時的な効果や生存期間の延長を示す報告も散見されるが、神経変性や脳萎縮の進行を止めるような化合物は見出されていない<sup>10,11)</sup>。

他方、プリオント病の実験的治療を行うにあたって下記のような克服すべき課題が残されている。1) 動物実験では多くの化合物が発症前からの投与によって効果を示すことが報告されているが、ヒトプリオント病の治療の多くは発症してから開始されること、2) ヒトプリオント病は発症件数が少なく致死性であることから、ランダム化ダブルブラインド法といった科学的な評価系で検討できないこと、3) はつきりとした治療効果を評価するマーカーが治療環境に大きく依存する生存期間の延長しかないことなどである。

最近、ドイツ・フランス・イタリアで開発が進められているドキシサイクリン(図1)<sup>11)</sup>は少人数の治療実験ではあるが明らかな生命予後の延長が認められ、ランダム化ダブルブラインド試験による治験が進行中である。詳細な科学的評価が可能な試験はプリオント病治療薬候補化合物の中では始めてであり、今後の治療薬の開発において大きな指標になると考えられる。

### 3. プリオント病発症機序

ヒトプリオント病は発症機序により、1) 孤発性、2) 家族性、3) 感染性に大きく分けられる。一見すると矛盾するこの発症機序の特徴は、プリオント病の病原体がプリオントと呼ばれる感染性の蛋白質粒子であると考えるとうまく説明できる(蛋白質単独仮説)<sup>11)</sup>。

この仮説に従うと、全身に発現する宿主蛋白質である正常型プリオント蛋白質(PrP<sup>C</sup>)が何らかの原因によって感染性をもつ高次構造異性体(PrP<sup>Sc</sup>)に高次構造変換する。新しく生じたPrP<sup>Sc</sup>は新たにPrP<sup>C</sup>をPrP<sup>Sc</sup>へと構造変換しPrP<sup>Sc</sup>は増殖することになる。プリオントの複製機構としてヘテロダイマーモデルと核依存性重合モデルが提唱されている。前者はPrP<sup>C</sup>とPrP<sup>Sc</sup>がヘテロダイマーを形成することによってPrP<sup>C</sup>からPrP<sup>Sc</sup>への構造変換を促進するというモデルである。後者は難溶性蛋白質の重合体であるアミロイド線維の形成モデルとして提唱されているものである。後者のモデルに従うと、PrP<sup>Sc</sup>によって構成される重合体を核としてPrP<sup>C</sup>モノマーが順次重合することになるが、PrP<sup>Sc</sup>の多くはアミ

ロイドを形成せず、感染性にはアミロイド構造は不要であると考えられており、新たなモデルの構築が必要かもしれない。

一方、PrP<sup>C</sup>をコードする遺伝子PRNPにはアミノ酸置換を生じる30を超える変異とプリオント病の発症に関する2つの多型(アミノ酸129と219)が見つかっている<sup>2)</sup>。これらの変異や多型はPrP<sup>C</sup>からPrP<sup>Sc</sup>への構造変換を促進あるいは修飾すると考えられる。

PrP<sup>Sc</sup>の末梢から中枢神経への移行については不明な点が多いが、現在のところ、リンパ組織や神経系を介して最終的な標的である中枢神経に移行し、神経変性や脳萎縮を引き起こすと考えられている<sup>12)</sup>。

プリオント複製と神経変性の過程には、PrP<sup>C</sup>とPrP<sup>Sc</sup>が重要な役割をしているが、宿主因子の関与を示唆する報告もあり、多くの研究室で宿主因子の探索が行われている<sup>13,14)</sup>。プリオント複製に関与する宿主因子として、酸性リン脂質やリボ核酸の関与が報告されている<sup>15)</sup>。蛋白性の因子として、最近、血中プロテアーゼの1つ、プラスミンの前駆体であるプラスミノーゲンがプリオント複製に関与すると報告された<sup>16)</sup>。上記のようなプリオント複製や神経変性の過程にはたらく宿主因子を同定し、これを標的分子としたスクリーニング系を構築することによって、従来の薬物スクリーニングでは見逃されていた化合物の発見につながる可能性がある。

### 4. 2つのプリオント蛋白質

ヒトPrP<sup>C</sup>は第20番染色体短腕にあるPRNP遺伝子にコードされており、253アミノ酸からなる前駆体として小胞体内腔で合成される。合成直後に、それぞれ~20アミノ酸からなるアミノ末端とカルボキシ末端のシグナル配列が切断され、続いて露出したカルボキシ末端のセリン残基にグルコシルホスファチジルイノシトール(GPI)が付加され、この糖脂質を介して膜上に繫留されることになる。小胞体内腔ではさらに2つのN結合型糖鎖の付加と1つのジスルフィド結合が形成され、ゴルジ体で糖鎖修飾を受け、最終的に細胞膜外側に露出した形で局在する<sup>17)</sup>。

PrP<sup>C</sup>はアミノ末端側に銅イオンと結合できる8アミノ酸を単位とした繰り返し配列のあるフレキシブルな構造と、3つのαヘリックスからなるカルボキシ末端の球状構造からなる。PrP<sup>C</sup>の生理機能については確実なことは分かっていない。PrP<sup>C</sup>は銅イオンと結合できることから、神経保護作用や銅イオン

の代謝に関わることが示唆されている<sup>17)</sup>。

$\text{PrP}^{\text{C}}$ は細胞膜上のコレステロールやスフィンゴ脂質に富む膜ドメイン(脂質ラフト)上に局在するが、分子の一部はエンドサイトーシスによって細胞膜から細胞内へ膜小胞として取り込まれ、細胞膜との間をリサイクルする。 $\text{PrP}^{\text{C}}$ の一部は、分子中央部はプロテアーゼによって切断を受け、C1ペプチドと呼ばれるカルボキシ末端からなる断片となっている。この切断を受ける分子中央部は $\text{PrP}^{\text{C}}$ から $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ への構造変換にも関与しており、この部分を切断されているC1ペプチドは $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ に高次構造変換されないとされる<sup>17)</sup>。

一方、 $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ は $\text{PrP}^{\text{C}}$ と同じ一次構造もつ $\beta$ シート構造を多く含む立体構造異性体である。 $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ がもつ感染性は熱、放射線、ホルマリン熱、放射線、プロテアーゼなどによって失われない<sup>11)</sup>。 $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ の分解機構はよくわかっていないが、チロシンキナーゼc-Ablの特異的阻害剤メシリ酸イマチニブが $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ の半減期を>24時間から~9時間と分解を促進するとの報告がある<sup>18)</sup>。

$\text{PrP}^{\text{Sc}}$ は神経細胞特異的に細胞死(神経変性)を引き起こすと考えられてきたが、 $\text{PrP}^{\text{C}}$ がこの過程に必須の因子であることが指摘されている。*PRNP*ノックアウトマウスに $\text{PrP}^{\text{C}}$ を高発現する神経組織を移植し、プリオントンを脳内接種すると、移植片は感染し、神経変性を引き起こす。しかし、 $\text{PrP}^{\text{C}}$ を発現しない移植片周囲の神経組織には移植片より移行した $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ が認められるものの、神経変性は生じないことが報告されている。<sup>19)</sup>

## 5. 我々の研究室におけるプリオントン病の治療法開発

プリオントン病治療薬の候補化合物として多くの化合物が探索してきた。これらの化合物の多くは、 $\text{PrP}^{\text{C}}$ から $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ の構造変換を抑制する活性を指標に見出されたものである。我々の研究室でも、 $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ を標的として $\text{PrP}^{\text{C}}$ から $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ への構造変換を抑制する化合物として、アミロイド親和性化合物、チオフラビン誘導体BTA-1やコンゴーレッド誘導体BSB<sup>20)</sup>、スチリルベンゾアゾール化合物BF-168<sup>21)</sup>(図1)などを見出している。いずれもプリオントン持続性感染細胞において極めて低濃度(数nMオーダー)で $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ 産生を抑制する。また、疾患動物の末梢血管内に投与することによって脳内移行後、異常プリオントン蛋白質凝集体を検出することができる。しかし、疾患動物での治療効果は低く、脳血液閥門透過

性や脳内からのクリアランスにおいて改良の余地を残している。

脳移行性に優れたアミロイド結合性化合物Compound B(図1)<sup>22)</sup>は、経口投与においても2倍以上延命させることに成功した。投与群では疾患末期においても脳内への $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ の蓄積は減少していたが、接種したプリオントン株によっては効果が低く、化合物の安定性や安全性に克服すべき課題がある。ペントサンポリサルフェート(PPS、図1)はポリアニオン化合物に分類される硫酸基を含む分子量~4,000ダルトンのキシレン重合体である。PPSの作用機序は完全に明らかとなってはいないが、 $\text{PrP}^{\text{C}}$ への強い結合性を示すこと、 $\text{PrP}^{\text{C}}$ のエンドサイトーシスを促進する<sup>23)</sup>ことから、 $\text{PrP}^{\text{C}}$ と $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ の結合を抑制する、あるいは $\text{PrP}^{\text{C}}$ をプリオントン複製の場から排除することによって作用すると考えられる。PPSは BBBを透過しないことから、我々はマウスモデルにおいて PPSの脳室内持続投与を行った。感染初期あるいは後期に投与を開始した場合でも $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ の産生が顕著に抑制され、生存期間も2.4倍、1.7倍に延長した。この薬剤も $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ の産生を顕著に抑制していたが、神経変性の進行は抑制できていない<sup>24)</sup>。

## 6. ターゲットベースドのプリオントン病治療薬の開発

これまで、プリオントン病治療薬の候補化合物のスクリーニングは、比較的容易に多検体のスクリーニングに使用できるプリオントン持続感染細胞を中心として行われてきた。しかし、これまでに行われてきた大規模スクリーニングから見逃された化合物がその後の探索研究において比較的頻繁に見出されている。そこで、我々の研究室では、プリオントン複製や神経変性の過程にはたらく宿主因子を同定し、これらを分子ターゲットとする、より効率のよい新しいスクリーニング系を構築することを試みている。本稿ではsiRNAノックダウン法とリコンビナント $\text{PrP}^{\text{C}}$ を用いた探索について紹介する。

### 6-1. siRNAによる遺伝子ノックダウンによるプリオントン関連因子の探索

我々は、プリオントン持続感染細胞の特定の蛋白質の発現をsiRNAノックダウン法によって抑制することによって、250以上の細胞膜蛋白質や細胞外マトリクス蛋白質を中心とするプリオントン持続感染細胞を用いたスクリーニングを行い、 $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ 産生を促進す

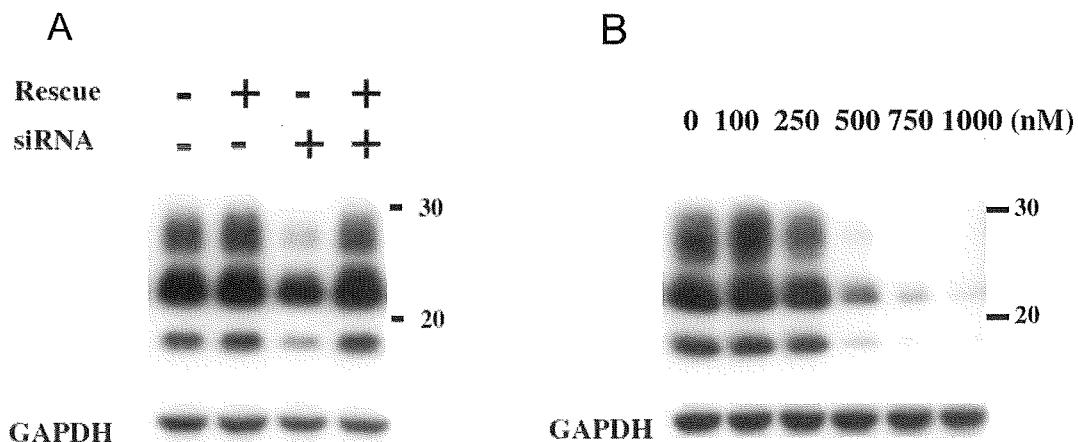


図2. プリオントの分子標的.

- A. siRNAによるGABA A受容体β1サブユニットの発現低下によりPrP<sup>Sc</sup>産生は抑制される.  
 B. サリシルデンサリシルヒドラジドによるGABA A受容体β1サブユニットの阻害によってPrP<sup>Sc</sup>産生は抑制される.

る遺伝子を複数同定した。本稿では、GABA A受容体β1サブユニット<sup>25)</sup>をピックアップして紹介する。GABA A受容体はγ-アミノ酪酸受容体の一つで抗不安薬ベンゾジアゼピンやバルビツール酸に結合性をもつタイプの受容体である。このβ1サブユニットのノックダウンによってPrP<sup>Sc</sup>産生は抑制されるが、siRNAに影響されない塩基配列によってコードされるβ1サブユニットを過剰発現すると、PrP<sup>Sc</sup>産生抑制は消失する、いわゆるレスキューエフェクトを示した(図2A)。また、この受容体サブユニットの特異的な阻害剤であるサリシルデンサリシルヒドラジド(図2B、図1)とピククリンメチオジドを培養細胞に投与すると、いずれも用量依存的にPrP<sup>Sc</sup>の産生を抑えた。これらの結果は、GABA A受容体β1サブユニットはPrP<sup>Sc</sup>産生促進に機能し、その阻害剤はプリオントの治療薬のリード化合物として使用できる可能性を示している。

## 6-2. PrP<sup>C</sup>の高次構造変化に関わる因子の探索

最近になって、試験管内実験からPrP<sup>C</sup>からPrP<sup>Sc</sup>への高次構造変化と感染性の獲得に、酸性リン脂質やリボ核酸(RNA)がPrP<sup>Sc</sup>産生を促進することが報告されている。我々は、上記活性をもつ蛋白性の因子を探索する目的で、PrP<sup>C</sup>の高次構造の変化をモニターできるアッセイ系を構築して探索研究を行った。

まず、PrP<sup>C</sup>と同じ高次構造をもつリコンビナントプリオント蛋白質(rPrP)を用いて立体構造変化を測定できる測定系を構築した。この測定系は、正しい立体構造をとるrPrPは低濃度のトリプシン消化では消化されないことを利用している。合成RNAを構造変換因子として、rPrPとインキュベートした後、トリプシン消化への感受性の変化を調べた。その結果、合成RNAは用量依存的にrPrPの分子中央部の部分変性を促進し、rPrP分子はトリプシン消化によってアミノ末端とカルボキシル末端の2つの断片に切斷されることを確認した。そこで、この測定系を利用し、マウス神経芽腫細胞N2a細胞より、同様な活性をもつ蛋白質分子を探査したところ、ヒートショック蛋白質90(Hsp90)を見出すことに成功した<sup>26)</sup>。Hsp90は、細胞や細胞外に局在し、シグナル伝達関連蛋白質などの活性調節を制御するシャペロン蛋白質である。Hsp90は合成RNAと同様にrPrP分子の中央部の構造変化を促進した(図3)。Hsp90阻害剤であるノボビオシンは、培養細胞を用いた実験でPrP<sup>C</sup>の分解を促進するが<sup>27)</sup>、N2a細胞でも同様の結果であることを確認した(図4A)。一方、我々の研究室で見出した新規Hsp90阻害剤は、プリオント持続感染細胞において、PrP<sup>Sc</sup>産生を用量依存的に抑制した(図4B)。以上の結果は、Hsp90がPrP<sup>C</sup>の発現やPrP<sup>Sc</sup>産生抑制に機能していることを示すと同時に、今回示したHsp90阻害剤はプリオントの治療薬のリード化合物になる可能性を示している。

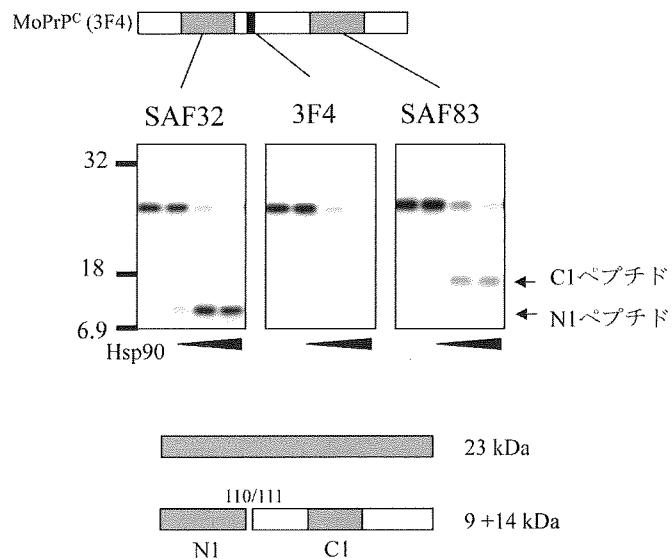
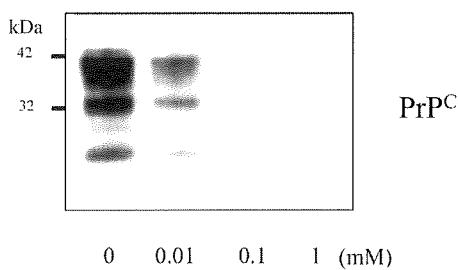


図3. プリオニン持続感染細胞におけるGABA受容体 $\beta$ 1の機能(文献25を改変).  
リコンビナントPrP<sup>C</sup>はHsp90の作用により分子中央部の構造変化によりトリプシン消化を受けやすくなり、アミノ末端側とカルボキシ末端側の2つの断片に切斷される.

A.



B.

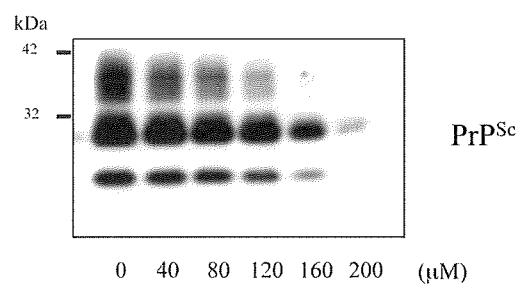


図4. 合成RNAとHsp90によって引き起こされるrPrP分子中央部の高次構造変化.  
A. Hsp90阻害剤ノボビオシンによってPrP<sup>C</sup>の分解亢進によって、培養細胞から消失する.  
B. 新規Hsp90阻害化合物によってプリオニン感染細胞よりPrP<sup>Sc</sup>産生が抑制される.

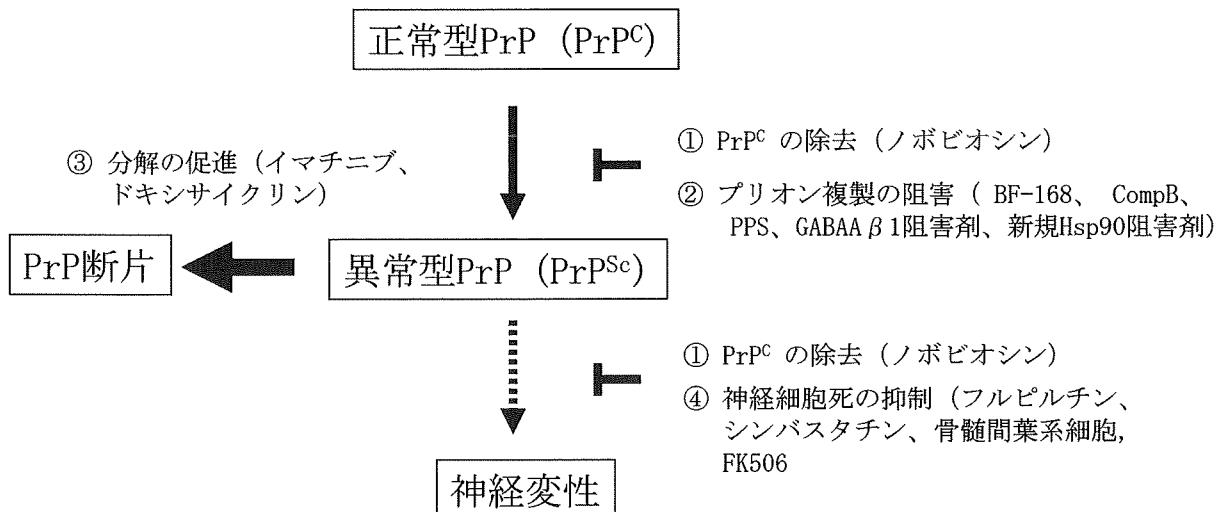


図5 培養細胞におけるHsp90阻害剤によるPrP<sup>C</sup>分解促進とPrP<sup>Sc</sup>産生抑制.

