

ISSN 1348-2718

# NEUROINFECTION

神経感染症

Vol. 19 No. 1 2014

日本神経感染症学会

Japanese Society for Neuroinfectious Diseases

## 目 次

第18回日本神経感染症学会総会学術集会報告	布井 博幸	
<b>会長講演</b> インフルエンザ脳症におけるウイルスと宿主の反応を科学する	布井 博幸 西村 豊樹、中原 彰彦	1
<b>特別講演1</b> ポリオウイルスの神経指向性のメカニズム	小池 智	7
<b>特別講演2</b> ベトナムの小児の医療状況と感染症情報	Pham Nhat An Thuy T.B、Phan Huu Phuc、Le Thanh Hai、布井 博幸	13
<b>教育講演2</b> 神経感染症の画像診断	小玉 隆男	18
<b>教育講演3</b> 小児中枢神経感染の外科的治療	長嶋 達也 山元 一樹	25
<b>教育講演4</b> 脳炎・脳症の病理	高橋 健太 鈴木 忠樹、中島 典子、飛梅 実、佐藤 由子、片野 晴隆、長谷川秀樹	32
<b>教育講演5</b> Ras-Raf-ERK経路からみたA型インフルエンザ (H1N1) 感染	松川 昭博 伊藤 利洋	40
<b>教育講演6</b> 新生児脳症と周産期医療	鮫島 浩	43
<b>シンポジウム1 「免疫介在性ニューロパチー」</b>		
免疫性ニューロパチーと抗糖脂質抗体	楠 進	49
急性自律性感覚性ニューロパチー	小池 春樹 祖父 江元	52
Crow-Fukase (POEMS) 症候群の治療：過去・現在・未来	三澤 園子	58
<b>シンポジウム2 「神経疾患における抗体療法」</b>		
筋疾患に対する抗マイオスタチン抗体療法の開発と応用	砂田 芳秀	64
アルツハイマー病に対する免疫療法	玉岡 晃	68
筋萎縮性側索硬化症に対する抗体医療研究の現状	漆谷 真	76
<b>シンポジウム3 「病原体の新しい診断法」</b>		
16S rRNA遺伝子クローンライブラリー解析法の臨床応用	福田 和正 谷口 初美	79
<b>シンポジウム5 「遺伝子異常と神経感染症」</b>		
IRAK4欠損症	高田 英俊	86
TLR3遺伝子のLRRドメインに変異を認めたインフルエンザ脳症の考察	日高 文郎	90
急性脳症と遺伝的多型・変異	水口 雅	97
抗体不全症と中枢神経感染症	金兼 弘和	103
<b>症例報告</b>		
乳幼児期に発症した化膿性脊椎炎に続発した髄膜炎の臨床的検討 ～炎症マーカーの変動評価～	森地振一郎 山中 岳、柏木 保代、河島 尚志	108
役員一覧		112
会則		113
投稿規程		115
投稿承諾書		118
編集者		

# 第18回日本神経感染症学会総会学術集会

第18回日本神経感染症学会学術集會会長 布井博幸  
(宮崎大学)

第18回日本神経感染症学会総会学術集會を2013年10月11日(金)、12日(土)に宮崎(シーガイアコンベンションセンター・サミットホール)で開催させていただきました。参加者は290名に上り、宮崎という九州の東海岸の南端で開催させていただいたにもかかわらず多くの先生方に来ていただき、ありがとうございました。

本大会では、「神経感染症の病原体と宿主の反応を科学する」をメインテーマとして、病原体と宿主の反応を分子生物学や免疫・炎症学をベースに神経感染症を科学する学術集會にしたいと計画させていただきました。インフルエンザ脳症の患者さんを見ていて、同じウイルス感染症にもかかわらず、生体の反応がいろいろ修飾されて症状が出るわけですから、当然かもしれませんが、同じ激しい脳炎脳症でありながら、サイトカインストーム、神経興奮毒性、代謝異常、その他など多岐に渡る原因から脳症を起していることが分ってきたからです。

詳しくは、抄録集や学会誌で見たいのですが、特別講演の東京都神経科学総合研究所の小池智先生に「神経ウイルス感染症の発症機序解明と防御治療法の開発」について、特にポリウイルス感染症で、なぜ脊髄前角細胞障害が起こるのかについて、今考えられる方法を使って、解明していただきました。ハノイ医科大学准教授 Pham Nhat An 先生には「ベトナムでの神経感染症」について、この5年間のベトナムの感染事情の変化と問題点を深く掘り下げて話していただきました。ベトナムではすでに感染症をPCRで診断する時代に入っているのにも驚きましたが、改めて感染症に対する予防接種やICTを含めた予防対策の充実が重要だと実感しました。

教育講演は、名古屋大学の澤田誠先生に「ミクログリアの七変化」、岡山大学病理学の松川昭博先生に「Ras-Raf-ERK 経路からみた A 型インフルエンザ (H1N1) 感染症」を、国立感染症研究所の長谷川先生に「脳炎・脳症の病理」についての神経感染症で押さえておくべき基礎的な概念を、また、兵庫県立こども病院脳外科の長嶋達也先生に「中枢神経系の感染に対する外科的治療」を、宮崎大学産婦人科の鮫島浩先生に「新生児脳症と周産期医療」を、宮崎大学放射線医学分野の小玉隆男先生には「神経感染症の画像診断」など臨床的な基本の概念をご講演いただきました。

シンポジウムは、「免疫介在性ニューロパチー」を祖父江元先生に、「神経疾患における抗体療法」を吉良潤一先生に、「病原体の新しい診断法」を林哲也先生に、「代謝性疾患と神経感染症」を大竹明先生に、「遺伝子異常と神経感染症」を原寿郎先生に企画していただき、この5テーマについて新しい観点からのご講演をいただきました。