## 7. 分子標的治療法開発今後の展望

プリオントの治療法開発には、PrP<sup>C</sup>とPrP<sup>Sc</sup>だけでなく、プリオント産生に関わる宿主因子を標的にした薬剤スクリーニングが必要である(図5)。我々は、異なる原理に基づくプリオント関連細胞因子の探索を行い、GABA $\alpha$ レセプター $\beta$ 1サブユニットとHsp90をそれぞれ見出すことに成功した。特にHsp90の新規阻害剤は、rPrPのトリプシン感受性を指標にした測定系によって見出したものであり、この測定系を使用することによってプリオント病治療候補化合物スクリーニング系に代用することが可能である。このような標的分子を利用した無細胞系のスクリーニング系は、細胞毒性などによる見落しを防ぐことができる。

一方、PrP<sup>Sc</sup>の分解過程と神經変性過程に関連する細胞因子についてはほとんど分かっていない(図5③、④)。この領域の探索研究は今後の大きな課題である。

## 文 献

- 1) Prusiner SB, Scott MR, DeArmond SJ, et al: Prion protein biology. *Cell* 93: 337–348, 1998.
- 2) Ironside JW: Review: Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain Pathol* 6: 379-388, 1996
- 3) Wells GA, Scott AC, Johnson CT, et al: A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet Rec* 121: 419-420, 1987.
- 4) Ironside JW: Variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Haemophilia* 16 (Suppl. 5): 175-180, 2010.
- 5) Nozaki I, Hamaguchi T, Sanjo N, et al: Prospective 10-year surveillance of human prion diseases in Japan. *Brain* 133: 3043-3057, 2010.
- 6) Kimberlin RH, Walker CA: Antiviral compound effective against experimental scrapie. *Lancet* 2: 591-592, 1979.
- 7) Kocisko DA, Morrey JD, Race RE: Evaluation of new cell culture inhibitors of protease-resistant prion protein against scrapie infection in mice. *J Gen Virol* 85, 2479-2483, 2004.
- 8) Trevitt CR, Collinge J: A systematic review of prion therapeutics in experimental models. *Brain* 129, 2241-2265, 2006
- 9) Hosokawa-Muto J, Kamatari YO, Nakamura HK, et al: Variety of antiprion compounds discovered through an in silico screen based on cellular-form prion protein structure: Correlation between antiprion activity and binding affinity. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 765-771, 2009.
- 10) 逆瀬川裕二、堂浦克美：新しい治療法開発への展望 (厚生労働科学研究費補助金何地性疾患

- 克服研究事業「プリオント病及び遅発性ウイルス症に関する調査研究班」編). プリオント病と遅発性ウイルス感染症, 金原出版, 東京, 2010, pp188-193
- 11) Zerr I: Therapeutic Trials in Human Transmissible Spongiform Encephalopathies: Recent Advances and Problems to Address. *Infect Disord-drug Targets* 2009; 9: 92-99, 2009
  - 12) N Glatzel M, Giger O, Braun N, et al: The peripheral nervous system and the pathogenesis of prion diseases. *Curr Mol Med* 4: 355-359, 2004.
  - 13) Lee KS, Linden R, Prado MAM, et al: Towards cellular receptors for prions. *Rev Med Virol* 13: 399-408, 2003
  - 14) Nieznanski K: Interactions of prion protein with intracellular proteins: So many partners and no consequences? *Cell Mol Neurobiol* 30: 653-666, 2010
  - 15) Wang F, Wang X, Yuan CG, et al: Generating a prion with bacterially expressed recombinant prion protein. *Science* 327, 1132-1135, 2010
  - 16) Mays CE, Ryou C: Plasminogen stimulates propagation of protease-resistant prion protein in vitro. *FASEB J.* 24: 5102-5112, 2010.
  - 17) 八谷如美、金子清俊：正常プリオント蛋白とその機能 (厚生労働科学研究費補助金何地性疾患克服研究事業「プリオント病及び遅発性ウイルス症に関する調査研究班」編). プリオント病と遅発性ウイルス感染症, 金原出版, 東京, 2010, pp22-28.
  - 18) Ertmer A, Gilch S, Yun SW, et al: The tyrosine kinase inhibitor ST1571 induces cellular clearance of PrP<sup>Sc</sup> in prion-infected cells. *J Biol Chem.* 279: 41918-41927, 2004.
  - 19) Brandner S, Isenmann S, Raeber A, et al: Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature* 379: 339-343, 1996.
  - 20) Ishikawa K, Doh-ura K, Kudo Y, et al: Amyloid imaging probes are useful for detection of prion plaques and treatment of transmissible spongiform encephalopathies. *J Gen Virol* 85: 1785-1790, 2004.
  - 21) Ishikawa K, Kudo Y, Nishida N, et al: Styrylbenzoazole derivatives for imaging of prion plaques and treatment of transmissible spongiform encephalopathies. *J Neurochem* 99: 198-205, 2006.
  - 22) Kawasaki Y, Kawagoe K, Chen CJ, et al: Orally administered amyloidophilic compound is effective in prolonging the incubation periods of animals cerebrally infected with prion diseases in a prion strain-dependent manner. *J Virol* 81: 12889-12898, 2007.
  - 23) Shyng SL, Lehmann S, Moulder KL, et al: Sulfated glycans stimulate endocytosis of the cellular isoform of the prion protein, PrP<sup>C</sup>, in cultured cell. *J Biol Chem* 270: 30221-30229, 2005.
  - 24) Doh-ura K, Ishikawa K, Murakami-Kubo I, et al: Treatment of transmissible spongiform encephalopathy by intraventricular drug infusion in animal models. *J Virol* 78: 4999-5006, 2004.
  - 25) Kimura T, Ishikawa K, Sakasegawa Y, et al: GABAA receptor subunit beta1 is involved in the formation of protease-resistant prion protein in prion-infected neuroblastoma cells. *FEBS Lett* 584: 1193-1198, 2010.
  - 26) Sakasegawa Y, Hachiya NS, Kaneko K: Hsp90 modifies the conformation of recombinant mouse prion protein in vitro. In: *Prions-Food and Drug Safety*. (ed. Kitamoto T) Springer-Verlag Tokyo, 2005, pp.211-212.
  - 27) Ochel HJ, Gademann G: Antiviral Therapy 9:441-445, 2004.

〈シンポジウム2〉 神経系の浮腫と細胞死

## 血液脳関門・血液神経関門の破綻

神田 隆

【要旨】血液脳関門 (blood-brain barrier, BBB) と血液神経関門 (blood-nerve barrier, BNB) は、それぞれ中枢神経系と末梢神経系を全身循環系から隔離するシステムであり、神経系の感染症や自己免疫性疾患の成立・増悪機序から適切な治療を考える上で、BBBとBNBに関する知識は欠くことができない。BBBは血管内皮細胞、ペリサイト、アストロサイトの3者から、BNBは血管内皮細胞とペリサイトの2者から構成されている。BBB、BNBの“破綻”と呼ばれる現象は、2つの独立したプロセスから成り立っている。1つは単核球のバリアーを超えた神経実質内への侵入、もう1つは内皮細胞間に存在するタイトジャンクションの破壊・機能不全を介した液性因子の流入であり、それぞれが独立した分子メカニズムをもつ。

Key words: blood-brain barrier, blood-nerve barrier, endothelial cell, pericyte, astrocyte  
血液脳関門、血液神経関門、内皮細胞、ペリサイト、アストロサイト

### はじめに

神経系は長い間、全身の免疫現象からは隔離された部位であると認識されてきた。“immunologically privileged site”という用語に集約されるこの考え方では、中枢神経系は①実質内にMHC class I, IIを発現する細胞がない、すなわち、T細胞が抗原を認識するのに必要な細胞がない、②中枢神経系に移植された同種異型グラフトまたは異種グラフトは、中枢神経外に移植されたものと比べてはるかに拒絶反応が少ない、③免疫系の求心路であるリンパ管が存在しない、といったことに加えて、④中枢神経系への免疫系の遠心路は血液脳関門 (blood-brain barrier, BBB) と血液脳脊髄液関門 (blood-CSF barrier, BCSFB) によってシャットダウンされている、という事実に基づいている。現在、この“immunologically privileged site”という考え方には々々の批判が加えられているのは周知の通りであるが、神経系が強固なバリアーシステムで保護・コントロールされているということに関しては異論がない。

神経系のバリアーシステムには、このBBB、

BCSFBに加えて血液神経関門 (blood-nerve barrier, BNB)、血液網膜関門 (blood-retinal barrier, BRB)、血液脊髄関門 (blood-spinal cord barrier)、血液迷路関門 (blood-labyrinth barrier) 等が含まれ、blood-neural barrierと総称される。本論文の主題は、中枢神経系のバリアーシステムであるBBBと、末梢神経系のバリアーシステムBNBの破綻メカニズムを最近の知見を含めて紹介することにある。

BNBはかつてはBBBと比較して不完全な構造物と考えられていた。しかし、現在では、末梢神経系を全身循環系から隔離するBBBとほぼ同等の機能を持つ強固なバリアーシステムと認識されており<sup>1)</sup>、上記①②③の特徴はそのまま末梢神経系にも共通であることが知られている。しかし、BBBに関する知識がこの10年間で飛躍的に蓄積しているのに対し、BNBの分子機構に関する研究成果は驚くほど少ない。本稿で述べる最近の知見の多くは、BBBまたは一般臓器の微小血管をもとにした研究で得られた成果であることを最初にお断りしておく。

## バリアーの解剖学

BBBは中枢神経実質に存在する微小血管に局在し、内側（血管腔側）から順に血管内皮細胞、ペリサイト、アストロサイトの3種類の細胞から構成される（図1）。隣接する内皮細胞はタイトジャンクションにより連結されて一層の管腔を形成し、その外側にペリサイトが張り付く。この2つの細胞は共通の基底膜が全体を覆う。この2つの細胞の外側にはもう1枚の基底膜（グリア限界膜、glia limitansと呼ばれる）があり、この外側に、アストロサイトの足突起がくっついてBBBの基本構造が成立する。

BNBの局在する部位は2箇所ある。一つは神経内膜内微小血管で、血管内スペースと神経内膜組織（末梢神経系実質）を隔てる。もう一つは神経周膜、とくにその最内層で、末梢神経外の細胞外組織と神経内膜組織を隔てる。BNBに関する詳細と最近の知見について著者の総説を参照されたい<sup>2)</sup>。後者の神経周膜バリアーは極めて強固な構造物で、外傷などの機械的損傷が無い限り臨床的にその破綻が問題になることはないと考えてよい。各種炎症性疾患・自己免疫疾患で“BNB破綻”が論じられるのは主に前者であり、本稿ではこの微小血管バリアーについて述

図1

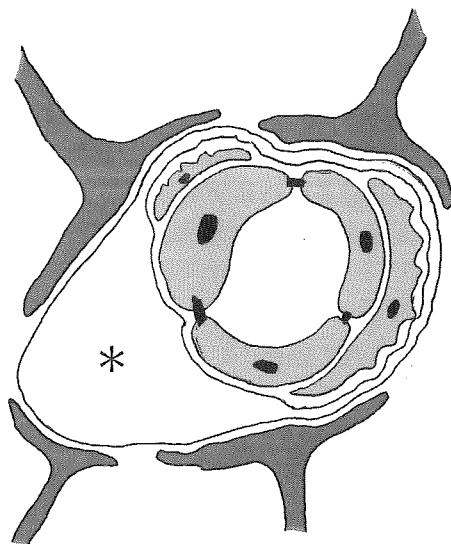


図1 BBBの基本構造

最内層の隣接する内皮細胞がタイトジャンクションによって連結されて管腔を形成し、その外側をペリサイトが不完全に覆う。この2種類の細胞は共通の基底膜によって完全に覆われ、更に外側にもう1枚の基底膜（グリア限界膜）があり、その外側をアストロサイトの足突起が覆う。2枚の基底膜の間の空間（※）は血管周囲腔であり、内皮細胞を通り抜けてきたT細胞がAPCと遭遇する場になっている。

べることとする。隣接する内皮細胞がタイトジャンクションにより連結されて一層の管腔を形成し、その外側にペリサイトが張り付いて1枚の基底膜で覆われる、という基本型はBBBと同様であるが、末梢神経系ではアストロサイトがなく、2枚目の基底膜（グリア限界膜）も存在しない点がBBBとの大きな相違点である（図2）。

図2

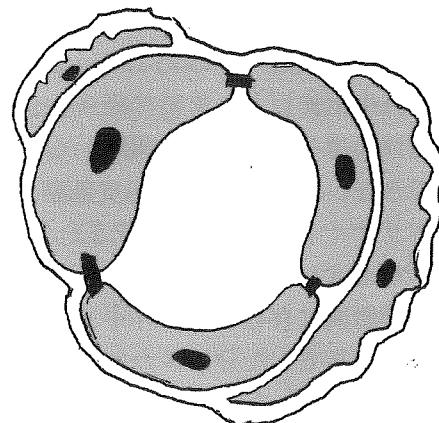


図2 BNBの基本構造

BBBの基本構造から第2の基底膜（グリア限界膜）とアストロサイトの足突起を除いた構造である。

## BBB、BNBを構成する細胞はどのような特徴を持っているか

### (1) 微小血管内皮細胞

BBB、BNBを構成する微小血管内皮細胞は、非バリアー性の一般臓器内皮細胞と比較して次の4つの特徴を有している。すなわち、①無窓である（fenestrationがない）こと、②pinocytosisが極めて少なく、細胞内を突き抜ける物質輸送が制限されていること、③隣接する内皮細胞間で、高度に複雑で連続性のあるタイトジャンクションを持つこと、④各種トランスポーター、レセプターを発現し、特有の物質輸送系を持つこと、である。

BBBとBNBの本質的な違いについて筆者は長い間興味を持っていた。この問題を明らかにするための王道は、BBB・BNBを構成する細胞を直接的に比較することである。しかし、1980年頃からBBB構成内皮細胞については培養法が確立し、細胞学的特性が次々と明らかになっていったのに対して、BNB構成内皮細胞については全く情報がない時期が続いていた。まず自ら培養手技から樹立しないと話が進まないというわけで、ウシBNB由来内

皮細胞一次培養手技の完成<sup>3)</sup>から同細胞を用いた抗GM1抗体<sup>4)</sup>、ギラン・バレー症候群患者血清<sup>5)</sup>のBNB透過性に与える影響などを検討し、一定の成果を得ることができた。しかし、BNBの細胞生物学的研究をもう一步推進させるためには、①in vivoの性状をよく把持し、②齧歯類またはヒト由来で、③さらに、BNB構成成分である神経内膜微小血管内皮細胞を起源とする、という3つの条件を満たす複数の不死化細胞株の樹立が急務であると考え、温度感受性SV40およびヒトテロメラーゼ遺伝子をレトロウイルスベクターを用いて導入する手法を用いて、神経内膜微小血管由来内皮細胞のヒト(図3)およびラット不死化細胞株樹立に世界に先駆けて成功した<sup>6, 7)</sup>。この細胞は BBB由来内皮細胞と同じく紡錘形の細胞が集合して1枚のシートを作る形態を示しており、von Willebrand因子陽性、アセチル化LDL取り込み陽性、tight junction形成などのバリアー構成内皮細胞の基本的属性を有していることが明らかになった。claudin-5、occludin、ZO-1などのtight junction関連タンパクやGLUT-1、mdr1、LAT1、ABCG2などの各種トランスポーターの発現も明らかで、BBB構成内皮細胞とほぼ同等の細胞学的性質を有していることが証明された。

同時に、BBB構成内皮細胞とBNB構成内皮細胞は本質的に違うものであることも明らかになった。たとえば、BNB構成内皮細胞にはBBB構成微

小血管内皮細胞の神経実質側細胞膜に発現しているOAT3が存在しない<sup>6)</sup>。OAT3はhomovanillic acid(HVA)を血管腔内へと排泄するefflux transporterであり、シナプス構造の無い末梢神経実質内血管にOAT3が存在しないのは極めて合理的なことと思われる。

### BBB、BNBのバリアー機能を維持しているメカニズムは何か

中枢神経系のバリアーシステムであるBBBは、上述のように内皮細胞/ペリサイト/基底膜からなるBNBの基本構造に加え、その外側にもう1枚の基底膜があつてその外側に接する形でアストロサイトの足突起astrocyte footが取り囲むという形態をとっている。この外側の基底膜(別名グリア限界膜glia limitansと呼ばれる)は内側の基底膜とはまったく異なる分子構成をもち、T細胞の中枢神経実質への浸潤を制御する強力な“非細胞性”バリアーとして機能している。

BBBの主役は言うまでもなく内皮細胞であり、内皮細胞自身が物理的、機能的なバリアーとして機能していることは確実であるが、生理学的なバリアー機能の維持は内皮細胞のみでは不可能であり、同細胞を取り巻く細胞性、非細胞性構成要素からの絶え間ない“cross-talk”が必須と考えられている。中

図3

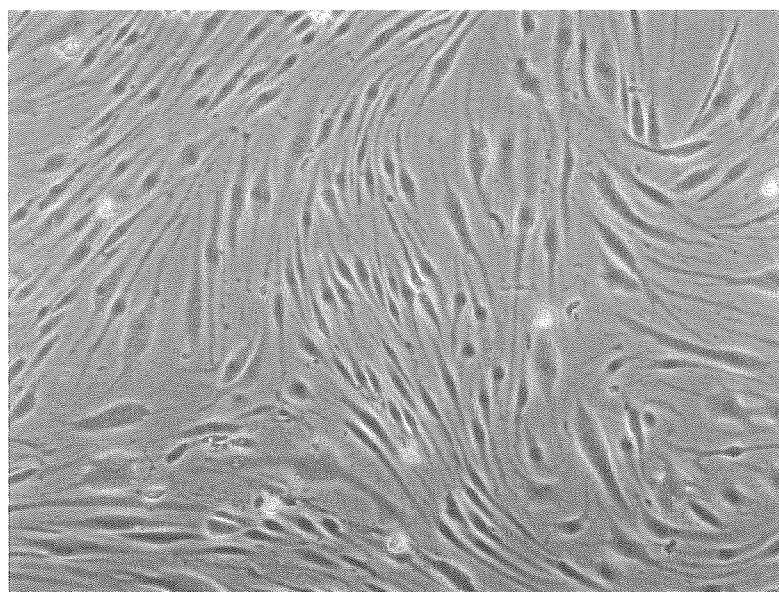


図3 ヒト神経内膜内微小血管由来内皮細胞不死化株。1枚のシートとなつて重畳しない。

でも、アストロサイトは長い間、BBB機能のレギュレーターであると想定されていた。現在でもBBB維持に重要な細胞の一つであるという認識には変わりはない<sup>⑧</sup>が、替わってここ数年、BBBのもう一つの重要なレギュレーターとして脚光を浴びているのがペリサイトである。ペリサイトは血管組織の成熟やBBB生成に必須である<sup>⑨</sup>と考えられていたが、BBB機能にどの程度関与しているかは長い間明らかではなかった。しかし、神経系の微小血管は非神経系の微小血管と比べてペリサイトの数が多いことは従来から指摘されており、ペリサイト：内皮細胞の比は筋肉では1:100、肺では1:10であるのに対し脳や網膜ではほぼ1:1に及ぶという記載がある<sup>⑩</sup>。最近の総説ではヒト BBB では1:3～4とされており<sup>⑪</sup>、いずれにしても神経系はペリサイトが豊富であることは間違いないく、神経系バリアーシステムでのペリサイトの役割は近年急速に注目を集めている。2010年にArmulikら<sup>⑫</sup>は、ペリサイト欠損マウスでBBB構成内皮細胞のtranscytosisを介してBBB透過性亢進がおこっていることを示した。彼らは、BBB構成ペリサイトは内皮細胞に対してはそのBBB特異的遺伝子の発現パターンを変えることで、アストロサイトに対してはend footの極性を変えることでそれぞれBBB機能を調整していると述べている。