一般講演でも、日ごろ疑問に思っている、脳障害がどのように起こるのかを、炎症、細胞死、神経学、感染症、代謝、免疫不全という切り口で討論していただき、やはり興味のない分野であることを再認識した次第です。

感染症の分野はゲノムの時代がどんどん訪れており、ベトナムなどでもかなり効率よく臨床の現場に採用されていることなど、その進歩は今後が楽しみです。本学術集会では、ウイルスや細菌のゲノム解析だけでなく、細菌感染を防御できないがために、重症感染になる免疫疾患も取り上げてもらいましたし、代謝疾患や変性疾患なども、いよいよホストのゲノムプロジェクトに牽引され、遺伝子解明が押し進められていることが、この学会でよく聞かれ、ゲノム時代から、米国オバマ大統領の Brain incentive に始まる、脳の時代がつぎの科学生物学の総合科学という要素が強く感じるようになってきたというのが実感です。

折しも、宮崎は古事記編纂 1300 年という日本発祥の歴史を振り返るイベントが行われておりまして、古の賢者も先生達との出会いを大変楽しんだのではないかと思います。ありがとうございました。

2014 年 4 月吉日

## 会長講演

## インフルエンザ脳症におけるウイルスと宿主の反応を科学する

布井博幸、西村豊樹、中原彰彦

【要旨】 インフルエンザウイルス感染症は、ヒトでは気道粘膜上皮に感染し、1-5日の潜伏期間ののち、38℃以上の高熱や筋肉痛などの全身症状とともに、上気道症状を惹起する。健康な人であれば、その症状が3-7日間続いたあと、治癒に向かう。しかし、臨床的には、上気道粘膜局所にとどまるインフルエンザウイルスが、1) 発熱とともに意識障害やけいれん重積が出現する急性脳症や、2) 肺胞上皮細胞にまで感染し、重症の急性呼吸促進症候群で死亡する症例など (sever ARDS)、予後の厳しい合併症も報告されている (図1)。このような急性脳症や重症肺炎にいたる病態にはウイルス側の要因と生体側の要因が大いにかかわっていると考えられる。私は1998-2000年にかけて社会的問題ともなったインフルエンザ脳症の患者さんの治療にかかわり、その病態があまりにも分からず、その当時明らかにされてきた細胞死のなかでもアポトーシスのマーカーとして血中チトクロームCを測定し、その急激な多臓器不全を伴う脳症で、高値を示すことから、その病態が恐らく高サイトカイン血症による臓器の細胞死ではないかと考え報告した。その後、急性脳症ではサイトカインストーム型、てんかん重積型、代謝異常とその他など病型分類が進み、自然免疫や難治性けいれんにかかわる遺伝子異常も明らかにされてきている。また、インフルエンザウイルス側およびインフルエンザ感染による呼吸不全に関する生体側の病態にかかわる遺伝子変異についても検討されているので報告した。

**Key Words:** インフルエンザウイルス、重症型ARDS、インフルエンザ脳症、関連遺伝子、自然免疫

## 1. はじめに

インフルエンザ感染症は20世紀に約10億人の死者を出したとされ、スペインかぜでは1918-1919年の2年間で4000-5000万人とも言われ、世界人口の約5%が罹患し、2%が死亡したといふいかなる感染症や事故よりも多くの犠牲者を出したとされている。2009年に流行した豚インフルエンザ感染症では29.34万人が死亡し、そのうち20万人が呼吸不全で、8.3万人が心血管系で亡くなっている<sup>1)</sup>。その病態についての詳細な検討がなされているところである。

## 2. 神経感染症としてのインフルエンザ脳症

インフルエンザ脳症はおもに5歳以下の乳幼児に発症し、その後の急速な病状の進行と予後の悪さを特徴とする疾患である。日本で毎年100-500人くらゐ発症していると予測されている。急性脳症では、

脳内に白血球の浸潤などの炎症がないにもかかわらず、脳実質細胞の広範囲の脳浮腫を生じる。インフルエンザウイルスが脳へと侵入しするわけではなく、肺の上気道で増えたウイルスにより炎症性サイトカインの過剰な産生 (サイトカインの嵐) が起こった結果、血液中の物質が血管の外に漏れやすくなり、各臓器細胞のアポトーシスが誘導され、多臓器障害の病態を示し、脳内でも、同様な病態で意識障害などの症状が発生すると理解していた<sup>2,3)</sup>。しかし、感染したウイルスや臨床症状と画像による病型分類がなされ、共通の理解が進み、インフルエンザ脳症は単一の疾患ではなく、複数の病態 (亜型) を示すことが、水口らの平成22年の急性脳症の全国実態調査<sup>4)</sup>により明らかになってきている。それによると、最も激しい脳症であるサイトカインストーム型 (HSES、ANE)、てんかん重積型 (AESD、HHE)、代謝異常 (MAT1、CPTII異常症など) とその他のまだ十分理解できない脳症 (AERRPS、MERS) 等に分類されるのではないかと (図2) と考えられてい

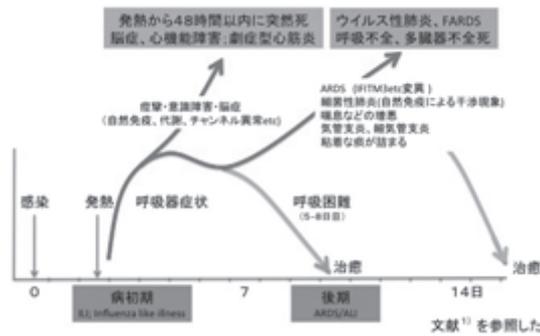


図1 インフルエンザ感染症の経過<sup>15)</sup>

インフルエンザ感染症の経過と経時的に起こる重症合併症を示した。

インフルエンザ脳症は発熱後早期に、インフルエンザ肺炎は二次性肺炎も含めて、1週間を契機に顕著になっている。おのおのにかかわる遺伝子も付記した。詳細については本文参照。

る。インフルエンザ脳症は急性脳症中で17%と最も多く、病型分類頻度ではMERS; 20%、AESD; 10%、ANE; 6%、HSES; 1%、残る60%は分類不能と報告されている。

備考：1) MERS;可逆性脳梁膨大部病変を有する軽症脳炎・脳症 (Clinically mild encephalitis/encephalopathy with a reversible splenial lesion)、2) AESD; 遅発性拡散能低下を呈する急性脳症 (けいれん重積型急性脳症、二相性脳症) (Acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion) 3) ANE; 急性壊死性脳症 (Acute necrotizing encephalopathy) 4) HSES; 出血性ショックを伴う脳症症候群 (Hemorrhagic shock and encephalopathy syndrome) 5) AERRPS; 難治頻回部分発作重積型急性脳炎 (Acute Encephalitis with Refractory, Repetitive Partial Seizures)

ライ症候群は、小児にみられる急性脳症で、肝障害を伴い、発熱時のアスピリンなどの解熱薬の使用が原因であると考えられている。鳥インフルエンザ (H5N1) では入院される5-6病日までは意識は正常で会話もできているので、病初期にみられるインフルエンザ脳症のような症例は認められていない。そのほか、インフルエンザ脳症は日本人を含めた東アジア人に多いようであり、遺伝子異常に関する知見もいろいろ得られている。

1-1)：私のインフルエンザ脳症とのかかわり：

われわれは1998年の冬、インフルエンザ脳症症例のあまりに激しい症例を経験し、いったい何が起

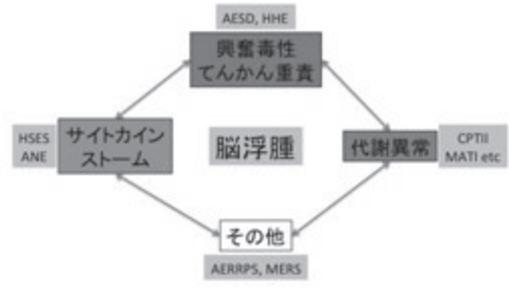


図2 急性脳症の病態分類

っているのか理解できずに、患者御家族とともに悩んでいた。その当時細胞死の基本的なメカニズムとしてアポトーシスがミトコンドリアのチトクロームCを介して誘導されているということが報告されており、われわれはインフルエンザ脳症で起こる急激な脳症や多臓器不全が結果的にアポトーシスを引き起こしているのではないかとこの憶測を立て、血中のチトクロームC測定を行った。その結果血中チトクロームCが非常に上昇していることが明らかになった<sup>2)</sup> (図3)。そこで、同様に重症の経過をたどったインフルエンザ脳症と思われる症例について、血清の提供をお願いし、測定した結果が表1である。臨床結果と比較すると明らかに、チトクロームCが上昇した症例での予後は悪く死亡されていた。中間の値の症例は神経後遺症を残しておられ、はじめから上昇の認められない症例の予後は良好であった。1例は病初期から上昇していたが、IVIgの大量療法が施行されており、病初期のみの高値であり、翌日には正常に復帰されていることから、なんらかの治療法で、病気の軽減治療も期待できるのではないかと考えさせられていた症例であったと考察した<sup>2)</sup>。

その後、当時岡山大学の森島教授を中心に行われたインフルエンザ脳症班にご協力を得て、多くの急性脳症症例を検討させてもらった結果が図4である<sup>5)</sup>。種々の症例があり、血中チトクロームCが上昇しない症例もかなりおられることも明らかになった。それらは、のちの急性脳症の全国調査から、てんかん重積型、代謝異常とその他の脳症 (AERRPS、MERS) 等に分類されることになっていった<sup>6)</sup>。それらについて、おのおのの原因遺伝子が報告されるようになってきたので、下記に報告する。

2-2)：インフルエンザ脳症にかかわる遺伝子

インフルエンザ脳症については、1998-2002年に渡って、急激な増加があり、その基礎研究が森島らの元、繰り広げられ、いくつかの遺伝子異常が報告

水口雅 Neuroinfection 18:54-59,2013を参照

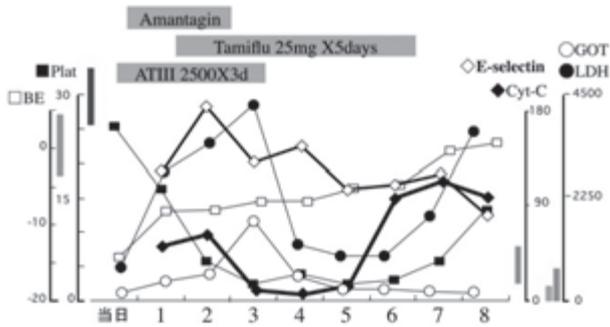


図3 入院後の経過とチトクロームC血中の濃度

図3、表1の結果をはじめ塩基性蛋白質であるチトクロームCには血清中に結合するような酸性蛋白質が多く、回収実験で血清が存在すると血中濃度を低く計測していたことが分からなかったため、正常値を0.03pg/ml以下として測定していた。

表1 インフルエンザ脳炎脳症患者プロフィール

患者	年齢	性	臨床状態	転帰	Cytochrome C (ng/ml)	
					発症時	その後の経過
1	2y	F	HSE	死亡	42	
2	3y	M	ANE	死亡	28.5	
3	1y	F	DOA	死亡	75	
4	1y3m	M	DOA	死亡	58	
5	1y8m	F	SE	死亡	50	68, 62, 80, 9.4, 10, 10
6	3y2m	M	HSE	死亡	35	98, 66
7	3y2m	F	SE	死亡	31	30
8	7y	M	SE	神経後遺症	11	
9	9y	M	SE	神経後遺症	5.8	
10	1m	M	SE	神経後遺症	2.4	14, 9, 3
11	5y	M	SE	神経後遺症	0	
12	2y	M	ANE	軽快	32	0, 0, 0, 0, 0, 2.7, 0
13	4y	M	ANE	軽快	1.2	