BNBにはアストロサイトに相当する細胞が存在しないので、ペリサイトは、BBBにおける場合より

も更に大きなバリアー制御機能を有していることが想定される。我々の教室では、上述のBNB由来内皮細胞と同じく、ラット<sup>⑬</sup>およびヒト(図4)<sup>⑭</sup>BNB由来ペリサイト不死化株の作成に世界に先駆けて成功し<sup>⑮</sup>、(i)ペリサイトのconditioned mediumによってBNB由来内皮細胞株のTEERが上昇して<sup>⑯</sup>14C標識イヌリンの透過性が減少すること、(ii)ペリサイトのcondition mediumは、BNB由来内皮細胞株に対して重要なタイトジャンクション分子であるclaudin-5, occludinの発現を高める作用を有すること、(iii)ペリサイトは、BBBを構成するアストロサイトと同じくangiopoietin-1、VEGF、bFGFなどのサイトカインを分泌すること、(iv) angiopoietin-1とVEGFは内皮細胞のclaudin-5発現をdownregulateし、BNB機能を弱める方向に働くこと、(v) bFGFは逆にclaudin-5の発現をupregulateし、BNB機能を高めること、(vi) ペリサイトはNGF, BDNF, GDNFなどの種々の神経栄養因子を分泌すること等を明らかにした<sup>⑰, ⑱</sup>。BNB構成内皮細胞に最も近接した細胞であるペリサイトがBNBの主要なレギュレーターであることはほぼ間違いないく、現在、我々の教室ではこれらのヒトおよび齧歯類不死化細胞株を用いたBNB機能の解析が進行中である。

図4

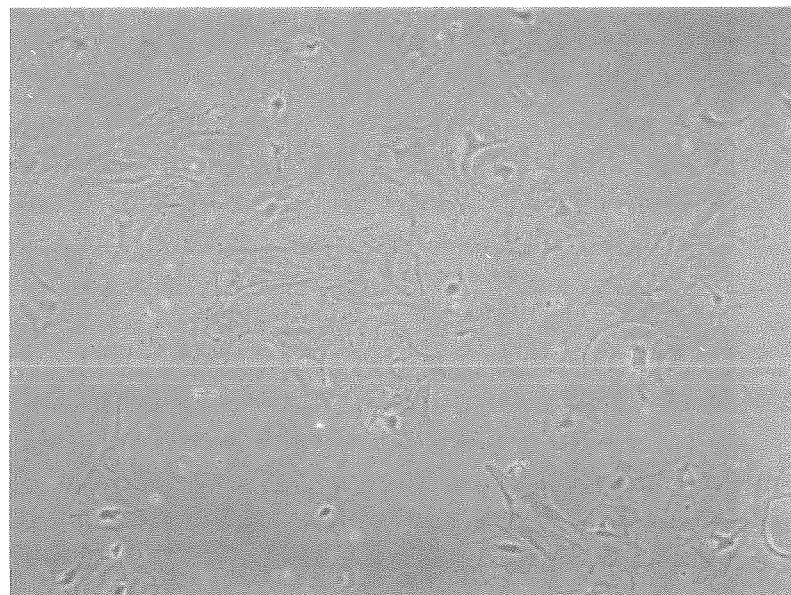


図4 ヒト神経内膜内微小血管由来ペリサイト不死化細胞株。多角の不整形を呈する。

## バリアーが破綻するメカニズムは2種類ある

“バリアー破綻”といふことばで括られる現象は2つの異なるメカニズムから成り立っている。一つは単核球のバリアーを超えた神経実質内への侵入、もう一つはBBB/BNBを構成する内皮細胞間、あるいは神経周膜細胞間のタイトジャンクションの破壊・機能不全を介した液性因子の神経実質内への流入であり、それぞれが独立した分子メカニズムを有している。

### (1) メカニズム1：単核球の神経実質内浸潤

単核球は流血中を高速で移動している。この単核球を内皮細胞表面の局所にとどめ、さらに末梢神経実質内へと移行させるためには、①単核球の移動速度を低下させて内皮細胞表面に“転がる”ようにする(rolling)、②内皮細胞に強固に接着(adhesion)、③内皮細胞上を“這って”遊走可能な場所まで移動する(crawling)、④内皮細胞を超えて神経実質内へ浸潤(migration)、という4つの連続するプロセスが必要となる(図5)<sup>15, 16)</sup>。

この4つのプロセスにはそれぞれ関与する分子が明らかになっており、例えば、①のrollingには、selectinとよばれるレクチン構造を有し、特定の糖鎖リガンドと選択的に結合する分子が主役となることが知られている。内皮細胞側にはE-selectinとP-selectinが、単核球側にはL-selectinが発現し、E-selectinとP-selectinは単核球側の、L-selectin

は内皮細胞側のそれぞれの特異リガンドと結合して、高速で移動する単核球にブレーキをかける働きをする。①で減速した単核球は、続く②adhesionの過程で内皮細胞表面に強固に接着する。BBBではこの過程が最も重要であると考えられており、内皮細胞側に発現するVCAM-1とICAM-1と呼ばれる2つの接着因子が主役となる。単核球側のそれぞれの特異リガンドは、VCAM-1に対してはVLA-4、ICAM-1にはLFA-1、Mac-1が同定されている。VCAM-1、ICAM-1とも炎症性サイトカインなどの刺激によって急激にupregulateされ、単核球の接着に寄与する。

③crawlingの過程にはVLA-4/VCAM-1とLFA-1/ICAM-1、ICAM-2のシステムが、④migrationには、PECAM-1、CD99、IL-8、MCP-1、MMP-9などの複数の分子が関与しているが、①②の過程と比較するとまだよくわかっていないことが多い。なお、④の過程で、白血球は内皮細胞の結合を裂いて内皮細胞間をすり抜けて浸潤する(paracellular migration)と長い間考えられていたが、EAE脳での詳細な検討の結果、細胞浸潤がこのジャンクション部でおこっている像はごくわずかしかなく<sup>17)</sup>、実際には多くの炎症細胞は内皮細胞の胞体を突き抜ける形で浸潤する(transcellular migration<sup>18)</sup>)。つまり、内皮細胞層を通り抜ける単核球の浸潤は、必ずしも内皮細胞間の離開—細胞間バリアーの破綻一を伴わないと理解できる。

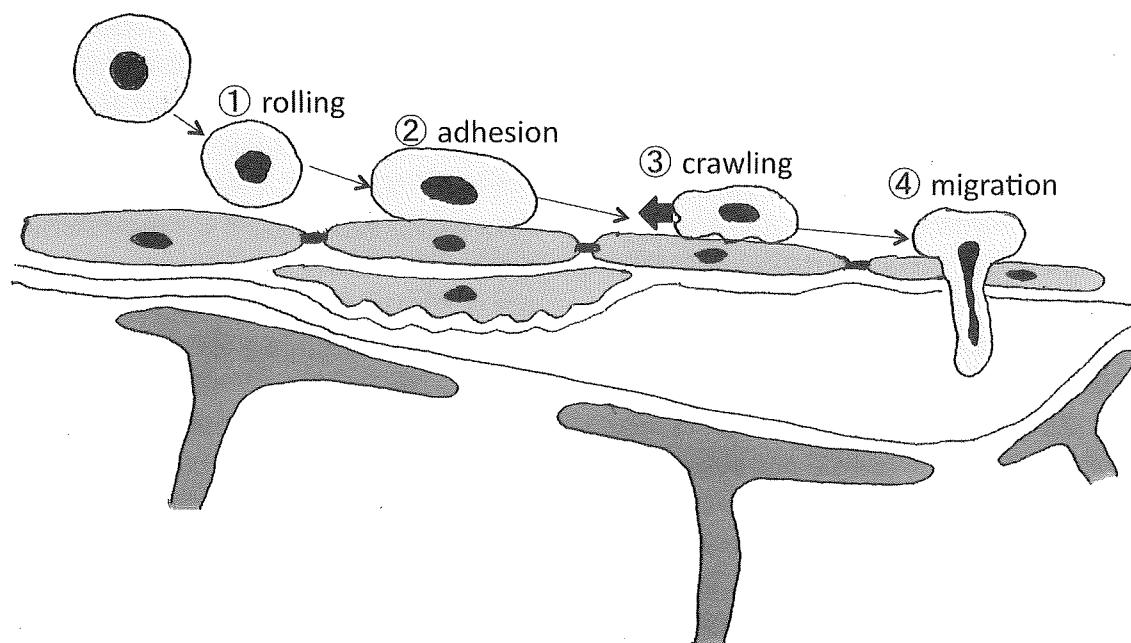


図5 ①rolling、②adhesion、③crawling、④migrationの連続する4つの過程を図示する。詳細は本文参照。

この①—④のプロセスは神経系に特異的なものではなく、全身いずれの血管系の炎症でも観察される現象である。神経系バリアーに特異的な分子過程が発見されれば、将来的により優れた免疫性・炎症性神経疾患治療薬の開発につながる可能性がある。最近発見されたIgGスーパーファミリーに属する分子であるALCAM (activated leukocyte cell adhesion molecule)は、脳内皮細胞特異的にそのdocking structureに局在し、CD4陽性T細胞上に発現しているCD6を介してBBBを越えるT細胞浸潤に関与することが明らかになった<sup>19)</sup>。

単核球の神経実質内への浸潤はいずれの過程をブロックしても阻害されうる<sup>20, 21)</sup>が、最も重要な接着メカニズムであるVCAM-1/VLA-4に関しては、VLA-4に対するモノクロナル抗体であるnatalizumab (商品名Tysabri タイサブリ) はほぼ完全にこの2分子の接着を阻害する<sup>22)</sup>。この薬剤は2010年8月現在、全世界で74,000人を超える多発性硬化症患者に使用され、極めて良好な再発防止効果が観察されている。しかし、VCAM-1/VLA-4という強固な細胞接着システムを完全に無力化することは、神経系に対する正常なimmune surveillance systemも同時に阻止していることも十分に想像される。2010年9月の段階で、全世界で68例(発症リスク1/1,000)の進行性多癡性白質脳症(PML)が同薬使用患者に発症していることは、決して想定外のことではない。

natalizumabは、通常の意味での免疫抑制ではなく、バリアー上の単核球浸潤の抑止によって神経系の自己免疫疾患の治療が行いうることを最初に示した画期的な薬剤であると位置づけることができる。同薬を嚆矢として今後、バリアー関連分子を標的にした薬剤の開発が更に進展することが期待されるが、将来的には、たとえばBBB/BNBを越える正常なimmune surveillanceに関与する単核球には影響を与えないような、より選択性の高い分子標的薬の開発が待たれる。

BBBでは内皮細胞とその基底膜を突き抜けて浸潤した単核球はまず脳脊髄液の灌流する血管周囲腔に至る。ここで、アストロサイトの足突起で囲まれた“第2の”基底膜(グリア限界膜)が炎症細胞の中権神経実質への侵入をコントロールする“非細胞性バリアー”として立ちふさがる。T細胞はグリア限界膜に接着する分子機構を持っておらず<sup>23)</sup>、ここを突き抜けるためにはMMP-2、MMP-9などのプロテアーゼが必要となる。BBBを越えてきた直後の脳炎惹起性T細胞はこれらのプロテアーゼの活性は低いた

め、十分量のMMP-2、MMP-9を獲得するためには血管周囲腔でのMHC class IIを有するAPCとの遭遇により抗原の再呈示を受けなければならない<sup>16)</sup>。

BNBを越えたあとの炎症細胞が末梢神経実質内へ浸潤する過程の詳細は明らかになっていない。しかし、炎症惹起性のT細胞、マクロファージなどがmigrationのプロセスを経て内皮細胞・基底膜を越えて末梢神経実質内へ一旦入ると、これより後には炎症細胞を遮る構造物は末梢神経系には存在しない。この点はBBBと際だった違いであり、一旦炎症が起こった後の末梢神経系の脆弱性の背景をなす解剖学的構造であろうと思われる。炎症細胞の浸潤に焦点を合わせる限り、炎症性ニューロパチーの進展を食い止めるにはBNBを越える以前の段階で何らかの治療介入が必要であることを意味する。

## (2) メカニズム2：液性因子の神経実質内漏出

BBB/BNBを構成する微小血管内皮細胞間には強固なタイトジャンクションが存在し、物質の内皮細胞/内皮細胞間を通じた出入り、すなわちparacellular transportを阻止している。炎症性ニューロパチーではBNBを構成する微小血管内皮細胞相互の接着が十分でない所見が多数みられ<sup>24, 25)</sup>、同症では液性因子の神経実質内への漏出(paracellular transportの亢進)がおこっていることを裏付ける病理形態学的所見である。それでは、この形態学的变化の分子的背景は何であろうか。

タイトジャンクションの分子的実体は近年急速に明らかになってきており、BBBではclaudin familyに属するclaudin-3, claudin-5, claudin-12の3種類のタンパクと、occludinが重要なタイトジャンクション構成分子として重要視されている<sup>26, 27)</sup>。claudin family、occludinとも膜4回貫通ドメインを持ち、N末端とC末端を細胞質内に有する膜タンパクで、両者の間にアミノ酸の相同性はない。claudin familyの中では、claudin-5ノックアウトマウスは分子サイズ選択的にBBB破綻がみられる<sup>28)</sup>ことや、claudin-5の導入により内皮細胞のバリア機能が上昇すること<sup>29)</sup>などから、claudin-5がバリアー機能維持の上で最も重要な分子であると考えられている。筆者らはCIDPで神経内膜内微小血管内皮細胞のclaudin-5の発現が低下していることを明らかにし、炎症性ニューロパチーでのBNB破綻には分子的裏付けがあることを世界に先駆けて報告した<sup>30)</sup>。一方、occludinのない細胞でもタイトジャンクションのstrandsは形成される<sup>31)</sup>こと、occludinノックアウトマウスで、あきらかに

タイトジャンクションの異常があるという証拠はない<sup>32)</sup>ことなどから、occludinはタイトジャンクションの本質を担う分子ではないと言う意見が強い。現時点では、occludinの細胞内ドメインのリン酸化がタイトジャンクション形成に関与し<sup>33)</sup>、内皮細胞間の透過性を調節している<sup>34)</sup>こと、2本の細胞外ループが、細胞内ドメインや膜貫通ドメインと共にparacellularの透過性調節に重要であること<sup>35)</sup>などから、occludinはparacellularの物質透過性を調整する分子であろうと考えられている。

### タイトジャンクション分子の制御機構

VEGFは強力な血管透過性亢進因子であり、近年、POEMS症候群の浮腫や血管腫形成、さらにはニューロパチー増悪に関わることが示唆されている。BBBでは、アストロサイト由来VEGF-Aがclaudin-5やoccludinのdownregulationをきたし<sup>36)</sup>、さらにoccludinに対してはリン酸化によって血管透過性を高める<sup>37)</sup>ことが知られている。このVEGF-Aは、低酸素刺激またはIL-1 $\beta$ などの炎症性サイトカイン投与<sup>38)</sup>によってアストロサイトに誘導されるhypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ )の下流に位置しており、脳血管障害や多発性硬化症急性期でみられるMRI上のBBB破綻(ガドリニウム造影で判定されるparacellularの液性因子漏出)がよく説明できる。脳虚血急性期にはアストロサイトから放出されたMMP-2、MMP-9の活性が増強するが、occludinやclaudin-5はこれらのgelatinaseの基質となるため、タイトジャンクションは酵素作用で直接破壊されてBBB機能障害をきたす<sup>39)</sup>。

このように、液性因子の漏出という第2のバリアー破綻の分子メカニズムは、ほとんどがBBB、とくにアストロサイトとの関連で検証されたものであり、BNBでの分子メカニズムはほとんど解明されていないと言ってよい。しかし、既に述べたように、この数年BBBでもペリサイトがアストロサイトに劣らない機能をもつregulatorであるとする論文が続々と発表されている<sup>40, 41)</sup>。BNBの破綻・修復の分子メカニズム解明は今後、ペリサイトとの関連を中心に大きく展開していくことが期待される。

### おわりに

神経系の感染症や自己免疫性疾患の成立・増悪機序から適切な治療を考える上で、BBBとBNBに関

する知識は欠くことができない。近年の画像診断技術の発達により、バリアーの“破綻”は目に見える形で臨床家に呈示されるようになっており、臨床カンファレンス等でバリアー破綻が論じられる機会も増えてきたように思われる。BBB/BNBの破綻と修復は確固たる分子的背景を持つプロセスであり、その全貌の解明は炎症性・自己免疫性神経疾患の新たな治療法の展開に大きなインパクトを与えるものである。このフィールドへの神経系の若手臨床家、研究者のさらなる参入を期待したい。

### 文 献

- Poduslo JF, Curran GL, Berg CT. Macromolecular permeability across the blood-nerve and blood-brain barriers. . Proc Natl Acad Sci USA. 1994;91:5705-9.
- 神田 隆. 血液神経関門Update. Brain and Nerve. 2011;63:557-569.
- Kanda T, Iwasaki T, Yamawaki M, Ikeda K. Isolation and culture of bovine endothelial cells of endoneurial origin. . J Neurosci Res. 1997;49:769-77.
- Kanda T, Iwasaki T, Yamawaki M, Tai T, Mizusawa H. Anti-GM1 antibody facilitates leakage in an in vitro blood-nerve barrier model. Neurology. 2000;55:585-7.
- Kanda T, Yamawaki M, Mizusawa H. Sera from Guillain-Barré patients enhance leakage in blood-nerve barrier model. Neurology. 2003;60:301-6.
- Sano Y, Shimizu F, Nakayama H, Abe M, Maeda T, Ohtsuki S, et al. Endothelial cells constituting blood-nerve barrier have highly specialized characteristics as barrier-forming cells. Cell Struct Funct. 2007;32:139-47.
- Sano Y, Kanda T. Isolation and properties of endothelial cells forming the blood-nerve barrier. Methods Mol Biol. 2011;686:417-25.
- Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. Nat Rev Neurosci. 2006 Jan;7(1):41-53.
- Lindahl P, Johansson BR, Leveen P, Betsholtz C. Pericyte loss and

- microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science*. 1997 Jul 11;277(5323):242-5.
10. Shepro D, Morel N. Pericyte physiology. *FASEB J*. 1993;7:1031-8.
  11. Dore-Duffy P, Cleary K. Morphology and properties of pericytes. *Methods Mol Biol*. 2011;686:49-68.
  12. Armulik A, Genove G, Mae M, Nisancioglu MH, Wallgard E, Niaudet C, et al. Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature*. 2010 Nov 25;468(7323):557-61.
  13. Shimizu F, Sano Y, Maeda T, Abe M, Nakayama H, Takahashi R, et al. Peripheral nerve pericytes originating from the blood-nerve barrier expresses tight junctional molecules and transporters as barrier-forming cells. *J Cell Physiol*. 2008;217:388-99.
  14. Shimizu F, Sano Y, Abe M, Maeda T, Ohtsuki S, Terasaki T, et al. Peripheral nerve pericytes modify blood-nerve barrier function and tight junctional molecules through the secretion of various soluble factors. *J Cell Physiol*. 2011;226(1):255-66.
  15. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*. 2007 Sep;7(9):678-89.
  16. Engelhardt B. T cell migration into the central nervous system during health and disease: Different molecular keys allow access to different central nervous system compartments. *Clin Exp Neuroimmunol*. 2010;1:79-93.
  17. Cross AH, Raine CS. Central nervous system endothelial cell-polymorphonuclear cell interactions during autoimmune demyelination. *Am J Pathol*. 1991 Dec;139(6):1401-9.
  18. Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Engelhardt B. Diapedesis of mononuclear cells across cerebral venules during experimental autoimmune encephalomyelitis leaves tight junctions intact. *Acta Neuropathol*. 2005 Feb;109(2):181-90.
  19. Cayrol R, Wosik K, Berard JL, Dodelet-Devillers A, Ifergan I, Kebir H, et al. Activated leukocyte cell adhesion molecule promotes leukocyte trafficking into the central nervous system. *Nat Immunol*. 2008 Feb;9(2):137-45.
  20. Kanda T, Yamawaki M, Ariga T, Yu R. Interleukin 1 beta up-regulates the expression of sulfoglucuronosyl paragloboside, a ligand for L-selectin, in brain microvascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92:7897-901.
  21. Wong D, Prameya R, Dorovini-Zis K. In vitro adhesion and migration of T lymphocytes across monolayers of human microvessel endothelial cells: regulation by ICAM-1, VCAM-1, E-selectin and PECAM-1. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1999;58:138-52.
  22. Warnke C, Menge T, Hartung HP, Racke MK, Cravens PD, Bennett JL, et al. Natalizumab and progressive multifocal leukoencephalopathy: what are the causal factors and can it be avoided? *Arch Neurol*. 2010 Aug;67(8):923-30.
  23. Sixt M, Engelhardt B, Pausch F, Hallmann R, Wendler O, Sorokin LM. Endothelial cell laminin isoforms, laminins 8 and 10, play decisive roles in T cell recruitment across the blood-brain barrier in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Cell Biol*. 2001 May 28;153(5):933-46.
  24. Kanda T, Usui S, Beppu H, Miyamoto K, Yamawaki M, Oda M. Blood-nerve barrier in IgM paraproteinemic neuropathy: a clinicopathologic assessment. *Acta Neuropathol*. 1998;95:184-92.
  25. Kanda T, Yamawaki M, Iwasaki T, Mizusawa H. Glycosphingolipid antibodies and blood-nerve barrier in autoimmune demyelinative neuropathy. *Neurology*. 2000;54:1459-64.
  26. Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yoneyama S, Tsukita S, et al. Occludin: a novel integral membrane protein

- localizing at tight junctions. *J Cell Biol.* 1993;123:1777-88.
27. Morita K, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96:511-6.
28. Nitta T, Hata M, Gotoh S, Seo Y, Sasaki H, Hashimoto N, et al. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5 deficient mice. *J Cell Biol.* 2003;161:653-60.
29. Ohtsuki S, Sato S, Yamaguchi H, Kamoi M, Asashima T, Terasaki T. Exogenous expression of claudin-5 induces barrier properties in cultured rat brain capillary endothelial cells. *J Cell Physiol.* 2007;210:81-6.
30. Kanda T, Numata Y, Mizusawa H. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: decreased claudin-5 and relocated ZO-1. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2004;75:765-9.
31. Saitou M, Fujimoto K, Doi Y, Itoh M, Fujimoto T, Furuse M, et al. Occludin-deficient embryonic stem cell can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J Cell Biol.* 1998;141:397-408.
32. Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke J, Fromm M, Takano H, et al. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell.* 2000;11:4131-42.
33. Sakakibara A, Furuse M, Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Tsukita S. Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. *J Cell Biol.* 1997;137:1393-401.
34. Hirase T, Kawashima S, Wong E, Ueyama T, Rikitake Y, Tsukita S, et al. Regulation of tight junction permeability and occludin phosphorylation by Rhoa-p160ROCK-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem.* 2001;276:10423-31.
35. Balda M, Flores-Maldonado C, Cereijido M, Matter K. Multiple domains of occludin are involved in the regulation of paracellular permeability. *J Cell Biochem.* 2000;78:85-96.
36. Argaw A, Gurfein B, Zhang Y, Zameer A, John G. VEGF-mediated disruption of endothelial CLN-5 promotes blood-brain barrier breakdown. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106:1977-82.
37. Antonetti D, Barber A, Hollinger L, EB W, Gardner T. Vascular endothelial growth factor induces rapid phosphorylation of tight junction proteins occludin and zonula occluden 1. A potential mechanism for vascular permeability in diabetic retinopathy and tumors. *J Biol Chem.* 1999;274:23463-7.
38. Argaw A, Zhang Y, Snyder B, Zhao M, Kopp N, Lee S, et al. IL-1beta regulates blood-brain barrier permeability via reactivation of the hypoxia-angiogenesis program. *J Immunol.* 2006;177:5574-84.
39. Yang Y, Estrada E, Thompson J, Liu W, Rosenberg G. Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007;27:697-709.
40. Fisher M. Pericyte signaling in the neurovascular unit. *Stroke.* 2009 Mar;40(3 Suppl):S13-5.
41. Bell RD, Winkler EA, Sagare AP, Singh I, LaRue B, Deane R, et al. Pericytes control key neurovascular functions and neuronal phenotype in the adult brain and during brain aging. *Neuron.* 2010 Nov 4;68(3):409-27.

## 〈シンポジウム2〉神経系の浮腫と細胞死

## 脳炎と興奮毒性、細胞傷害性T細胞

高橋幸利<sup>1,2</sup>・山崎悦子<sup>1</sup>・最上友紀子<sup>1</sup>  
高尾恵美子<sup>1</sup>・笠井理沙<sup>1</sup>・西村成子<sup>1</sup>

【要旨】非ヘルペス性急性辺縁系脳炎(non-herpetic acute limbic encephalitis, NHALE)とRasmussen症候群で、神経細胞死のメカニズムを検討した。NHALEでは髄液グルタミン酸が10倍程度増加し興奮毒性が関与している可能性を見出した。抗NMDA型GluR抗体はアポトーシスを抑制し脳を保護し、比較的良い予後に貢献している可能性がある。Rasmussen症候群の神経細胞死には、感染により活性化された細胞傷害性T細胞がNMDA型GluRなどの神経分子を認識し、アポトーシスを誘導することが分かった。

Key words: NMDA型グルタミン酸受容体(NMDA-type Glutamate receptor)

GluR ε (NR2B), GluR ζ1 (NR1)

非ヘルペス性急性辺縁系脳炎 (nonherpetic acute limbic encephalitis)

Rasmussen症候群 (Rasmussen syndrome)

## 【はじめに】

脳炎・脳症は感染を契機とするものが多いが、それらはウィルスの中権神経系への直接侵襲による狭義の脳炎=1次性脳炎<sup>1)</sup>と、気道感染等に伴って駆動された免疫反応によって脳炎症状が起こる2次性脳炎(脳症)に分類される(表1)<sup>2)</sup>。2次性脳炎(脳症)は、ウィルス感染時(あるいはその直後)に脳炎症状を示すが、髄液中のウィルスPCR検査あるいは剖検脳組織解析によりウィルスの中権神経系直接浸襲が否定される症例である。

脳炎などの神経感染症の病態解明、治療法開発を考える上で、神経細胞死は重要な問題である。1次性脳炎では主にウィルスが神経細胞に直接侵入し神経細胞死を起こすと考えられるが、2次性脳炎ではどのような機序で神経細胞死を来しているのであろうか?。

ウィルス感染で先ず始めに駆動される免疫は自然免疫(先天免疫)(innate immunity)で、マクロファージなどの食細胞、Natural killer cell(NK細胞)、補体などが中心的役割を担っていて、感染局所で抗

原非特異的に働いている(図1)。侵入したウィルスのDNAなどはToll like receptor 9 (TLR9)に、ウイルス膜タンパクはTLR4に結合し自然免疫が駆動され、抗ウイルス作用のあるI型インターフェロン(IFN-α, IFN-β)や、炎症性サイトカインのTumor necrosis factor α (TNF α)などの分泌が誘導される。マクロファージの分泌するIL-12はNK細胞を活性化し、細胞傷害性T細胞と同じような機序で感染細胞をアポトーシスに導き、TNF αは血管内皮を活性化したり発熱をもたらしたりする。TNF αにより感染局所のリンパ流が増大すると、抗原と抗原提示細胞である樹状細胞がリンパ流に乗ってリンパ組織に到達、抗原特異的なイーブT細胞をエフェクター化し、獲得免疫が駆動される。抗原特異的エフェクターT細胞は抗原特異的B細胞を活性化し、抗体産生を誘導する。

感染免疫の関与が示唆される2次性脳炎(脳症)をその発病時期で分類すると、①発熱などの感染症状とほぼ同時に脳炎症状が出現するもの(インフルエンザ脳症など)、②発熱などの感染症状出現から約1週間で脳炎症状が出現するもの(非ヘルペ

1 国立病院機構 静岡てんかん・神経医療センター(〒420-8688 静岡市葵区漆山886)

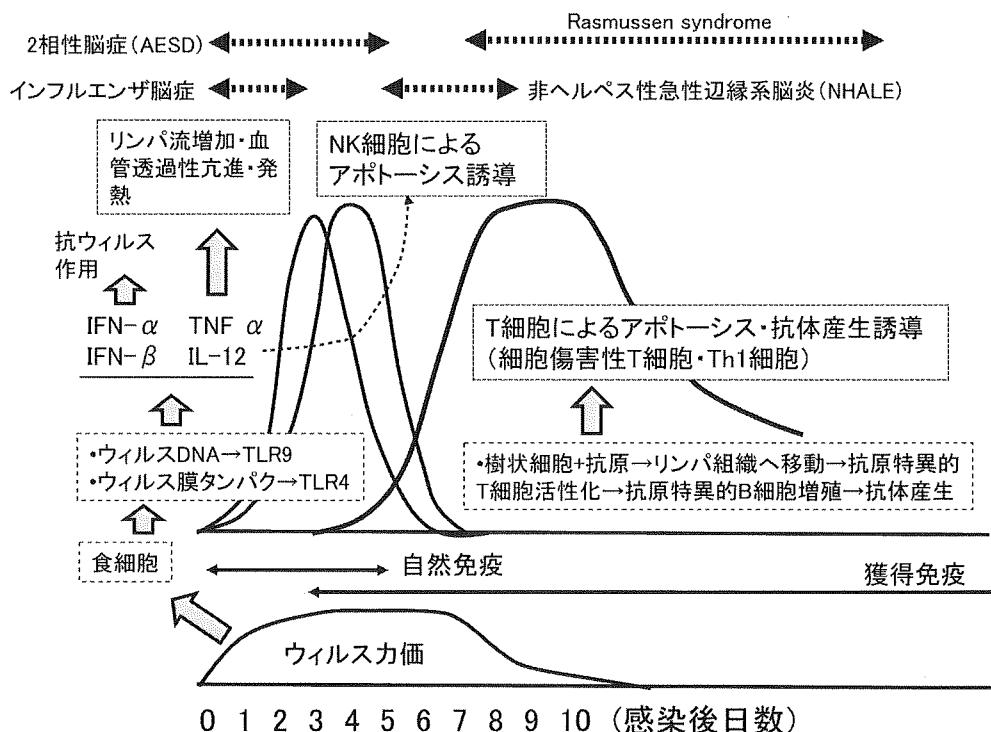
2 岐阜大学医学部小児病態学

ス性急性辺縁系脳炎 (non-herpetic acute limbic encephalitis, NHALE) など)、③発熱などの感染症状出現から約2週間でてんかん発作症状が出現するもの (Rasmussen症候群など)、④感染終息後潜伏感染し、色々な時期に再活性化により脳炎症状が出現するもの (幹細胞移植後辺縁系脳炎など) がある (図1、表1)<sup>2)</sup>。

①の感染症状とほぼ同時に脳炎症状が出現するものは、時期的には自然免疫の作用する時期であり、TNF $\alpha$ などのマクロファージ産生サイトカインやNK細胞の、発病・神経細胞死への関与が想定される。②③ではT細胞依存的な獲得免疫が駆動される時期であり、抗原特異的T細胞や特異抗体が関与する神経細胞死病態が推定される。

グルタミン酸受容体 (GluR) は神経伝達物質であるグルタミン酸の受容体で興奮毒性にも関与している。GluRにはイオンチャネル型と代謝型が存在、イオンチャネル型GluRは薬理学的にN-methyl-D-aspartate (NMDA) 型とnon NMDA型に分類さ

れ、後者はalpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) 型とカイニン酸型に分類される<sup>3,4)</sup>。NMDA型GluRは、必須となるGluR $\zeta$ 1 (NR1) と、GluR $\epsilon$ 1-4 (NR2A-2D) あるいはGluR $\chi$ 1-2 (NR3A-3B) といったサブユニットが4つ会合した4量体 (複合体) 構造をとり、イオンチャネルとして機能しているが、種々のサブユニット会合パターンがあるとされている<sup>5,6)</sup>。GluRの生理的機能は多岐に渡り、さらに中枢神経系疾患の病態にもGluRは深く関与している<sup>7)</sup>。NMDA型GluRが中枢神経系疾患の病態に関与する機構には種々の病態が知られ、虚血性脳梗塞などに見られる①NMDA型GluRの興奮毒性による関与、てんかんなどで見られる②NMDA型GluR発現量変化による関与、非ヘルペス性辺縁系脳炎などに見られる③NMDA型GluRに対する自己抗体による関与、Rasmussen症候群などに見られるNMDA型GluR発現細胞が④細胞傷害性T細胞のターゲットとなる場合などである<sup>6)</sup>。



免疫生物学-免疫系の正常と病理-原書第5版-笹月健彦監訳、p83、南江堂 を改変

図1. ウィルス感染免疫と脳炎・脳症

ウィルス感染後に駆動される免疫機構を示す。NK細胞、Natural killer cell; TLR、Toll like receptor; IFN、インターフェロン; TNF $\alpha$ 、Tumor necrosis factor $\alpha$ ; IL-12、interleukin-12; AESD、Acute encephalopathy with prolonged febrile seizures and late reduced diffusion.

表1. 脳炎の病態分類と原因ウィルス・脳炎診断

分類	原因ウィルス・脳炎診断
1 次性脳炎	
1. 血行感染	<ul style="list-style-type: none"> <li>● ムンプス・ポリオ・エンテロウィルスなど</li> <li>● HSV(新生児)</li> </ul>
2. 末梢神経を上行	● HSV・VZV・狂犬病ウィルスなど
2 次性脳炎	
1. サイトカインによる傷害	<ul style="list-style-type: none"> <li>● インフルエンザ脳症</li> <li>● HIV 脳症など</li> </ul>
2. 細胞表面抗原に対する自己抗体による傷害	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 非ヘルペス性急性辺縁系脳炎(抗 NMDA 型 GluR 抗体、抗 VGKC 抗体など)</li> <li>● 卵巣奇形腫合併急性辺縁系脳炎(抗 NMDA 型 GluR 抗体など)</li> <li>● Bickerstaff 型脳幹脳炎(抗 GQ1 b 抗体など)</li> <li>● 傍腫瘍性辺縁系脳炎(抗 AMPA 型 GluR 抗体、抗 VGKC 抗体など)</li> <li>● 橋本脳症(抗 NAE 抗体など)</li> </ul>
3. 細胞内抗原に対する自己抗体による傷害?	● 傍腫瘍性辺縁系脳炎?(抗 Hu 抗体など)
4. 細胞傷害性 T 細胞による傷害	● Rasmussen 症候群、傍腫瘍性辺縁系脳炎?
5. 不明、その他	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 2 相性脳症(グルタミン酸興奮毒性?)</li> <li>● ADEM</li> </ul>

HSV, Herpes simplex virus; VZV, Varicella zoster virus; HIV, Human immunodeficiency virus; NMDA, N-methyl-D-aspartic acid; GluR, glutamate receptor; NAE, N-terminal of  $\alpha$ -enolase; AMPA,  $\alpha$ -amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate; ADEM, Acute disseminated encephalomyelitis.

### 【目的】

2次性脳炎(脳症)の神経細胞死のメカニズムを明らかにし、治療法の開発につなげるために、NHALEでのNMDA型GluRを介した興奮毒性と、Rasmussen症候群での細胞傷害性T細胞による細胞死を検討した。

### 【対象】

対象のNHALEは、①明らかな意識障害出現前の急性期初期に、②辺縁系症状(精神症状、記憶障害、見当識障害、感情障害)<sup>2)</sup>の何れかひとつを示し、③その後、意識障害などの脳炎症状が急性に経過した症例で、④腫瘍・膠原病合併例、再発例、慢性例、インフルエンザ脳症、単純ヘルペスウィルスPCR陽性例などを除く、成人27例、小児14例で、その血清および髄液を用いた。

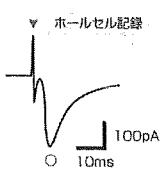
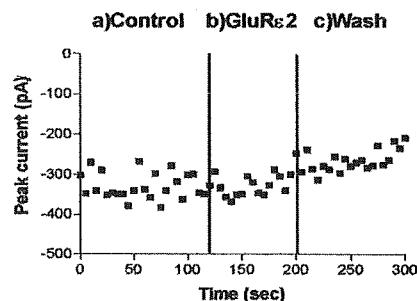
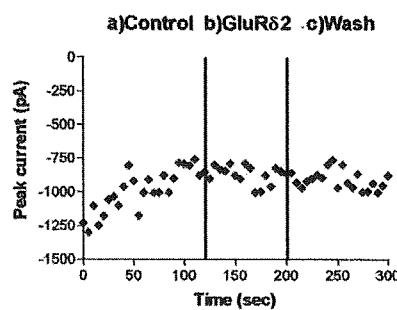
Rasmussen症候群は、臨床、脳波、画像、組織所見からBienらの診断基準<sup>3)</sup>に合致する27症例を対象として、その髄液、CD8<sup>+</sup>T細胞を用いた(検査時年齢平均7.5±5.6歳)。

### 【方法】

1. グルタミン酸濃度: グルタミン酸濃度は、L-グルタミン酸オキシダーゼを用いたヤマサL-グルタミン酸測定キット(Code No.7171)用いて測定した。
2. パッチクランプ法: IgG分画の興奮性シナプス後電流(excitatory postsynaptic current, EPSC)への影響について、ラット海馬スライス標本を用いてパッチクランプ法で検討した(図2)<sup>9)</sup>。ラット海馬スライス標本(14-16 days、厚さ300 μm)を作成し、CA1野の錐体細胞よりパッチ電極でwhole cellの電流記録を行った。膜電位は-70 mVに固定し、CA3野の放線状層に置かれた刺激電極から単発刺激を加えEPSCを記録した(人工脳脊髄液には10 μM CNQX, 10 μM Bicucullineを加え、かつlow-Mg<sup>2+</sup>(Mg<sup>2+</sup> 1 mM) solutionにしてEPSCをNMDA成分のみとした)。記録は5秒に一回、120秒から200秒までバスに抗体を流し、wash outして300秒までEPSCを連続記録した。
3. DNAラダー形成によるアポトーシス検出: イムノプロット法抗GluR ε 2抗体陽性髄液からEcono-Pac Serum IgG purification Kit(BioRad)を用い

## A. Methods

- Rat hippocampal slice
- Whole cell recording
- Membrane potential: -70mV
- CA3-single stimulation
- Ab: bath application
- Artificial CSF  
(CNQX・Bicuculline・low Mg<sup>2+</sup>)

B. GluR $\epsilon$ 2-N terminal Ab (rabbit)C. GluR $\delta$ 2-N terminal Ab (rabbit)

## D. Patient IgG fraction

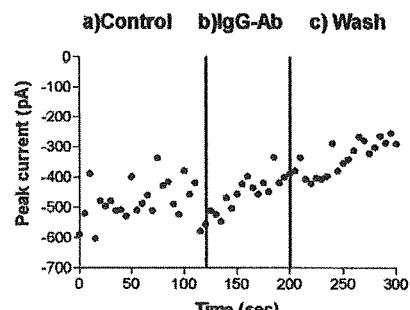


図2. 抗GluR抗体のラット海馬スライスにおけるEPSCのNMDA電流への影響

Aは測定条件を示す。BはGluR $\epsilon$ 2-N末抗体（ウサギ由来）投与前、バス投与中、wash out後のEPSCの連続記録を示す。CはGluR $\delta$ 2-N末抗体の投与前・バス投与中、wash out後のEPSCの連続記録を示す。Dは抗GluR $\epsilon$ 2抗体陽性Rasmussen症候群の患者血清由来IgG抗体の投与前・バス投与中、wash out後のEPSCの連続記録を示す。

てIgG分画を抽出し、ラット胎児由来培養神経細胞に加え、ApopLadder EX（タカラバイオMK600）にてDNAを抽出し、アポトーシスの指標であるDNAラダー形成を、Agilent 2100 バイオアナライザを用いて検討した。

4. Granzyme B濃度：モノクローナル抗体とStreptavidin-HRPを用いたELISA kit (Cat. No. KT-078, KAMIYA BIOMEDICAL COMPANY, Seattle WA, USA)により測定した。

5. ELISPotによるリンパ球Granzyme B分泌解析：患者および対照のヘパリン血中の末梢血単核球(PBMC)からCD8+T細胞をマイクロビーズ法により分離し、患者HLA class I supertype毎に種々の合成ペプチドを用いて刺激培養し、Enzyme-linked immunosorbent spot assay(ELISPot)法によりGranzyme B分泌を検討した<sup>10)</sup>。発色した膜をELISPot readerで読み取り、Mean concentration of spots (MCS)、Number of spotsを求め、MCS

$\times$  number of spots = S-GrBの値でGranzyme Bの分泌量を推定する。各ペプチドのGranzyme B分泌刺激力の程度は、ペプチドを加えない場合を陰性対照(NC)とし、Stimulation Index (SI) = (ペプチド刺激によるS-GrB - NCのS-GrB) / NCのS-GrB  $\times$  100により比較した。SIが大きいほど、一定量の抗原刺激を一定量のCD8+T細胞に加えたときのGranzyme B分泌が多いことになる。SI > 50となるペプチドを分泌刺激となるペプチド、SI < -50となるペプチドを分泌抑制するペプチドと判定した。