DOA:死亡, SE: 虚脱重症, ANE: 急性壊死性脳症, SHE: 出血性ショックを伴う脳症

されている。最近これら家族発症の急性脳炎・脳症症例でも遺伝子異常が報告されている。

(1) TLR-3変異によるインフルエンザ脳症症例：

症例は4歳女児がインフルエンザA型陽性に罹患後、全身性強直間代性ケイレン、全身チアノーゼ、呼吸不整、呼吸抑制が出現、緊急CT検査を行い、脳浮腫を認めたため、インフルエンザ脳症と診断し、ICU入院となっている。種々の治療の結果、中等度の高次機能障害を1年ほど残したが、その後ほぼ元に戻っている。この患者でTLR3のPAMPsの結合領域であるLRRドメインに一塩基置換を伴うヘテロ変異 (908T>C, F303S) を見出し、この変異TLR3を発現させたHEK 293が機能欠損蛋白であること、変異TLR3が野生型TLR3機能のある程度抑制することから、F303S変異TLR3がドミナントネガティブな機能不全TLR3であり、インフルエンザ脳症の一原因である可能性を示唆した<sup>7)</sup>。その後の易感染性などは認められず、また、TLR3 KO mouseでのインフルエンザ感染実験でも重症化しないことなどから、この変異が直接インフルエンザ脳症の原因かについては結論が出ていない。

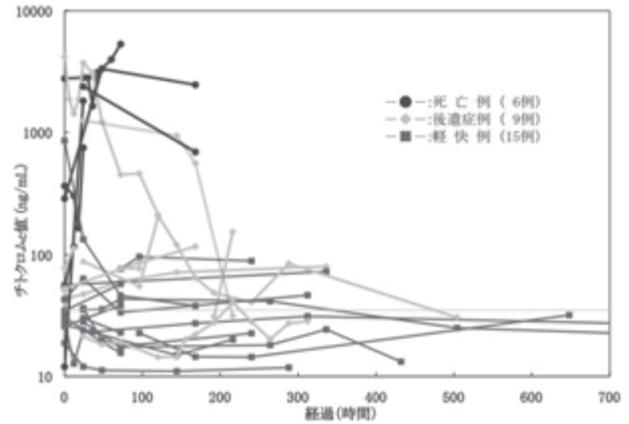


図4 急性脳症の経過観察症例における血清中のチトクロームC値の推移

図4では、測定条件を工夫して、ほぼ99%の回収が可能ことが確認されたため、正常値を改めて測定し、インフルエンザ脳症患者とインフルエンザ感染患者を検出する限界を35ng/mlと定めた。

(2) RanBP2変異によるインフルエンザ急性壊死性脳症症例：

Neilsonらは3世代11名の患者に発症した常染色体優性遺伝と考えられる幼年期初期（ほとんどは4歳以下）に発熱後に起こる特徴のある家族性ANE患者の全ゲノム解析を行い、その感受性因子としてRanBP2遺伝子にヘテロな遺伝子変異 (c.1880C/T, p.Thr585Met) を報告し、ANE1 (acute necrotizing encephalopathy-1) と命名した<sup>8)</sup>。RanBP2は核膜から物質の移動にかかわるポアを形成するGTP修飾を受ける蛋白質であるが、その異常とANE発症との関連は明らかではない。神経細胞でのミトコンドリア代謝にも関与しており、神経細胞のエネルギー代謝異常とANE発症との関係が考えられる。

(3) SCN1Aチャンネル異常：

齊藤らは、87名の急性脳症患者を解析し、3名の neuronal sodium channel alpha 1 subunit (SCN1A) チャンネル変異をもつ患者を明らかにしている。2名は急性脳症症状の前にけいれんを起こしていた。けいれんは遷延し、全身性のけいれんであった。1名はV982L変異をもち、部分てんかんのあとAESDを、2番目の患者は新規のM1977L変異をもち、熱性けいれんと急性脳症を、3番目の患者はR1575C変異をもち、ANEが判明するまで、けいれんは示さなかった。V982L変異とR1575C変異はDravet症候群で急性脳症を呈した症例として報告されていた<sup>9)</sup>。

(4) 小林らはAcute Encephalitis with Refractory, Repetitive Partial Seizures (AERRPS) を呈した

患者でSCN2AにM1128T変異をもつ患者を明らかにしている<sup>10)</sup>。

#### (5) その他

インフルエンザ脳症の原因遺伝子としては、脂質代謝にかかわるCPTIIの温度変異<sup>11)</sup>とアミノ酸代謝にかかわるMAT1のSNPs変異が報告されているが、インフルエンザ脳症ガイドラインでも詳しく鑑別疾患としてあげられている。

### 3. 上気道感染症から重症ARDS

インフルエンザ感染症では気管支炎・肺炎の合併症は頻度が高く、死亡原因の90%以上を占めている。インフルエンザ肺炎には、ウイルス性肺炎と、それに伴う細菌の二次感染を伴う肺炎があり、後者のほうが高頻度である。二次性肺炎のようなウイルスと細菌の重感染について、自然免疫による干渉現象が報告されていたが、最近の論文では、インフルエンザの細胞内リセプターであるRLR (RIG-I Like Receptor) を介したIRF3の誘導で、TLRシグナルからIL-12産生経路に抑制がかかることが、二次性肺炎を起こしやすい原因であることが明らかにされている<sup>12)</sup>。

一方、インフルエンザウイルス性肺炎では4-5日過ぎても高熱、咳が続き、呼吸困難、チアノーゼがみられるようになる(図1)。鳥インフルエンザ(H5N1)(H1N1pdmを含む)による肺炎の場合、上記のようにインフルエンザウイルス側のHA変異により、ヒトの肺胞上皮細胞にまで感染し、肺胞上皮細胞の機能不全となり、発熱から5-7日にP/F比が100を下るほどの激しい呼吸不全である急性呼吸促進症候群(acute respiratory distress syndrome; ARDS(ときに重症 sever fulminant ARDSと表現している))となり、呼吸不全で死亡する症例も報告されている。重症ARDSにかかわる宿主側の遺伝的要因については、ベトナムとの易感染性にかかわる遺伝子の包括的検討から、インフルエンザウイルスのリセプターを介する細胞内侵入を抑制するIFITM3 (Interferon-inducible transmembrane (IFITM) protein family3) 変異が明らかになり、IFITM3 KOマウスも作成され、重症ウイルス性肺炎を発症するという検証実験も報告されている<sup>13)</sup>。インターフェロンによるIFITM3の誘導はコレステロールの細胞質内取り込みの系を乱し、コレステロールのエンドソーム内への蓄積が起こってくると報告されている<sup>14)</sup>。

#### 治療と予後

インフルエンザ感染症の一般的な治療と重症型ARDSに関しては、「重症新型インフルエンザ診断と治療の手引き」2013<sup>15)</sup>を参照いただきたい。

インフルエンザ脳症の治療については、ガイドライン<sup>16)</sup>が2007年に作成されているので、ぜひご参照いただきたい。

### 4. インフルエンザウイルス側の要因

インフルエンザウイルスは「エンベロープをもつ、マイナス鎖の一本鎖RNAウイルス」と分類されるオルトミクソウイルス科に属し、表面抗原によりA型、B型、C型インフルエンザウイルスの3属がある。おのおのの抗原性、病態的、形態的違いがあるが、遺伝子上は、A型、B型のゲノムは8分節、C型のゲノムは7分節に分かれた遺伝子構造をしている。A型インフルエンザウイルスの遺伝子がコードしているタンパク質はHA、NA、PA、PB1、PB2、M、NP、NSである(備考参照)。MとNSの2つの分節からは選択的スプライシングによって、それぞれM1とM2、NS1とNS2の2種類が合成され、合計10種類のタンパク質が合成されることになる。このうちNS1を除く9種類のタンパク質は、ウイルス粒子が構築されるときにその内部に取り込まれるが、NS1は取り込まれない(このため非構造タンパク質と呼ばれた)。

インフルエンザウイルスは、ほかの上気道感染を示すウイルスと違い、人畜共通感染症であり、カモなどの水鳥を自然宿主として、鳥由来の遺伝子が、おもに豚を介することにより、人に感染しやすいウイルスに変化し(不連続変異; 抗原シフト)、世界的な流行を示してきたことが知られている。これまでヒトに感染できるウイルスは、1918年に世界的な流行を起こしたスペインかぜ(H1N1)、1957年にはアジアかぜ(H2N2)、1968年に香港かぜ(H3N2)、1977年にはソ連かぜ(H1N1)などで、世界的な流行をし、新型のインフルエンザが流行するたびに多くの死者が出たことも知られている。現在のようなヒトの往来が激しい時代では、瞬間に、世界で流行し、多くの死者が出ることが予測される。また、インフルエンザウイルスは「マイナス鎖の一本鎖RNAウイルス」のため、変異が起こりやすく、毎年少しずつ遺伝子変化が加わることで(連続変異; 抗原ドリフト)変異が起きた部位がたまたまウイルスの感染性や毒性にかかわる重要な部位である場合にはウイルスの性質が大きく変わる。また、小さな

変異が積み重なった結果としてウイルスの抗原性が変化すると、従来のウイルスに対する抗体と反応しにくくなり、これが新型ウイルスの流行を起こすきっかけになる。WHOなどは全世界における新型ウイルスの発生を、各地でモニターし、警戒監視している。

インフルエンザウイルスのもつ病原性は、上述のように、1) HAと宿主レセプターにより規定され、宿主域は最初の種の壁となっている。HAのレセプター特異性、HAの開裂による膜融合活性の違いから病原性および宿主域が規定されるという報告が多い。河岡らは肺胞上皮細胞に対するH5N1インフルエンザウイルスのシアル酸を末端にもつ糖鎖レセプター特異性について検討し、ヒトの呼吸器の深部にはSA  $\alpha$ 2, 6Gal (ヒトウイルスのレセプター) のみならずSA  $\alpha$ 2, 3Gal (鳥ウイルスのレセプター) が存在すること、一方、上気道では、SA  $\alpha$ 2, 6Galレセプターのみ発現していたこと、H5N1ウイルスがヒトからヒトへ効率よく伝播するために、ウイルスのHA分子の2つのアミノ酸変異 (Asn182-Lys、Gln192-Arg) が関与していると結論している<sup>17)</sup>。

ついで 2) 哺乳類細胞の宿主因子と適応できるポリメラーゼに変異 (PB2のG627変異、最近ではほかの変異も報告されているが) の有無で、異なる種で増殖し、病原性を示すウイルスとなるかが決定されることや<sup>18)</sup>、3) 細胞傷害性に関与するウイルス因子として、PBI-F2 (アポトーシス誘導) やNS1 (インターフェロン抵抗性) が報告されている。NS1のRNA結合モチーフ (G184R) はIFN誘導を抑制するのに決定的に関与し、ウイルス病原性を増大させることが報告されている<sup>19)</sup>。