## 【結果】

## 1. グルタミン酸濃度

血清グルタミン酸濃度 ( $\mu$  mol/l) (平均  $\pm$  SD) は、NHALE成人  $449.7 \pm 141.0$  (N=27)、NHALE小児  $285.2 \pm 105.6$  (N=14)、対照  $304.6 \pm 118.5$  (N=27) で、成人は対照 (Mann Whitney test,  $p=0.0002$ )、

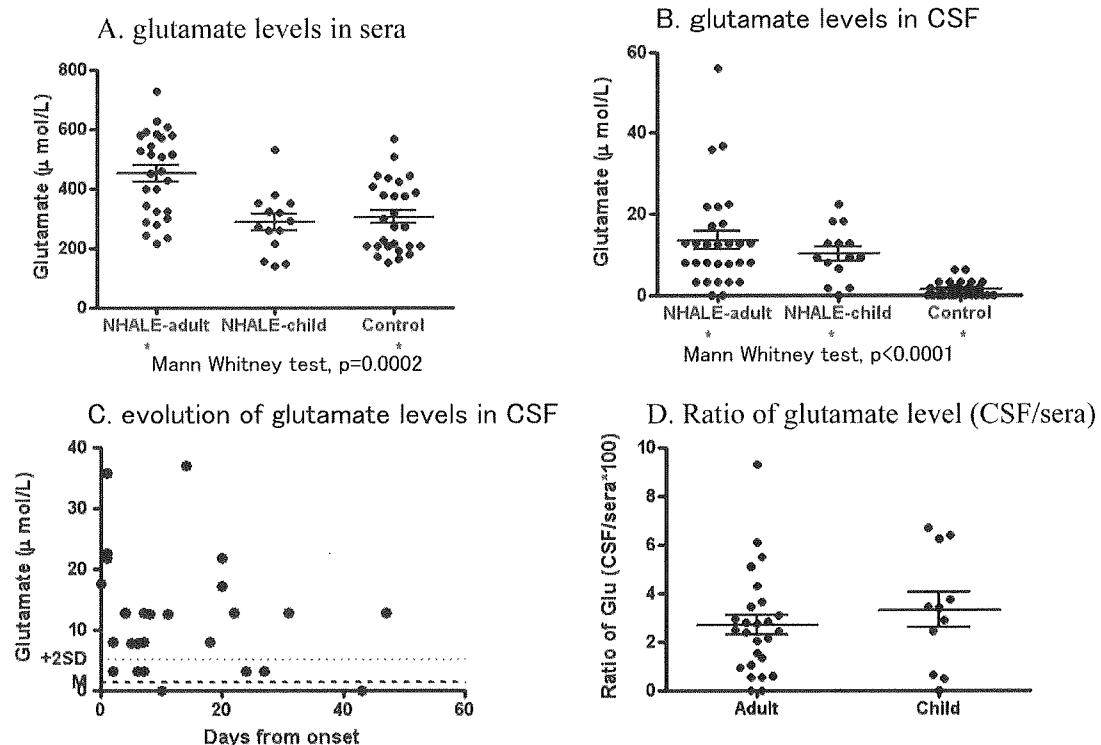


図3. 非ヘルペス性辺縁系脳炎(NHALE)におけるグルタミン酸濃度

A.NHALEにおける血清グルタミン酸濃度、B.NHALEにおける髄液グルタミン酸濃度、C.成人NHALE症例の髄液グルタミン酸濃度の脳炎発病後の日数との関係を示す、D.髄液グルタミン酸濃度と血清グルタミン酸濃度の比を示す。

小児(Mann Whitney test,  $p=0.0014$ )に比べて高値であった(図3)。成人小児NHALEどちらも、脳炎発病後の経時的变化は明らかではなかった。

髄液グルタミン酸濃度(平均 $\pm$ SD)は、NHALE成人 $13.44 \pm 12.29$ ( $N=29$ )、NHALE小児 $10.20 \pm 6.64$ ( $N=14$ )、疾病対照 $1.39 \pm 1.90$ ( $N=27$ )で、成人、小児ともに対照に比べて高値であった(Mann Whitney test,  $p < 0.0001$ )。NHALE成人小児どちらも、脳炎発病後20日以内に高値の症例が多くかった。

グルタミン酸濃度の髄液/血清比(髄液/血清 $\times 100$ )はばらつきが大きいが、脳炎発病後20日以内に高値の症例が多かった。

## 2. 抗GluR $\varepsilon$ 2抗体の興奮性シナプス後電流(EPSC)への影響

ウサギ由来のGluR  $\varepsilon$  2-N末側に対する抗体を、120秒から200秒までバスに投与したが、NMDA成分のみと考えられるEPSCの振幅に有意な変化は

見られなかった(図2)。また、GluR  $\delta$  2-N末側抗体、アフィニティカラムにて精製した抗GluR  $\varepsilon$  2抗体陽性Rasmussen症候群患者血清のIgG分画を流したときもこの条件では振幅に有意な変化はなかった。更なる実験が必要ではあるが、今までのところ抗GluR3抗体とは異なり、抗GluR  $\varepsilon$  2抗体には明らかなNMDA電流に対する電気生理学的作用を見出せていない。

## 3. アポトーシス

ラット培養神経細胞にstaurosporineを加えると、DNAラダー形成が起こり、inhibitorにより抑制された。NHALE5例の抗GluR  $\varepsilon$  2抗体陽性髄液のIgG分画を加えると、対照に比べてラダー形成が抑制された。

## 4. Granzyme B

Rasmussen症候群患者髄液では $10.8 \pm 15.5$  pg/ml( $n=18$ ) (平均 $\pm$ SD)で、疾病対照髄液の $1.2 \pm 1.2$  pg/ml( $n=13$ )に比べて高値であった

(Mann-Whitney's U test,  $p < 0.01$ ) (図4)。

Granzyme B は経過との関係でみると急性期に極めて高値で、慢性期には低下するが経度上昇した値が続く。

#### 5. Rasmussen症候群患者 CD8<sup>+</sup>T細胞のペプチド刺激 Granzyme B 分泌

Rasmussen症候群の急性期・進行期患者7例中5例の血液中に、GluR ε 1-4 (NR2A-2D) のアミノ酸配列保存領域由来ペプチドを認識して Granzyme B を分泌する CD8<sup>+</sup>T細胞が存在した (図5)。

#### 【考察】

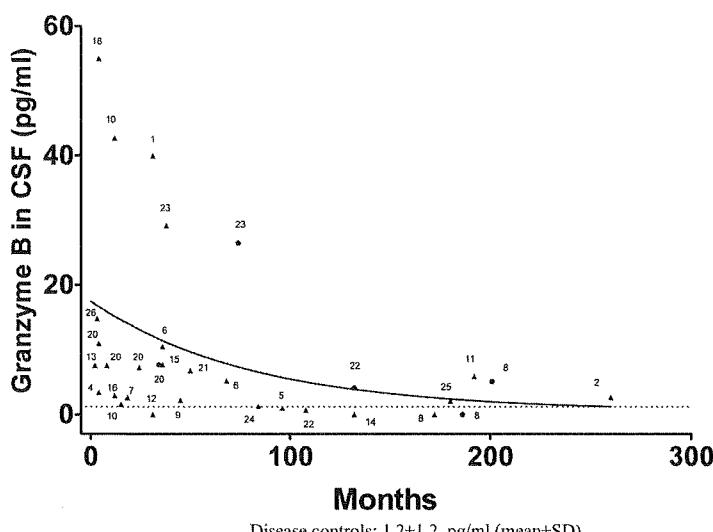
NHALEでの神經病理学的研究では海馬扁桃体に局在性微小炎症像が散在し、神經細胞貪食と神經細胞減少、マクロファージやミクログリアやアストロサイトの増生、CD4<sup>+</sup>T細胞より CD8<sup>+</sup>T細胞の増加が報告されている<sup>11)</sup>。よって貪食あるいは細胞死による神經細胞減少が起こっている可能性が大きい。

NMDA型 GluR 興奮毒性を介した NHALEでの細胞死の誘導機構としては、グルタミン酸による刺激、IL-1 $\beta$ による刺激<sup>12)</sup>、抗NMDA型 GluR抗体による刺激などが考えられる (図6)。

グルタミン酸濃度は NHALEの髄液中で疾病対照に比べて有意に高値で、約十倍に上昇、急性期20日までに高値の症例が存在した。髄液の多くは脈絡叢由来で、一部がシナプス間隙など脳内の間質液由来である。よって髄液中のグルタミン酸濃度が上昇していればそれ以上にシナプス間隙のグルタミン酸濃度は上昇しているものと推定される。このグルタミン酸濃度上昇は、NMDA型 GluR 興奮毒性を誘導し得るものと思われる。増加するグルタミン酸の由来は、髄液/血清のグルタミン酸比がかなり幅広いことから、血液脳関門破綻で血清中から流入する症例と、脳内ニュウロンの障害でシナプス前などのグルタミン酸プール<sup>13)</sup>からの流入等が考えられる。

抗NMDA型 GluR抗体による NMDA型 GluR 刺激による興奮毒性の可能性は、抗GluR ε 2抗体の興奮性シナプス後電流 (EPSC)への影響をパッチクランプで見いだせなかったこと、NHALEの抗NMDA型 GluR抗体によるDNAラダー形成でもアポトーシスを誘導せず、むしろ自然なアポトーシスを抑制したことから、可能性は少ないと思われる。Dalmauらは抗NMDA型 GluR抗体がNMDA型 GluRを内在化(internalization)させることを報告していて<sup>14)</sup>、抗体がNMDA型 GluRに拮抗作用を

A. granzyme B levels in CSF and evolution



B. granzyme B levels in CSF

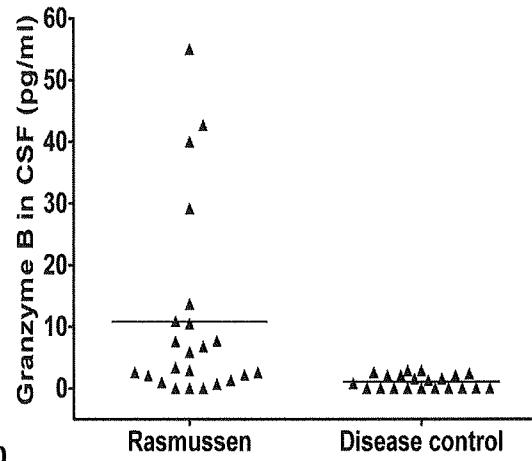


図4. Rasmussen症候群髄液のGranzyme B

A、Rasmussen症候群発病後の月数を横軸に示す。番号は文献17の症例を示す。

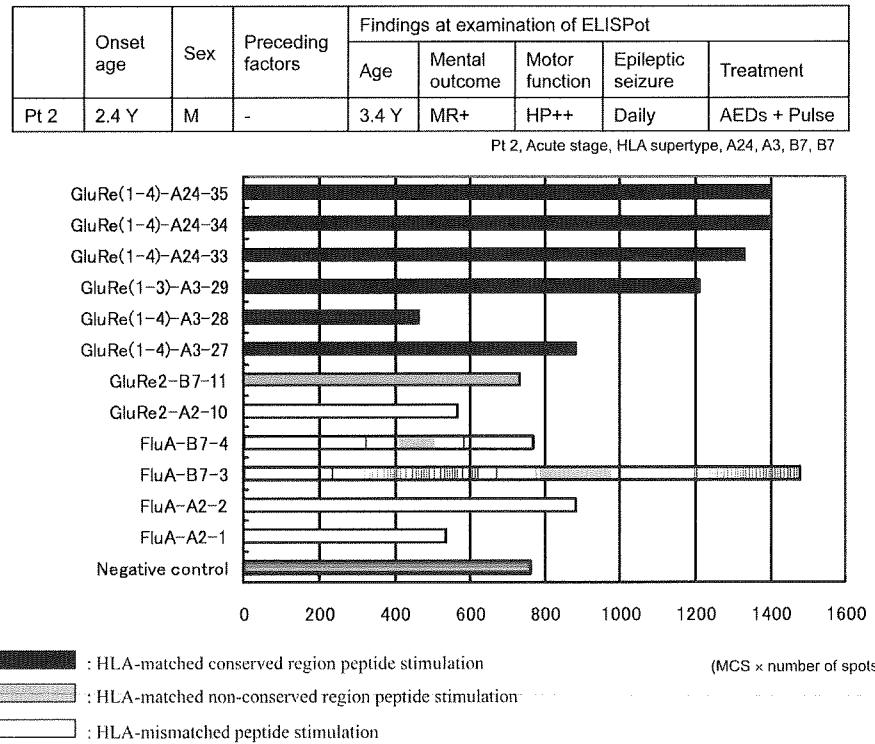


図5. Rasmussen症候群患者CD8<sup>+</sup>T細胞のペプチド刺激Granzyme B分泌

横軸はELISPOT readerにて測定したS-GrB = MCS × number of spotsを示す。グラフの左は刺激に用いたペプチドを示す。GluRe(1-4)-A24-35は、NMDA型GluRのGluR ε 1 - ε 4 (NR2A-2D)に共通した保存配列ペプチドで、A24-supertypeのHLAに結合できるもので、文献10表3における35番のペプチドであることを示す。GluRe2-B7-11は、NMDA型GluRのGluR ε 2 (NR2B)にのみみられるペプチドで、B7-supertypeのHLAに結合できるもので、文献10の表3における11番のペプチドであることを示す。FluA-B7-4は、インフルエンザA由来のペプチドで、B7-supertypeのHLAに結合できるもので、文献10表3における4番のペプチドであることを示す。Negative controlはペプチドを加えない条件でのS-GrBを示す。

示すことになり、興奮毒性を誘導していないことを支持する。抗GluR ε 2抗体を含む抗NMDA型グルタミン酸受容体抗体は、NMDA型グルタミン酸受容体の内在化によりNMDA型GluR興奮毒性を抑制し、NHALEの比較的良好な予後に寄与している可能性がある。

NHALEでの細胞死・細胞機能抑制のメカニズムは、前述のグルタミン酸以外に、サイトカイン、FASや細胞傷害性T細胞などの関与、さらにはNMDA型GluRからのpro-survival signaling<sup>15)</sup>の抑制などについても今後検討する予定である。

Rasmussen症候群(脳炎)の神経病理学的研究では、細胞傷害性T細胞が脳に増殖浸潤していること、細胞傷害性T細胞から分泌されるGranzyme Bによりアポトーシスが神経細胞に起こっていることが明らかになっている<sup>16)</sup>。

我々はRasmussen症候群患者のGranzyme

Bの血清・髄液中での測定を行った。血清中のGranzyme Bは、本症候群：2.53 ± 5.48 pg/ml (n=8)、疾病対照：0.56 ± 0.89 pg/ml (n=14)、正常対照：1.27 ± 2.48 pg/ml (n=14)で、有意差は認めなかった。髄液中のGranzyme Bは、本症候群は疾病対照に比べて有意に高値で、急性期に著増していた<sup>17)</sup>。血清中ではなく髄液中でGranzyme Bが有意に高値であることから、中枢神経系内に進入した細胞傷害性T細胞が、HLA class I抗原と同時に何らかの中枢神経系内抗原を認識してGranzyme Bを分泌し、神経系に傷害をもたらしていることが分かった。ELISPOT法による検討で、Rasmussen症候群の7例中5例の血液中に、NMDA型GluRのアミノ酸配列保存領域由来ペプチドを認識してGranzyme Bを分泌するCD8<sup>+</sup>T細胞が見つかり、これらの細胞は健康対照には見られず、本症患者の細胞性自己免疫病態を担うものと考えた。感染によ

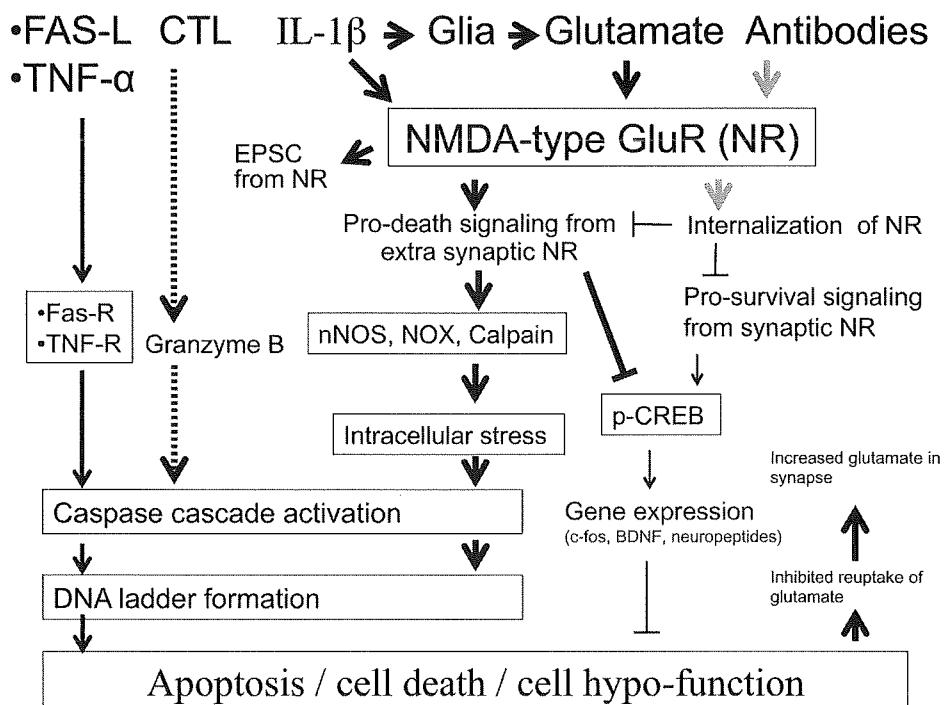


図6. NMDA型GluRを中心とした細胞死、細胞機能障害のメカニズム

FAS-L, FAS ligand; Fas-R, FAS receptor; TNF- $\alpha$ , Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ; TNF-R, Tumor Necrosis Factor receptor; CTL, cytotoxic T cell; EPSC, excitatory postsynaptic current; nNOS, neuronal nitric oxide synthase; NOX, nitrogen oxide; p-CREB, phosphorylated cAMP-Responsive-Element-Binding protein; BDNF, Brain-derived neurotrophic factor.

り活性化されたCD8 $^{+}$ T細胞がNMDA型GluR由来ペプチドも認識でき、血中から脳へ浸潤し、NMDA型GluRを発現する神経系細胞を認識し、細胞死に至らしめる病態が推定される。HTLV-1 associated myelopathy (HAM)では末梢の病的な細胞傷害性T細胞が、髄液中でかなり濃縮されていることが分かつており<sup>18)</sup>、Rasmussen症候群患者においても血中のNMDA型GluR由来ペプチドを認識するCD8 $^{+}$ T細胞が脳でかなり濃縮されている可能性がある。

Rasmussen症候群での神経細胞死・細胞機能抑制のメカニズムとしては、前述の細胞傷害性T細胞以外に、グルタミン酸、サイトカイン、FAS-Lや自己抗体などの関与、さらにはNMDA型GluRからのpro-survival signaling<sup>15)</sup>の抑制などについても今後検討する予定である。

### 【結論・結語】

神経感染症における神経細胞死のメカニズムを考

えるため、NHALEとRasmussen症候群で検討したデータを報告した。NHALEではグルタミン酸による興奮毒性の関与の可能性を見出ましたが、抗NMDA型GluR抗体はむしろアポトーシスを抑制、脳を保護し、比較的良い予後に貢献している可能性があり、今後さらなる検討を必要とする。Rasmussen症候群の神経細胞死にはウィルス分子と神経分子に交差反応する細胞傷害性T細胞の関与が大きいと思われた。

### 文 献

1. 小杉雅史、黒田康夫、ウィルス脳炎、Clinical Neuroscience、2005；23(7)：777-780.
2. 高橋幸利、伊藤智城、臼井大介、木村暢佑、木村記子、須佐史信、那須裕郷、山口解冬、福山哲広、村上智彦、自己免疫が関わる脳炎・脳症、小児科、2010；51(12)：1737-1748.
3. 森寿、グルタミン酸受容体チャンネルの構造と機能、生化学、2005；77：619-629.