備考：HA (ヘマグルチニン)、NA (ノイラミニダーゼ)、PA (RNAポリメラーゼ  $\alpha$  サブユニット、RNA polymerase  $\alpha$ )、PBI (RNAポリメラーゼ  $\beta$  1サブユニット、RNA polymerase  $\beta$  1)、PB2 (RNAポリメラーゼ  $\beta$  2サブユニット、RNA polymerase  $\beta$  2)、M (マトリクス蛋白、matrix)、NP (核蛋白、nucleoprotein)、NS (非構造蛋白、non-structure)

## おわりに

この10-15年で急性脳症の病態と病型分類が進み、さらに一部では遺伝子変異も明らかになり、やっと急性脳症も病因による医学的な治療も考えられるようになってきた。最近、Oldstoneらはインフルエンザ感染に伴う激しいcytokine stormがヒトでもマウ

スでも死亡原因になっていることから、プロスタグランジンやロイコトリエン、血小板活性化因子 (platelet activating factor; PAF) と同じく“脂肪メディエーター”の一つであるsphingosine-1-phosphate (S1P) レセプター作動物質がこのcytokine stormを抑制できることを証明し、マウスのインフルエンザ感染実験で、タミフルと一緒に投与すると明らかな生存率の改善が得られたと報告し、注目されている<sup>20)</sup>。このように新たな病態解析に基づく、治療法が医療の現場で実用されることを期待している。

## 文献

- 1) Dawood FS, Iuliano AD, Reed C, et al.: Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study. *Lancet Infect Dis* 12 (9) : 687-695, 2012.
- 2) Nuno H, Mercado MR, Mizukami T, et al.: Apoptosis under hypercytokinemia is a possible pathogenesis in influenza-associated encephalopathy. *Pediatr Int* 47 (2) : 175-179, 2005.
- 3) Phung TT, Sugamata R, Uno K, et al.: Key role of regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted, nonstructural protein1 and myeloperoxidase in cytokine storm induced by influenza virus PR-8 (A/H1N1) infection in A549 bronchial epithelial cells. *Microbiol Immunol* 55 (12) : 874-884, 2011.
- 4) 難治性疾患克服研究事業 平成22年度研究報告 重症・難治性急性脳症の病因解明と診療確立に向けた研究 水口雅班長「急性脳症の全国実態調査」
- 5) 布井博幸, 細矢光亮, 塩見正司ほか: 血清中チトクロム c 測定キットの急性脳症診断における臨床的評価. *医学と薬学* 61 (2) : 245-251, 2009.
- 6) 水口雅: 急性脳症一発症の遺伝的背景一. *NEUROINFECTION* 18:54-59, 2013.
- 7) Fumio Hidaka, Susumu Matsuo, Tatsushi Muta, et al.: A missense mutation of the Toll-like receptor 3 gene in a patient with influenza-associated encephalopathy. *Clinical Immunology* 119 : 188-194, 2006.
- 8) Neilson DE, Adams MD, Orr CM, et al.: Infection-triggered familial or recurrent cases of acute necrotizing encephalopathy caused by mutations in a component of the nuclear pore, RANBP2. *Am J Hum Genet.* 84 (1) : 44-51, 2009.

- 9) Saitoh M, Shinohara M, Hoshino H, et al.: Mutations of the SCN1A gene in acute encephalopathy. *Epilepsia* 53 (3) : 558-564, 2012.
- 10) Katsuhiko Kobayashi, Hiroki Ohzono, Mayu Shinohara, et al.: Acute encephalopathy with a novel point mutation in the SCN2A gene. *Epilepsy Res* 14: 102 (1-2) : 109-112, 2012.
- 11) Kubota M, Chida J, Hoshino H, et al.: Thermolabile CPT II variants and low blood ATP levels are closely related to severity of acute encephalopathy in Japanese children. *Brain Dev* 34 (1) : 20-27, 2012.
- 12) Negishi H, Yanai H, Nakajima A, et al.: Cross-interference of RLR and TLR signaling pathways modulates antibacterial T cell responses. *NATURE IMMUNOLOGY* 13 (7) : 659-668, 2012.
- 13) Aaron R. Everitt, Simon Clare, Thomas Pertel, et al.: IFITM3 restricts the morbidity and mortality associated with influenza. *Nature* 484 : 519-523, 2012.
- 14) Samad Amini-Bavil-Olyaei, Youn Jung Choi, Jun Han Lee, et al.: The Antiviral Effector IFITM3 Disrupts Intracellular Cholesterol Homeostasis to Block Viral Entry. *Cell Host and Microbe* 13 (4) : 452-464, 2013.
- 15) 「重症新型インフルエンザ診断と治療の手引き」メデイカル・サイエンス・インターナショナル 2013春刊行
- 16) インフルエンザ脳症ガイドライン改訂版 平成21年 厚生労働省 インフルエンザ脳症研究班 班長 水口雅
- 17) Yamada S, Suzuki Y, Suzuki T, et al.: Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors, *Nature* 444 : 378-382.
- 18) Shinya K, Hamm S, Hatta M, et al.: PB2 amino acid at position 627 affects replicative efficiency, but not cell tropism, of Hong Kong H5N1 influenza A viruses in mice. *Virology* 320 (2) : 258-266, 2004.
- 19) Steidle S, Martínez-Sobrido L, Mordstein M, et al.: Glycine 184 in the non-structural protein NS1 determines virulence of influenza A virus strain PR8 without affecting the host interferon response, *J. Virol* 84 (24) : 12761-12770, 2010.
- 20) Oldstone, M.B.A, Teijaro, J.R, Walsh, K.B, et al.: Dissecting influenza virus pathogenesis uncovers a novel chemical approach to combat the infection, *Virology* 435 (1) : 92-101, 2013.