4. Groc L, Heine M, Cousins SL, et al., NMDA receptor surface mobility depends on NR2A-2B subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103: 18769-18774.
5. 高橋幸利、最上友紀子、高山留美子、急性脳炎のグルタミン酸受容体自己免疫病態の解明、編集：鈴木則宏、他、Annual Review神経2010、p85-93、東京、中外医学社、2010年1月。
6. 高橋幸利、最上友紀子、高山留美子、向田壮一、池上真理子、池田浩子、今井克美、免疫性神経疾患：最近の進歩、NMDA型グルタミン酸受容体と神経疾患、*Neuroimmunology*、2009;17(2): 245-255.
7. 高橋幸利、池上真理子、向田壮一、小児疾患診療のための病態生理2、てんかん、小児内科増刊号、2009; 41: 728-734.
8. Bien CG, Granata T, Antozzi C, Cross JH, Dulac O, Kurthen M, Lassmann H, Mantegazza R, Villemure JG, Spreafico R, Elger CE, Pathogenesis, diagnosis and treatment of Rasmussen encephalitis: A European consensus statement. *Brain* 2005; 128: 454-471.
9. 高橋幸利、高木佐知子、西村成子、角替央野、グルタミン酸受容体と神経疾患、4. てんかんと抗NMDA受容体抗体、*Clinical Neuroscience*, 2006 ; 24(2): 219-221.
10. 高橋幸利、Meilia M. Suriadi、西村成子、角替央野、高尾恵美子、最上友紀子、高山留美子、美根潤、池上真理子、向田壮一、大谷早苗、久保田裕子、大谷英之、池田浩子、今井克己、松田一己、山崎悦子、小出泰道、藤原建樹、井上有史、渡辺宏雄、今村淳、「てんかんの新たな免疫学的治療法の開発に関する研究」：Rasmussen症候群のペプチド療法開発のための研究、平成19-21年度厚生省精神・神経疾患研究委託費19指-6てんかんに対する新たな治療法開発と標準化に関する研究、総合研究報告書、p 57-79、2010年4月発行。
11. 望月葉子、水谷俊雄、非ヘルペス性辺縁系脳炎の病理、*BRAIN and NERVE*、2010;62 (8) : 861-868.
12. Viviani B, Bartesaghi S, Gardoni F, Vezzani A, Behrens MM, Bartfai T, Binaglia M, Corsini E, Di Luca M, Galli CL, Marinovich M. Interleukin-1beta enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. *J Neurosci* 2003; 23: 8692-8700.
13. 田中光一、アストロサイトにおけるグルタミン酸トランスポーターの機能、*BRAIN and NERVE* 2007 ; 59(7) : 677-688.
14. Dalmau J, Gleichman AJ, Hughes EG, Rossi JE, Peng X, Lai M, Dessain SK, Rosenfeld MR, Balice-Gordon R, Lynch DR, Anti-NMDA-receptor encephalitis: case series and analysis of the effects of antibodies. *Lancet Neurol.* 2008; 7(12): 1091-8.
15. Paradia S, & Hardingham GE. The dichotomy of NMDA receptor signaling, *Neuroscientist*, 2007; 13: 572-579.
16. Bien CG, Bauer J, Deckwerth TL, et al.: Destruction of neurons by cytotoxic T cells: A new pathogenic mechanism in Rasmussen's encephalitis. *Ann. Neurol.* 2002; 51: 311-318.
17. Takahashi Yukitoshi, Jyun Mine, Yuko Kubota, Etsuko Yamazaki, Tateki Fujiwara, A substantial number of Rasmussen syndrome patients have increased IgG, CD4<sup>+</sup> T cells, TNF  $\alpha$ , and Granzyme B in CSF, *Epilepsia*, 2009; 50: 1419-1431.
18. Muraro PA, Wandinger KP, Bielekova B, Gran B, Marques A, Utz U, McFarland HF, Jacobson S, Martin R., Molecular tracking of antigen-specific T cell clones in neurological immune-mediated disorders. *Brain*. 2003; 126: 20-31.

〈シンポジウム2〉 神経系の浮腫と細胞死

## 急性脳症：サイトカインとフリーラジカル

河島尚志

**【要旨】** インフルエンザ脳症の予後不良例においては、IL-6等のサイトカインが早期に、また過剰に産生されている。中枢神経系でのみ高サイトカイン状態になっている例もある。また、血清中NO<sub>x</sub>の高値例が多く、特に髄液では対照に比べ有意に高値を示す。近年の脳症の分類別では、高サイトカインが関与するタイプとして、ANEや、HSE(Hemorrhagic shock and encephalopathy syndrome)、Reye-like 症候群などがあり、興奮毒性のタイプでの高サイトカインは軽度である。タイプ毎に、サイトカインやフリーラジカルが影響の度合いは異なり、さらにウイルスによる差・低酸素・免疫機序などの要素が加わり脳症の病態を形成していると考えられる。

Key words: 脳症(encephalopathy)、サイトカイン(cytokine)、IL-6、  
フリーラジカル(free radical)、NO<sub>x</sub>,

### 【はじめに】

サイトカインは、細胞表面の受容体に結合し、シグナル伝達経路を介して、生化学的あるいは形態的な変化をもたらす。また、他のサイトカインの発現を調節する働きを持ち、連鎖的反応を起こすことが多い。近年、サイトカイン・ストームが種々の病態に関与していることが知られ、SIRS(全身性炎症反応症候群 Systemic Inflammatory Response Syndrome)、CARS(代償性抗炎症反応症候群 Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome)など過剰産生により多臓器不全MOF(multiple organ failure)に陥る病態が知られている。一部の脳症もこういったサイトカインの過剰産生によるSIRSが関与している<sup>1-4)</sup>。

### 【目的】

本シンポジウムでは pandemic H1N1 2009 感染を含めた最近の知見を踏まえ、脳症におけるサイトカインとフリーラジカルに関して整理すること目的とした。

### 【対象と方法】

インフルエンザ、RS、ロタウイルスなどのウイルス感染に伴う脳症を対象とし、その臨床病型別のサイトカインを検討した。同時にサイトカインと連動して脳症の病態に関与するフリーラジカルについては動物実験の結果を交えて検討した。サイトカイン測定は、CLEA法あるいは、BIO-RAD社 Bio-Plex マルチプレックスサイトカインアッセイを使用し、IL-1 $\beta$ ・IL-2・IL-4・IL-5・IL-6・IL-7・IL-8・IL-10・IL-12・IL-13・IL-17・G-CSF・GM-CSF・INF- $\gamma$ ・MCP-1・MI-1 $\beta$ ・TNF- $\alpha$ の17項目を測定した。フリーラジカルの代表であるNO<sub>x</sub>測定はNO<sub>2</sub>とNO<sub>3</sub>の値をHPLC-UV systemを用いて Griess法により測定した<sup>5)</sup>。D-ROM(脂質ラジカルを含む総ラジカル)は、FRAS(ウィスマーア研究所)を用いて、クロモゲン(N,N-ジエチルパラフェニレンジアミン)を測定した<sup>6)</sup>。動物実験は、神経親和性インフルエンザウイルス(NWS株)をBALB/cマウス(♂ 5週)に径鼻的に接種し、24時間、3日目、6日目に脳を摘出して、RNAレベルないしHE染色、GFAP染色などを行った<sup>7)</sup>。

## 【結果】

### 1. インフルエンザ脳症とSIRS

SIRSは、米国で新薬の臨床試験の為に、菌血症患者の選択基準を1991年に定義した概念で、菌血症を始め、真菌血症、寄生虫血症、ウイルス血症、外傷、熱傷、肺炎、手術後などの種々の侵襲を誘引とする全身性炎症反応でMOFに陥いる可能性が高い状態を呼んだ。SIRSの成人の診断基準は、①体温の変動(38度以上、または、36度以下)、②脈拍数増加(90回/分以上)、③呼吸数増加(20回/分以上)または $\text{PaCO}_2$ が32 Torr以下が見られ、血液検査所見で、白血球数が $12,000/\mu\text{l}$ 以上または $4,000/\mu\text{l}$ 以下あるいは未熟顆粒球が10%以上とし、2つ以上をSIRSとしている<sup>8)</sup>。インフルエンザ脳症では、多くの重症例が早期に重篤化し、最終的にMOFになって死亡していることからSIRSが推測された。そこで、当院でインフルエンザ脳症の患者の体温・脈拍を整理した。死亡3症例と、生存した6例を比較すると、脈拍で180回/分以上、体温40.5°C以上の患者は亡くなっていた(Fig 1)。同時に、血清中の炎症性サイトカインの代表であるIL-6を測定したところ、重症のインフルエンザ脳症では化膿性髄膜炎とほぼ同様な高値を示し(Fig 1)、脳症の重症化あるいは死亡はSIRSの病態に一致していると考えられた<sup>9,10)</sup>。

### 2. インフルエンザ脳症における血清中IL-6-他疾患との比較

血清中のIL-6が他の熱性痙攣やロタウイルス関連痙攣と比較し、インフルエンザ脳症では有意に高いかを検討した(Fig 1)。インフルエンザ脳症では、血清中のIL-6は他の2群に比べ有意に高値を示し、病態に関与し診断的価値があることが知れた<sup>11)</sup>。このため、当院では、迅速IL-6測定機械を購入し、30分以内に結果が得られるよう検査室の対応を変えた。

### 3. インフルエンザ脳症のサイトカインを含む血液検査の時間的推移

インフルエンザ脳症の病態仮説として、インフルエンザウイルスの感染・増殖が最初に起こり、ついでastrocyte /microgliaの異常活性化され、iNOS活性化・炎症性サイトカイン放出(TNF- $\alpha$ など)するため、①mRNAの転写の促進(フェリチン上昇)、②リポ蛋白リパーゼ活性抑制(TG上昇)、③IL-6、IL-1 $\beta$ 上昇がおこると考えられる。過剰なIL-1 $\beta$ は痙攣・意識障害に関与する。これらの炎症性サイトカインと同時にNOなどがラジカルとして作用

し、astrocyteの破壊(BBBの破綻)から脳内サイトカインの全身への放出→血漿成分の脳内への流入→DIC・多臓器不全→死亡とする病態仮説を考えられた<sup>12, 13)</sup>。

そこで、サイトカインを含む血液検査の時間的推移をインフルエンザ脳症にて入院した19例を対象として検討した。けいれん・意識障害・脳浮腫を認めたインフルエンザ脳症とし、A群(4例)：重症例(DIC・多臓器不全を伴った例)、B群(4例)：中等症例、C群(11例)：軽症例(けいれん・意識障害・脳浮腫のみ)の3群に分類し、臨床像及び血液検査所見について比較検討したところ、A、B群では発熱、けいれん後、GOT/LDH/Crが上昇するまでの時間を統一し整理すると、インフルエンザ脳症の死亡を含む予後不良症例では、入院時の一般検査は正常に近い値をとり、IL-6、フェリチン、TGなどが、重症ほど早期にまた過剰に産生されていることが判明した。このことから、MOFにいたる前にIL-6などのサイトカインが先に上昇することが判明した<sup>14)</sup>。

### 4. インフルエンザ脳症におけるNOx

インフルエンザ脳症の病態仮説から考えて、インフルエンザウイルスの感染・増殖後に、Astrocyte /microgliaの異常活性化され、iNOS活性化と炎症性サイトカイン放出が、病態を形成する重要な要因と推察されたため、血清ならびに髄液中のNOxの測定を行った。血清中で、肺炎群や熱性けいれん群などと比較し高い傾向は示したが、有意差はなかった<sup>15)</sup>。しかし、死亡症例においては経過中に上昇していた。一方、髄液中では他の疾患と比べ、有意に高値を示した(Fig 2)<sup>16)</sup>。しかしながら、予後との検討では、死亡症例と生存症例で髄液中のNOxに差はなかった。このため、D-ROMにおいて、予後との検討を行ったところ、多くの予後不良例は総ラジカルのD-ROM高値と同時にIL-6も高値を示した(Fig 3)<sup>17)</sup>。また、フリーラジカルの重要なスカベンジャーであるZnは血清中では、インフルエンザ脳症を発症した患児の20%は低値を示した<sup>18)</sup>。これらの結果は、一部の小児例ではラジカルに対し非常に弱い可能性が考えられた。

### 5. インフルエンザ脳症における髄液中のグルタミン酸

低酸素脳症や肝性脳症では、グルタミン酸が神経細胞の障害の中心的役割と考えられている。そこで、インフルエンザ脳症での髄液中のグルタミン酸濃度を測定した。化膿性髄膜炎では髄液中では、コントロールより高値を示したが、インフルエンザ脳症では逆に低値を示し、また、グルタミンは高値を示し

Fig1

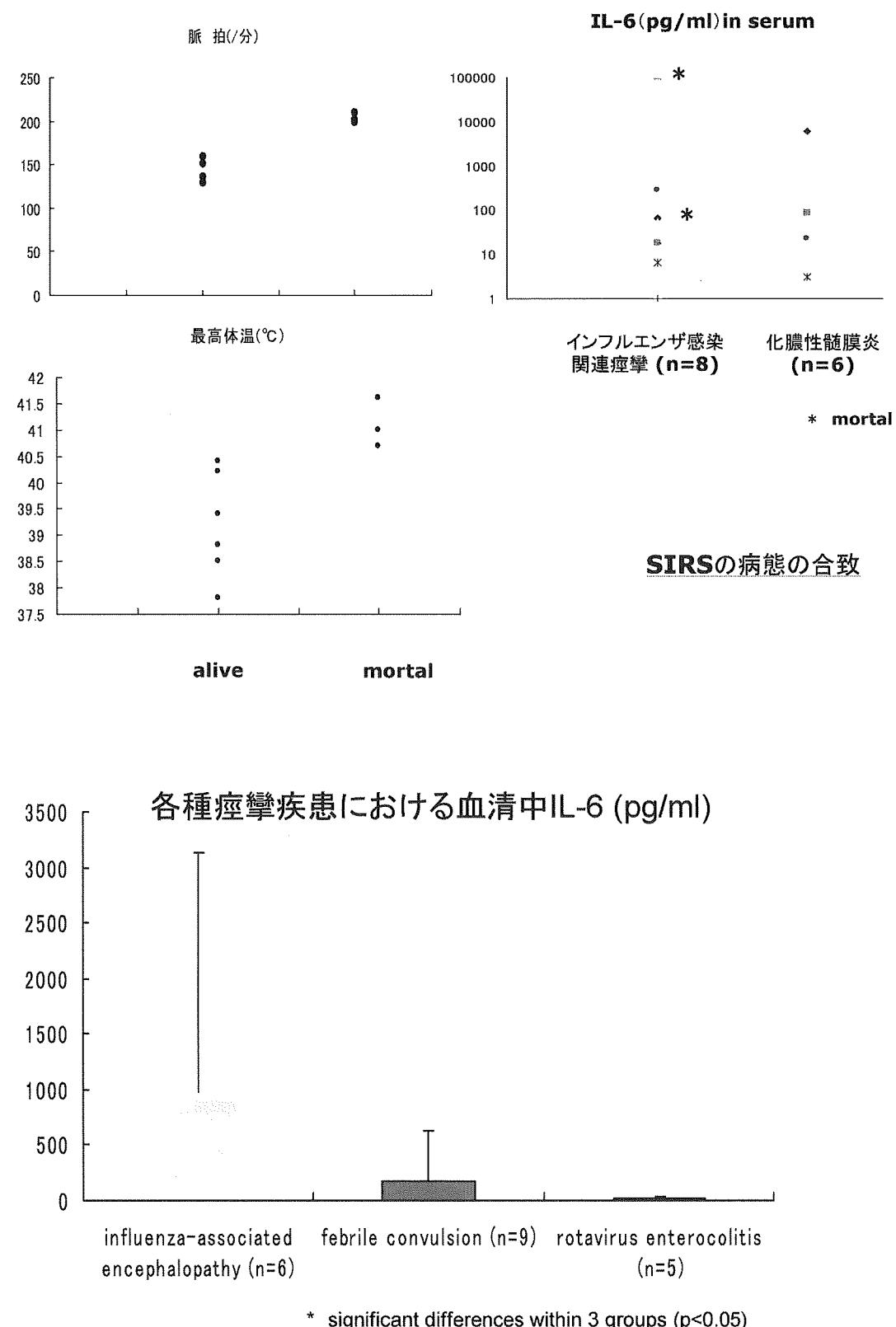
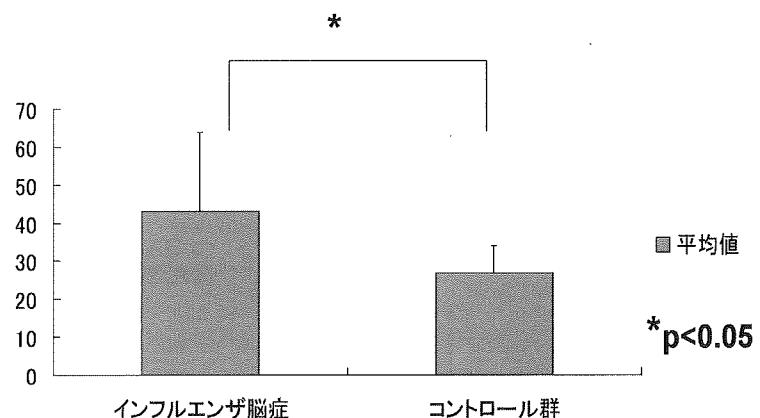
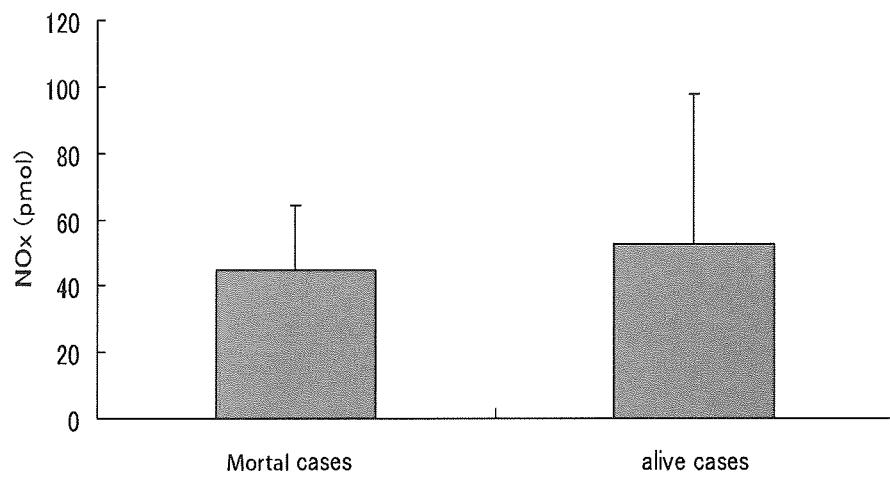


Fig 1: インフルエンザ脳症における vital signs (脈拍と体温) と血清中の IL-6 (pg/ml) (上段) と  
各種痙攣疾患における血清中 IL-6

インフルエンザ脳症患者とコントロール群の髄液中NOx(pmol)



NOx in CSF of influenza-associated encephalopathy



**Fig 2:** インフルエンザ脳症における髄液中NOx( $\text{NO}_2 + \text{NO}_3$ ) (上段は対照群との比較、下段は予後で分けた脳症患者)

た (Fig 4)<sup>19)</sup>。中枢神経系においては、グリア細胞と神経細胞間において、グルタミングルタミン酸サーキットが形成されていることから、インフルエンザ脳症ではグリア細胞の活性化が過剰におきていることを示唆していた。これらの結果を鑑み、臨床的経過から考えて、何らかのneurosubstanceによりインフルエンザ脳症ではNOの産生とその周囲のグリア細胞が異常な活性化が病態に関与していると推察された<sup>20)</sup>。マウスでインフルエンザウイルスを経鼻接種すると、海馬を中心に血管拡張像が多数認められ、血管内皮では、NOSやGFAPが強く染色され、astorogliaが活性化している像が認められ (Fig 5)、これらの結果はNOxやグルタミン酸の結果と合致した。

## 6. 各ウイルス脳症における髄液中の各種サイトカイン (Fig 6)

ウイルスによるサイトカインの差を知るため、インフルエンザ以外のウイルスによる脳症において、サイトカインやNOxについて検討した。対象としてRS脳症、ロタウイルス脳症、ロタウイルス感染に伴う良性けいれんとインフルエンザ脳症との髄液中の各種のサイトカインの検討を行った。炎症性サイトカインのIL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 、GM-CSFはインフルエンザ脳症で非常に高値であった。また、Th1、Th2、Th17に分けて考えても、IL-4、IL-10、IL-2、IFN- $\alpha$ 、IL-17などが高値であった。さらに、IL-1 $\beta$ や他の役割をするIL-5、IL-7、IL-12、IL-13などもインフルエンザ脳症がもっとも高値であった。RS脳症やロタウイルス脳症においても種々のサイトカインが上昇していたが、上昇の度合いは軽度であった<sup>21)</sup>。このことから、ウイルス間により誘導されるサントカインの量的差があった。

## 7. 脳症のタイプ毎によるサイトカインの差

病態を中心とした近年の脳症の分類では、代謝異常が関与するもの、興奮毒性によるもの、高サイトカインが関与するものに分けられるが<sup>22)</sup>、高サイトカインが関与するタイプとして、急性壊死性脳症ANEや、hemorrhagic shock and encephalopathy (HSES)、Reye-like 症候群などがあり、興奮毒性のタイプでは高サイトカインは認められても軽度である。RS感染に伴う脳症の患者を整理すると、興奮毒性型のタイプが多く、髄液中のNOxやIL-6はサイトカイン上昇は軽度であることが知れた。一方、生後1か月前後における低酸素が関与した群でも、NOxが上昇していることが知れた (表1)<sup>23、24)</sup>。

## 8. 新型インフルエンザ (pandemic influenza H1N12009) のサイトカイン

pandemic influenza H1N12009 (以降pdm H1N1 2009) の各種の髄液中のサイトカインは脳症患者でみると、MARSが多く、季節型に比べ上昇は軽度であった。また、重症の肺炎例においても血清中や鼻汁中でサイトカイン上昇を認める以前に気管吸引痰において、各種のケモカインの上昇を認めた<sup>25、26)</sup>。

## 9. 剖検例

脳症で亡くなった2歳の女児例の剖検では、最終死因は脳浮腫であり。大脳・小脳の皮質、視床・橋・延髄に散在する血漿成分の漏出とその周囲にCD68陽性マクロファージの集簇とグリア細胞のclasmatodendrosisを認めた。また、骨髄における著名な血球貪食像を認めた<sup>27、28)</sup>。

## 10. ラジカルスカベンジャーの使用例<sup>29)</sup>

症例1は6歳男性で、主訴は痙攣、発熱であった。既往歴・家族歴では3歳時に熱性痙攣を認める以外に特記すべきことはなかった。現病歴では、■■■年2月27日、38度台の発熱1時間後に痙攣が間欠的に約10分間継続し当院搬送された。来院時も同様の痙攣を認め、母親がインフルエンザB型陽性のためインフルエンザ脳症疑いにて入院管理となった。意識はJCSでII-20、血圧は118/66mmHg、脈拍120bpm、呼吸数30回/分で、体温は38.2°Cであった。血液中でIL-6が30.8pg/mlと軽度高値をとる以外に異常を示した値はなかった。髄液検査では細胞数や蛋白は正常であったが、IL-6は57.4 pg/ml、また、フリーラジカルの総和であるd-ROMが34 U.CARRと異常値を示した。脳波は覚醒時脳波で全般性の徐波を認め、頭部CT皮髄境界不鮮明や脳室の狭小化を認めた。頭部MRIのDWIでは左放線冠高信号及び皮質に広範な高信号を認めた。

入院後、インフルエンザ脳症と診断し、ただちにメチルプレドニゾロンのパルス療法、抗ウイルス薬、脳圧降下薬を開始した、同時にフリーラジカルが高値であることから、家族の同意のもとエダラボンを0.5mg/kg × 2で開始した。痙攣は入院後は認めず、意識レベルも徐々に改善した。しかし、意識改善後も頭痛が継続していた。第7病日に行った髄液検査でも髄液圧18cm、IL-6は32.2と高値で、一方d-ROMは3.4と低下していた。このため、中枢神経系における高サイトカイン状態は継続していると判断し、2回目のメチルプレドニゾロンのパルス療法と $\gamma$ -グロブリン療法を開始した。開始後から、頭痛は消失し、プレドニンの後療法を開始した。しかし、ステロイドの減量を開始すると、頭痛が再燃してきたため再度髄液検査を行ったところ、髄液圧は

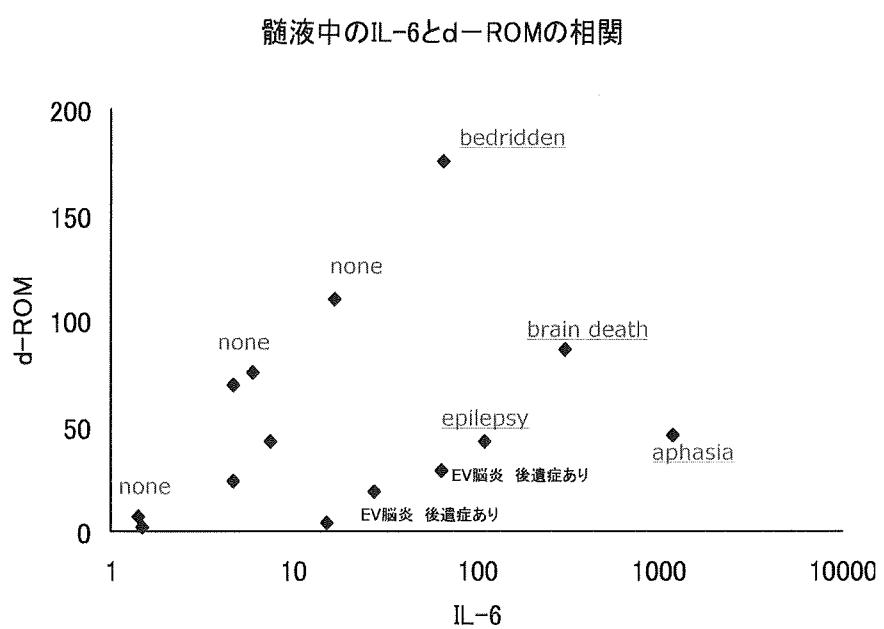
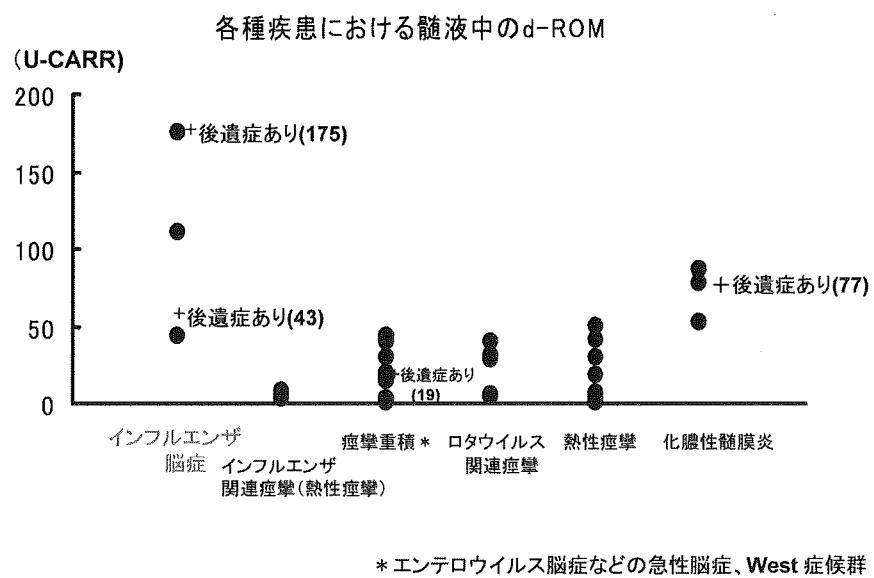


Fig 3: 各種疾患における髄液中D-ROM並びにIL-6と予後との関連

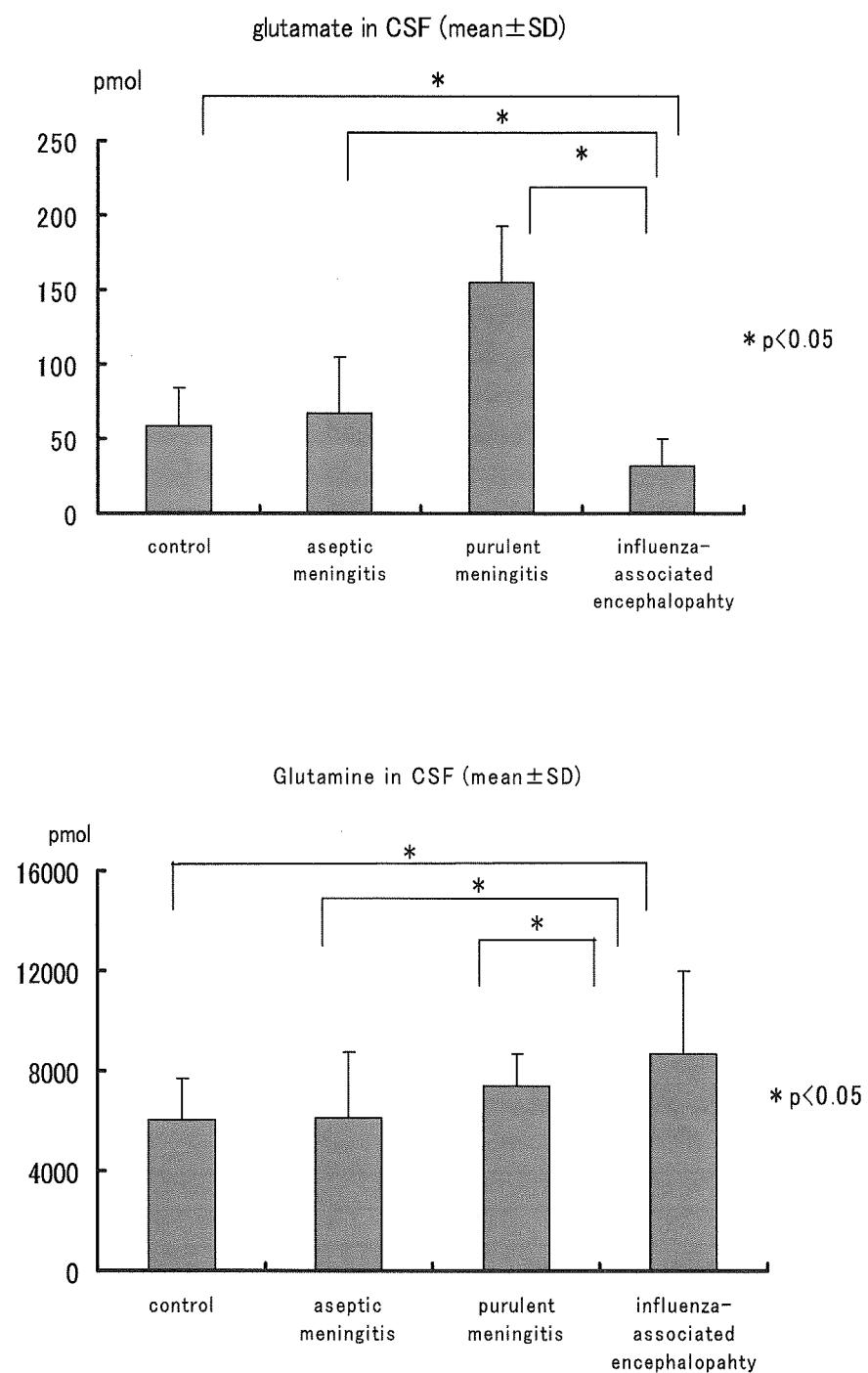
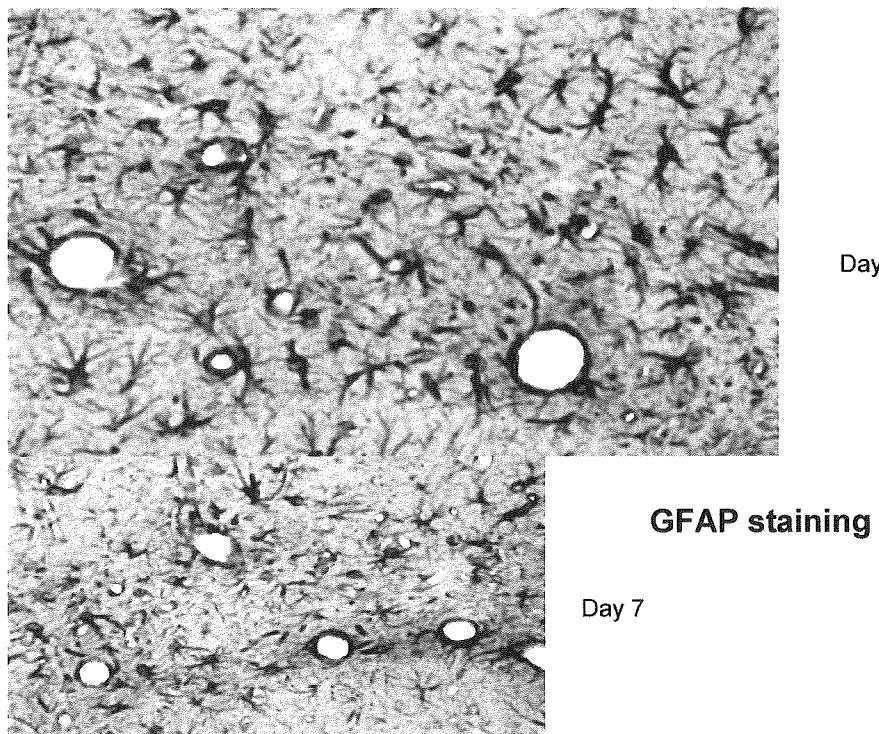


Fig 4: 隨液中のグルタミン・グルタミン酸濃度

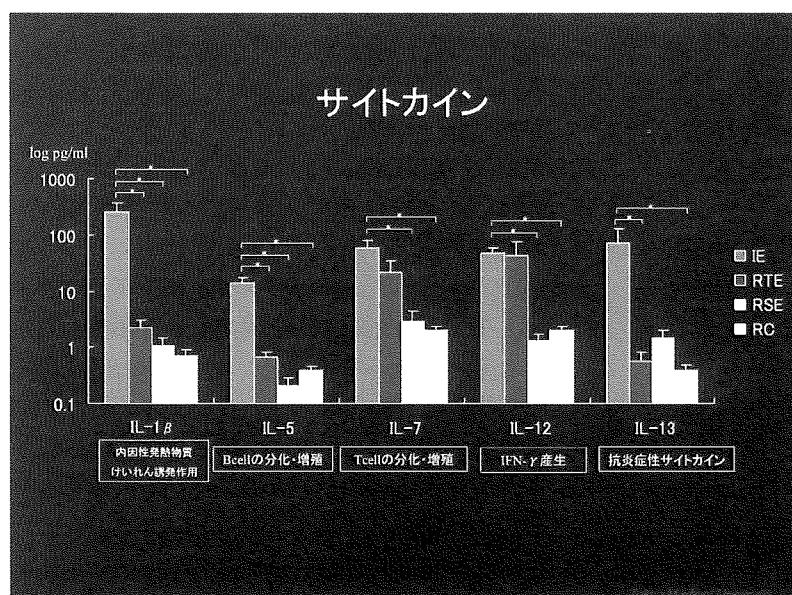
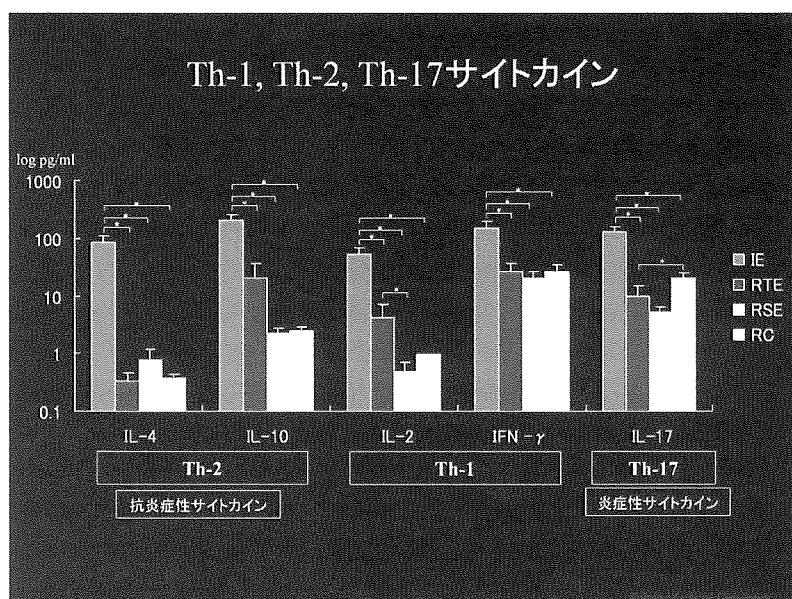
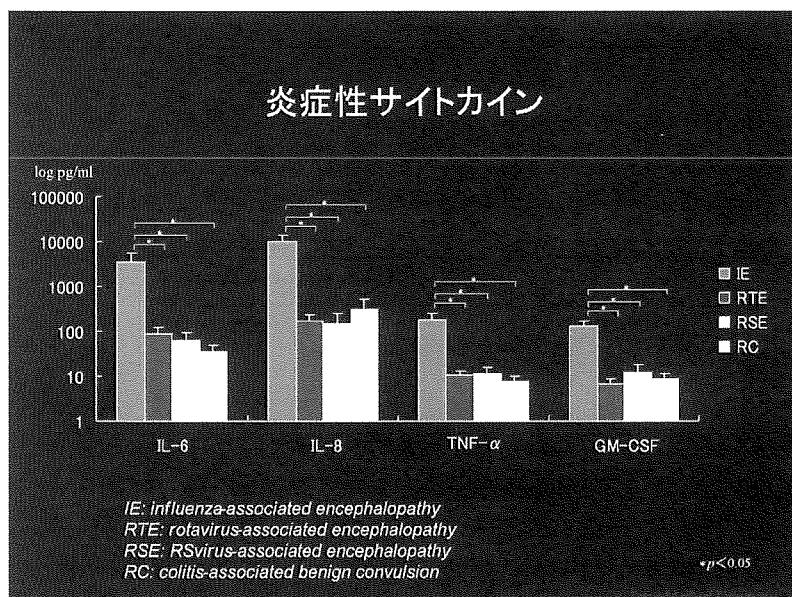


**Fig 5:** インフルエンザ接種マウスにおける海馬周辺のGFAP染色(上段接種1日目200Xと下段接種7日目100X)：血管拡張像とその周辺のGFAP染色が強く染まる。

表1

number of case	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Age	3 years	11 months	3 years	1 year	3 years	10 days	4 months	27 days	14 days
sex	male	female	male	female	male	male	Male	male	female
encephalopathy type	Metabolic error	Excito-toxicity	Excito-toxicity	Excito-toxicity	Excito-toxicity	Excito-toxicity	Cytokine storm	Hypoxia	Hypoxia
diseases before onset	CHARGE syndrome	none	febrile seizure	none	None	none	Hydro-nephrosis	none	pneumonia
CNS symptoms	hemiconvulsion	GTC and hemiconvulsion later	GTC 50 minutes	GTC 3 minutes	nuchal rigidity	GTC	GTC after sudden arrest	convulsion after cyanosis	apnea and lethargy
unconsciousness	+	+	+	+	-	+	+	+	-
brain edema	+	+	-	+	-	+	+	+	-
sequela	mental retardation	mental retardation	none	none	none	-	bedridden, quadriplegia	mental retardation	none
CSF analysis	protein	16	39	25	8	49	85.6	19	300
	virus gene	+	+(type A)	+(type A)	+(type A)	-	-	+(type A)	-
	IL-6 (pg/ml)	2.3*	29.7	10.6	4.8	4.2	4.52	187	3.3*
	NOx (pmol)	66.8	133.9	44.9	105.2	244.3	-	54.1	50.6

### RS関連脳症における髄液中のIL-6とNOx



**Fig 6:**各種ウイルス（インフルエンザ・RS・口タウイルス）脳症における髄液中サイトカインプロファイル

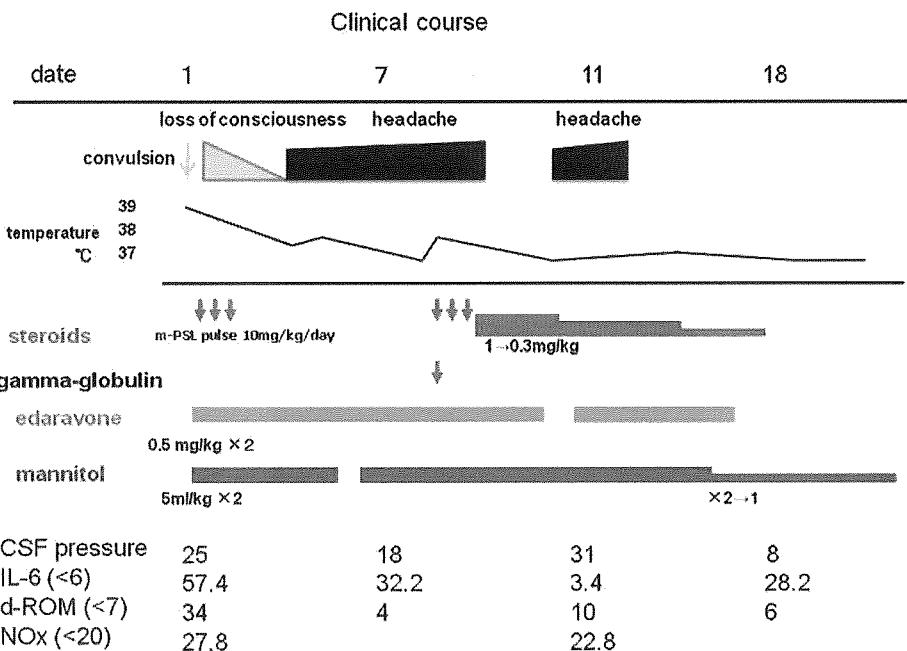


Fig 7: エダラボンが有効であった小児例に臨床経過

再び31cmと上昇し、IL-6は正常化したが、d-ROMは10まで再上昇していた。このため、エダラボンを同量で1週間再投与した所、頭痛は消失し、ステロイドを減量後も症状の再燃なく第22病日に軽快退院となった(Fig 7)。

### 【考察と結論】

種々の検査結果ならびに臨床症状から、ウイルスの種類ならびにPandemic H1 N1 2009などウイルスの違いや、低酸素性脳症や免疫機序が加わり、脳症の種々のタイプごとに、サイトカインやフリーラジカルの影響の度合いが異なる。その結果脳症の病態が形成されると考えられる。

IL-6は近年、その神経保護作用が注目されてきているが、こういったサイトカインは早期の診断や重症化の指標になるばかりでなく、一部の脳症の予後不良群では、高サイトカイン血症をともなったVAHSの状態であるといえる。抗サイトカイン療法や、フリーラジカルは治療のターゲットとなる可能性がある<sup>29, 30)</sup>。

### 文 献

- Morishima T, Togashi T, Yokota S et al: Encephalitis and encephalopathy associated with an influenza epidemic in Japan. Clin Infect Dis 35: 512-517. 2002.
- Ichiyama T, Isumi H, Ozawa H, et al: Cerebrospinal fluid and serum levels of cytokines and soluble tumor necrosis factor receptor in influenza virus-associated encephalopathy. Scand J Infect Dis. 35:59-61. 2003
- 横田俊平, 河島尚志: 小児医療の最前線「インフルエンザの治療」 医学のあゆみ 206:627-632, 2003.
- 河島尚志: 「インフルエンザ診療のブレークスルー」『インフルエンザ脳症—これまでわかったこと、わらないこと』 臨床検査 52:69-74, 2008.
- Kawashima H, Inage Y, Ogihara M, et al.: Serum and cerebrospinal fluid nitrite/nitrate levels in patients with rotavirus gastroenteritis induced convulsion.. Life Sci 74:1397-405. 2004.