## 特別講演 1

## ポリオウイルスの神経指向性のメカニズム

小池 智

【要旨】ポリオウイルスは急性灰白髄炎（小児マヒ）の原因となるウイルスである。ポリオウイルスはヒトを自然宿主とし、実験的には旧世界霊長類に感染が可能であるが、その他動物には感染しない。ヒトの感染においては経口的に体内に侵入し、消化管での増殖、ウイルス血症を経て中枢神経系に到達し、脊髄前角の運動神経細胞等に感染して重篤な病変を生じさせる場合がある。しかし、神経組織以外では際立った病理学的変化を引き起こすことがない。ポリオウイルスはこのように際立った種ならびに組織特異的な感染を示す。本稿ではこのような特異的な感染が成立するメカニズムについて、これまでにわれわれが行ってきた研究成果を主として概説する。

**Key Words:** ポリオウイルス、小児マヒ、運動神経細胞、ポリオウイルスレセプター、インターフェロン

## 1. ポリオウイルスの構造、複製と病理

ポリオウイルスはピコルナウイルス科エンテロウイルス属に属し、エンベロープをもたず、VP1、VP2、VP3、VP4の4種類のカプシドタンパク質と約7,500塩基からなる1本のプラス鎖RNAからなる。VP1、VP2、VP3がウイルス粒子の表面に、VP4は粒子の内側に存在する<sup>1)</sup>。ウイルスは正二十面体構造をとり、表面の飛び出た部分などが中和抗体のエピトープとなっており、抗原性の異なった3つの血清型が存在する。5回対称軸の周りにはキャニオンと呼ばれるくぼみが存在しており、ここがポリオウイルスウイルス受容体（poliovirus receptor; PVR）と結合する部位である。ウイルスと受容体との結合はのちに述べるように種特異性を決定する。

培養細胞レベルで、ウイルスのライフサイクルの概要はすでに明らかになっている（図1）。ウイルスの複製は感受性細胞の表面に存在するPVRと結合し、細胞内へ侵入したのちに脱殻する。細胞質に放出されたRNAからウイルスタンパク質の翻訳が開始される。ウイルス遺伝子の前半にはウイルス粒子を構成するカプシドタンパクが、後半にはウイルス複製に働くタンパク質がコードされており、ポリプロテインと呼ばれる1つのタンパク質として翻訳される。各ウイルスタンパクはプロテアーゼ2A、

または3Cにより切断されて機能的な最終産物となる。これらの複製に必要なタンパク質と宿主因子を用いて、ウイルスのRNAの複製が起こる。初めにプラス鎖を鋳型にマイナス鎖が合成され、さらにそれを鋳型としてプラス鎖の合成が起こる。プラス鎖RNAは再び翻訳に用いられる。その結果カプシドタンパク質とプラス鎖RNAが大量に蓄積し、会合して子孫ウイルス粒子が形成される。感染細胞は死滅し、子孫粒子を放出する。

個体レベルにおいては、ポリオウイルスはヒトを自然宿主とし、主として糞口感染により伝播する。ウイルスの経口摂取から最終標的である中枢神経系で増殖するまでの過程は、現在の免疫組織化学など

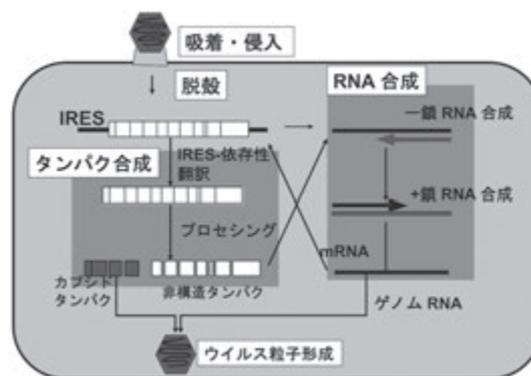


図1 ポリオウイルスの複製過程

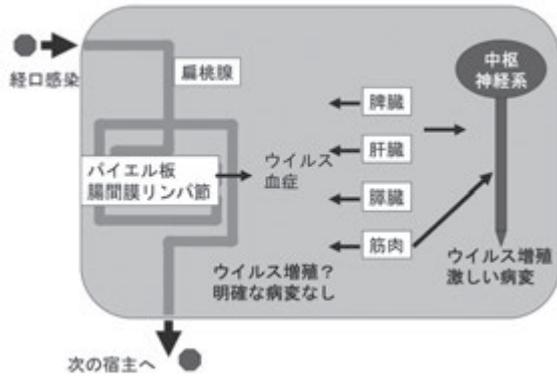


図2 ヒトにおけるポリオの発症病理  
(Bodian 1955 Scienceを改変)

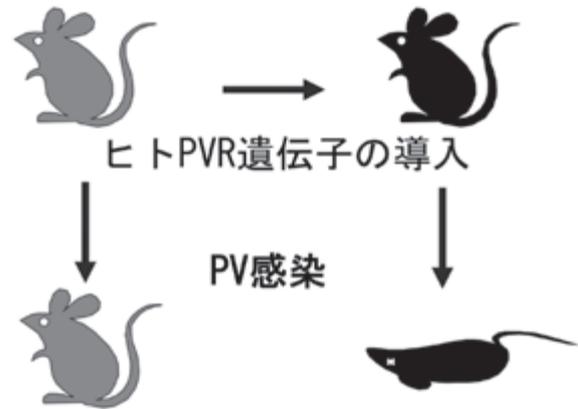


図3 PVR-tgマウスの作製

の手法が確立される以前にBodianやSabinらによってヒトの症例、チンパンジーやサルを用いた動物実験の結果からつぎのようであるとされた(図2)<sup>24)</sup>。ただし、今日的な実験手法が確立される以前の実験であるため、証明が不十分な部分がある。体内に侵入したポリオウイルスは初めに咽頭や小腸などの消化管で増殖する。増殖したウイルスは扁桃腺、パイエル板、腸間膜リンパ節などのリンパ組織で増殖し、ここから血中に入りウイルス血症となる。体内のさまざまなウイルス感受性細胞でウイルスが増殖しウイルス血症が成立するが、正確な増殖部位は不明である。リンパ節においても顕著な病変やウイルス抗原の検出はされておらず、実験的に感染したチンパンジーの組織などから少量のウイルスが分離できたことから増殖したと考えられている。糞便からかなり多量のウイルスが排出されるが、腸全体がウイルス感染によって激しい病変を起こすことは少ない。すなわちポリオウイルスは非神経系組織では爆発的に増殖することはない。野生株に感染したとしてもほとんどの場合、中枢神経系まではウイルス感染がひろがらず、不顕性感染や感冒症状で終わる場合が多い。