6. Yamanaka G, Ishii C, Kawashima H, et al:Cerebrospinal fluid Diacron-Reactive Oxygen Metabolite levels in pediatric patients with central nervous system diseases. *Pediatr Neurol.* 39:80-4. 2008.
7. Watanabe C, Kawashima H, Takekuma K, et al: Increased nitric oxide production and GFAP expression in the brains of influenza A/NWS virus infected mice. *Neurochem Res* 33: 1017-1023. 2008.
8. Rangel-Frausto MS, Pittet D, Costigan M, et al:The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. *JAMA.* 273:117-23. 1995.
9. 河島尚志, 柏木保代, 山中岳, 岸宗憲: インフルエンザと高サイトカイン血症. 小児内科 42;1509-1513,2010
10. 河島尚志: インフルエンザ脳症の現状. 東京医科大学雑誌63:97-103,2005
11. Nakamura M, Yamanaka G, Kawashima H et al: Clinical application of rapid assay of interleukin-6 in influenza-associated encephalopathy. *Dis Markers* 21:199-202. 2005.
12. 河島尚志、五百井寛明、山中岳: 臓器別感染症(脳神経系)～中枢神経感染症—最近の話題 インフルエンザ脳症. 化学療法の領域20;1441-1448,2004.
13. 河島尚志: インフルエンザ脳症のガイドライン. 治療学40;1345-9, 2006.
14. 山中岳、平良尚子、河島尚志他: インフルエンザ脳症重症度予測. 日小児会110:417-24, 2006
15. Kawashima H, Watanabe Y, Ichiyama T et a:High concentration of serum nitrite/nitrate obtained from patients with influenza-associated encephalopathy. *Pediatr Int* 44: 705-707. 2002.
16. Kawashima H, Watanabe Y, Morishima T et al: NOx (nitrite/nitrate) in cerebral spinal fluids obtained from patients with influenza-associated encephalopathy. *Neuropediatrics* 34: 137-140. 2003.
17. Yamanaka G, Kawashima H, Suganami Y, et al: Diagnostic and predictive value of CSF d-ROM level in influenza virus-associated encephalopathy. *J Neurol Sci.* 243:71-5. 2006.
18. Kawashima H, Amaha M, Ioi H et al:Nitrite/nitrate (NOx) and zinc concentrations in influenza-associated encephalopathy in children with different sequela. *Neurochem Res* 30: 311-314. 2005.
19. Kawashima H, Morishima T, Togashi T, et al:Extraordinary changes in excitatory amino acid levels in cerebrospinal fluid of influenza-associated encephalopathy of children. *Neurochem Res.* 29:1537-40. 2004.
20. Kawashima H, Oguchi M, Ioi H, et al: Primary biomarkers in cerebral spinal fluid obtained from patients with influenza-associated encephalopathy analyzed by metabolomics. *Int J Neurosci.* 116:927-36. 2006.
21. Kawashima H, Ioi H, Ushio M, et al.: Cerebrospinal fluid analysis in children with seizures from respiratory syncytial virus infection. *Scand J Infect Dis.* 41:228-31. 2009.
22. Mizuguchi M, Yamanouchi H, Ichiyama T, et al:Acute encephalopathy associated with influenza and other viral infections. *Acta Neurol Scand Suppl* 186: 45-56. 2007.
23. Morichi S, Kawashima H, Ioi H, et al:Cerebrospinal fluid NOx (nitrite/nitrate) in RSV-infected children with CNS symptoms. *J Infect.* 59:299-301. 2009.
24. Kawashima H, Ioi H, Ushio M, et al:Cerebrospinal fluid analysis in children with seizures from respiratory syncytial virus infection. *Scand J Infect Dis.* 41:228-31., 2009;
25. Takano T, Tajiri H, Kashiwagi Y, et al :Cytokine and chemokine response in children with the 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 30:117-20. 2011.
26. Kawashima H, Go S, Kashiwagi Y, et al: Cytokine profiles of suction pulmonary secretions from children infected with pandemic influenza A(H1N1) 2009. *Crit Care.* 14:411. 2010.
27. 河島尚志、西亦繁雄、鈴木俊輔: 小児感染免疫

- 疾患の病理—インフルエンザ脳症・病理と臨床  
26:904-9,2008
28. Watanabe T, Okazaki E, Shibuya  
H:Influenza A virus-associated  
encephalopathy with haemophagocytic  
syndrome.Eur J Pediatr. 162:799-800.  
2003.
29. Kawashima H, Yamanaka G, Ishii C, et  
al: Nitrite and nitrate as a new target  
of treatments in influenza-associated  
encephalopathy. J Pediatr Infect Diseases  
5;171-76, 2010.
30. Kawashima H, Togashi T, Yamanaka G,  
et al:Efficacy of plasma exchange and  
methylprednisolone pulse therapy on  
influenza-associated encephalopathy. J  
Infect. 51:E53-6, 2005.

## 会の現況

(2011年2月28日現在)

顧問	井形 昭弘	加地 正郎	倉田 毅	立石 潤	萬年 徹
特別功労会員	岩田 誠 葛原 茂樹	塩澤 全司 庄司 紘史	高須 俊明 富樫 武弘	古川 漸 松永 宗雄	水谷 智彦
功労会員	渥美 哲至 磯村 思无 栗原 照幸 高柳 哲也	竹内 博明 田代 邦雄 寺尾 壽夫 長嶋 和郎	西丸 雄也 服部 孝道 本藤 良	松本 博之 水野 美邦 森松 光紀	山口 英世 山本 恒司 若山 吉弘
理事長	水澤 英洋				
理事	糸山 泰人 大原 義朗	辻 省次 中川 正法	中野 今治 布井 博幸	原 寿郎 細矢 光亮	水澤 英洋 山田 正仁
監事	亀井 聰	楠原 浩一			
評議員	相原 正男 綾部 光芳 荒木 俊彦 有村 公良 粟屋 豊 飯塚 高浩 池田 修一 石川 欽也 伊住 浩史 出雲 周二 市川 博雄 市山 高志 井出 俊光 伊藤 瑞規 糸川かおり 犬塚 貴 岩崎 靖 上野 聰 内野 誠 尾内 一信 大石 実 太田 宏平 岡部 信彦 小川 克彦 小鹿 幸生	梶 龍児 片山 泰朗 亀井 聰 河島 尚志 河村 満 神田 隆 岸田 修二 岸田 日帶 吉良 潤一 吉良龍太郎 楠 進 楠原 浩一 國本 雅也 久保田龍二 熊本 俊秀 倉根 一郎 栗山 勝 黒岩 義之 黒田 康夫 小島 重幸 小林 槟雄 作田 学 佐々木秀直 佐多徹太郎 塩田 宏嗣	塩見 正司 鳴崎 晴雄 自見 隆弘 清水 輝夫 東海林幹夫 調 漸 新藤 和雅 鈴木 重明 鈴木 則宏 鈴木 裕 錫村 明生 砂田 芳秀 瀬川 文徳 祖父江 元 高梨 潤一 高橋 輝行 高橋 幸利 高橋 若生 田中 正美 谷脇 考恭 田村 正人 千葉 進 辻 貞俊 坪井 義夫 出口 一志	土井 宏 富樫 慎治 長坂 高村 中里 良彦 中島 健二 中嶋 秀人 中瀬 浩史 中根 俊成 長野 祐久 滑川 道人 成田 光生 西澤 正豊 野倉 一也 野村 恭一 馬場 正之 濱野 忠則 平田 幸一 平山 幹生 福田 安雄 藤原 一男 法化 図陽一 星加 明徳 前垣 義弘 松井 真 松本 昌泰	三浦 義治 三木 健司 水口 雅 武藤 多津郎 村井 弘之 村上 龍文 村田 顕也 村山 繁雄 持田 嘉之 森内 浩幸 森島 恒雄 森田 昭彦 矢部 一郎 山根 清美 山脇 健盛 湯浅 龍彦 雪竹 基弘 横田 隆徳 吉川 哲史 吉川 秀人 芳川 浩男 米田 誠 陸 重雄

(123名;五十音順)

賛助会員 グラクソ・スミスクライン株式会社

総会員数 567名 (一般会員:402名)

事務局 東京医科歯科大学脳神経病態学(神経内科)

# 日本神経感染症学会会則

(平成22年10月)

**第一条** 本会は日本神経感染症学会 (Japanese Society for Neuroinfectious Diseases) と称する。

**第二条** 本会の目的は神経感染症の1. 成因、2. 疫学、3. 診断、4. 治療、5. 予防について基礎的及び、臨床的研究の発展を図り併せて社会へ成果を還元することを目的とする。

**第三条** 本会の目的を達成するために次の事業を行う。

(1) 年次研究集会「日本神経感染症学会」の開催

(2) 学会誌 (NEUROINFECTION) の発行

(3) その他 本会の目的に必要な調査・研究・知識普及などの事業

**第四条** 本会の正会員は、前条の目的にかなった調査・研究を行う研究者で評議員会によって承認されたものとする。会員は会費納入の義務を負う。

**第五条** 役員 (評議員、会長、理事、監事、理事長及び顧問)

1. 評議員は理事会により正会員より選出される。

2. 評議員は本会の運営につき審議する。

3. 理事は評議員の中より若干名選出される。

4. 理事は、本会の運営に当たる。

5. 理事の互選により理事長を選出する。

6. 会長1名を評議員の中から選ぶ。会長の任期は1年とし、年次研究集会を担当する。

会長は評議員会及び総会を招集する。

7. 会計監査のため評議員より2名の監事を依頼する。監事は理事を兼ねない。

8. 助言者として若干名の顧問をおくことができる。

9. 上記役員の任期は2年とし、再任を妨げない。

**第六条** 会議 (評議員会、理事会、総会) は、それぞれ以下の事項を担当する。

1. 評議員会は委任状を含め半数以上の評議員の出席をもって成立し、次の事項を審議決定する。

(1) 年次研究集会「日本神経感染症学会」の開催

(2) 学会誌の発行

(3) 会員の入会と退会

(4) 理事会の選出した役員の承認

(5) 会則の変更

(6) その他、本会の目的に必要な調査・研究・知識普及などの事業

(7) 次年度予算と前年度決算

2. 理事会は会の運営に当たる。

3. 総会は評議員会での審議決定の報告を受け、意見を述べることができる。

**第七条** 本会の事務局は、評議員会の指定するところにおく。

- 第八条 1. 本会の経費は会費その他をもって充てる。
2. 本会の会計年度は4月1日に始まり、3月31日に終わるものとする。
3. 会員は年度初めまでに当該年度の会費を納入するものとする。
4. 本会の毎会計年度収支決算はその前年度終了後監査を受け、評議員会の承認に付するものとする。

付則1. 本会の事務局は、当分の間、東京医科歯科大学神経内科におく。

付則2. 本会則は平成18年4月1日から実施する。

付則3. 本会の会費は年額以下のごとく定める。

会 費 一般会員 7千円

評議員 9千円

理事 1万円

賛助会員会費 一口5万円、一口以上

(平成17年10月20日一部変更)

(平成22年10月7日一部変更)

# 「NEUROINFECTION」投稿規程

(2007年5月改訂)

## 1. 投稿にあたって

- 1) 著者、共著者は日本神経感染症学会員に限らない。
- 2) 論文の内容は神経感染症に関連するものを広く採用する。
- 3) 投稿論文（原著、症例報告）は国内外の他雑誌に掲載されていないもの、あるいは投稿中でない論文に限る。なお、英文の原稿も受け付ける。
- 4) 投稿論文の採否は編集委員会での審査により決定する。
- 5) 論文審査料は無料とする。
- 6) 論文掲載料は無料であり、写真については原則白黒とする。ただし、カラー写真を希望する場合は実費を徴収する。
- 7) 別刷は有料とする。50部単位で実費を徴収する。
- 8) すべての論文の著作権は日本神経感染症学会に帰属する。

## 2. 論文の構成

投稿論文（原著、症例報告）：原著は要旨300字以内、本文400字詰原稿用紙20枚（8000字）以内、文献30以内、図表8個以内、英文抄録500語以内とする。症例報告は、6000字以内、文献20個以内、図表6個以内、要約、英文抄録は原著と同じ。

	要約	本文	文献	図・表	英文抄録
原 著	300字	8000字以内	30個以内	8個以内	500語
症例報告	300字	6000字以内	20個以内	6個以内	500語

## 3. 執筆要項

- 1) 原稿の送り先  
 〒113-8519 東京都文京区湯島1-5-45  
 東京医科歯科大学大学院 脳神経病態学分野 内  
 日本神経感染症学会事務局 編集委員長 宛  
 電話：03-5803-5234、FAX：03-5803-0169
- 2) 原稿はパソコンまたはワープロに限り、A4判（1枚あたり2000字まで）で印刷したものとする。
- 3) 原稿の電子ファイルを送ること、メディアはフロッピー、CD-R、DVD-R、あるいはMOでよい。（OS、ソフトウェア、ファイル名を必ず記載のこと）。
- 4) 投稿論文の原稿はオリジナル1部、コピー2部（図表を含む）を送ること。
- 5) 投稿論文とともに、共著者全員の署名の入った投稿承諾書（巻末の別紙）を送ること。
- 6) 表紙には和文、英文で表題、著者名、所属、連絡先を記す。
- 7) 表紙にはKey Wordsを英語と日本語で掲げる（5つまで）。
- 8) 投稿論文の場合、要旨につづいて本文として、はじめに、目的、対象・方法、考察、結論または結語などの項目を掲げる。また、症例報告の場合、症例という項目を挙げてもよい。
- 9) 専門用語以外は当用漢字、現代仮名遣いを用い、句読点を正確に書く。

- 10) 外国語の固有名詞（人名、地名）は原語のまま用いる。すでに、日本語化して久しいものはなるべくカタカナとする。商標薬品名®、その他の固有名詞の頭文字は大文字とするが、文中の外国語単語（病名、その他）の頭文字は、ドイツ語名詞及び文頭の場合を除きすべて小文字とする。
- 11) 数字は算用数字を用い、度量衡単位は CGS 単位で、m、cm、mm、cm<sup>2</sup>、Kg、g、mg などとする。
- 12) 写真、図、表には必ず表題をつける。また必要に応じて説明もつけること。組織標本には染色法と倍率を付ける。写真は原寸大で印刷できる大きさで、十分鮮明なものとし、原寸大の大きさは 21 cm × 14 cm を限度とする。写真是原則として白黒とする。
- 13) 文献は本文に用いられたものを引用順に挙げ、引用番号は、本文中の引用箇所に肩番号で記す。また、文献は下記のように記載し、欧文雑誌の略名は最近の Index Medicus に従う。

雑誌の場合 著者氏名：題名、誌名、巻数：起始頁—最終頁、西暦発行年

書籍の場合 著者氏名：書名、版数、発行所名、発行地、西暦発行年、巻数、引用頁

執筆者名：論文名、書籍名、編集者名、章（または巻）、発行所名、発行地、西暦発行年、引用頁（起始頁—最終頁）

学会発表の抄録を引用するときは表題の最後に（会）、欧文発表の場合は（abstr）とする。

- 14) 引用文献の著者氏名は、3名以内の場合は全員を書き、4名以上の場合は3名連記の上、「ほか」あるいは et al とする。

#### 4. 引用文献例

- 1) Whitley RJ, Alford CA, Hirsch MS, et al : Vidarabine versus acyclovir therapy in herpes simplex encephalitis. N Engl J Med 314 : 144-149, 1986.
- 2) Baringer JR, Pisani P : Herpes simplex virus genomes in human nervous system tissue analyzed by polymerase chain reaction, Ann Neurol 36 : 823-829, 1994.
- 3) 水谷裕迫、水谷弘子、亀井聰、ほか：単純ヘルペスウイルス脳炎のウイルス血清学的診断に関する研究、感染症学会誌 58 : 187-196, 1984.
- 4) 平井 良、三浦夕美子、綾部 光芳、ほか：海馬に限局したMR I 所見を呈したヘルペス脳炎で、肺小細胞癌が判明した1症例（会）、Neuroinfection 8 : 57, 2003.
- 5) Heilman KM, Valenstein E, eds : Clinical Neuropsychology, 2nd ed. Oxford University Press, Oxford, 1985, pp94-97.
- 6) 岩田 誠、織田敏次 監修：新・病気とからだの読本 第1巻 消化器、暮らしの手帖社、東京、2000, pp52-58.
- 7) 高須俊明：ウイルス性脳炎（亀山正邦、高倉公明、編）。今日の神経疾患治療指針、医学書院、東京 1994, pp325-328.

## 投稿承諾書

年 月 日 提出

日本神経感染症学会 殿

論文題名：\_\_\_\_\_

筆頭著者 所属：\_\_\_\_\_

フリガナ  
氏名：\_\_\_\_\_ 印

上記の論文を日本神経感染症学会に投稿することを、共著者として承諾いたします。  
また、本論文の著作権が日本神経感染症学会に帰属することに、筆頭著者を含め異議ございません。

共著者

所属：\_\_\_\_\_ フリガナ  
氏名：\_\_\_\_\_ 印

編集責任者 原 寿郎

---

Neuroinfection 第 16巻 1号

発行 平成 23年 8月 1日

発行者 水澤 英洋

発行所 日本神経感染症学会事務局

〒 113-8519 文京区湯島 1-5-45

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科

脳神経病態学（神経内科）分野

TEL: 03-5803-5234

FAX: 03-5803-0169

印刷所 S&M トラスト株式会社

〒 811-2312 福岡県糟屋郡粕屋町戸原 231-1

TEL: 092-939-2211

FAX: 092-931-3788

E-mail: sandm-t@sandm-t.com

---