免疫されていないヒトが野生株に感染した場合ではウイルスが中枢神経系に到達するが、その確率は1%未満とされている。ポリオウイルスは血行性に血液・脳関門を通過するか、神経・筋接合部などの末梢から神経細胞の軸索を逆行性に輸送されて中枢神経系に到達するとされている。最悪の場合中枢神経系ではウイルスが神経細胞で爆発的に増殖してこれを破壊し、重篤な病理変化を引き起こしマヒあるいは死にいたる。どの神経細胞にも同様に感染が起こるわけではなく、脊髄前角の運動神経細胞がおもな標的となり四肢のマヒを生ずる。

## 2. 種特異性とウイルス受容体

マウス細胞などヒトやサル以外に由来する培養細胞ではポリオウイルスは感染できないが、ウイルスゲノムRNAをトランスフェクションすれば1回限りのウイルス粒子の産生が起こることはかなり以前から知られていた<sup>5)</sup>。この事実は、ポリオウイルスはマウス細胞ではウイルス受容体がないために吸着や侵入ができないが、ひとたび侵入さえ可能となれば複製は可能であることを意味している。マウス細胞にヒトHeLa細胞DNAをトランスフェクションするとポリオウイルス感受性を獲得した細胞が得られた<sup>6)</sup>。これはヒトPVR遺伝子がマウス細胞に導入されて発現したためにウイルス感受性を獲得したと考えられた。この形質獲得の原因となったDNAを同定することにより、PVRが同定された<sup>7,8)</sup>。PVRは3つの免疫グロブリンドメインをもつ膜タンパク質であり、現在ではCD155とも呼ばれる。N末端に位置する免疫グロブリンドメインがウイルスと結合し、ウイルス粒子に構造変化を誘起して脱殻反応を引き起こすことができる<sup>7,8)</sup>。PVR遺伝子のウイルス結合ドメインに相当するドメインを種間で比較すると、系統的に保存性が低いことが判明した。霊長類の間では90%以上保存されているが、マウス、ウサギなどのウイルス感受性をもたない動物種では50%程度しか保存されておらず、その結果ウイルス受容体としては機能できない<sup>9)</sup>。

このように細胞レベルにおいてはPVRがウイルス感染の種特異性を制御していることが証明されたが、個体レベルでの感染においてPVRは重要な働きをしているか否かがトランスジェニックマウスの作製によって検証された。マウスのCD155はウイルスと結合することができないのでポリオウイルス感受性をもたないが、マウスにヒトCD155を発現させ

ることによってマウスにウイルス感受性をもたらすことができた<sup>10,11)</sup> (図3)。PVR-tgマウスは脳内接種、腹腔内接種、静脈内接種によって脊髄前角の運動神経細胞を主とする神経細胞に感染し、ヒトと類似のマヒ症状を呈する。したがって個体レベルにおいてもPVRが種特異性を決定している分子であると結論づけられた。

PVRの発現によりヒトと類似の病態が再現できることから、PVRによって組織特異性も制御されているのではないかという期待が生まれた。ところが、ヒトにおけるPVRの発現パターン、tgマウスモデルにおけるPVRの発現パターンを詳細に検討すると、PVRは増殖可能な組織よりもより広範囲の組織や細胞に発現していることが判明した。したがって、ウイルスの組織特異性をPVRだけで説明することは不可能であり、それ以外のなんらかの因子とともに組織特異性が決定されていると思われた。ポリオウイルスの個体レベルでの感染についての研究は経口生ワクチンや不活化ワクチンの開発後、サル等を用いた研究が困難となったために、大きな進展がなかったが、PVRを発現するマウスモデルが開発され、個体レベルの実験がより容易になったこと、さまざまな遺伝子のノックアウトマウスが利用可能になったことによって大きく進展した。

### 3. ポリオウイルスの中樞神経系への輸送

ポリオウイルスが神経細胞へ感染するためには、中樞神経系へウイルスが到達しなければならない。中樞神経系は血液脳関門により物質の移動が制限されており、これに逆らったウイルスの侵入は容易ではないはずである。ポリオウイルスの中樞神経系へ到達する2つの経路が提唱されている。サルに受動免疫によってサルの血中に中和抗体が存在するとウイルス感染によってマヒの発症を抑えることができることから、古典的にはウイルスは血行性に中樞神経系に到達するとされていた<sup>12-14)</sup>。また、不活化が不完全なポリオワクチンを投与したために、ワクチン接種が発症した事例がある (カッター事件)<sup>15)</sup>。マヒはワクチンを接種した側の腕から現れたことから神経を逆行性に伝播することが考えられていた。マウスモデルを用いた実験から、それぞれの経路のメカニズムがある程度明らかになってきた。放射性同位元素で標識したポリオウイルスをPVR-tgマウスの静脈内へ接種し、経時的にウイルスの中樞神経系内へのウイルスの蓄積を薬物動態学の手法で調べるとウイルスは中樞神経系へ蓄積されることが分か

った。予想外にもPVRをもたないnon tgマウスにおいても同様の蓄積が観察された。すなわち、PVRとはまったく別に血液脳関門をこえてポリオウイルスを輸送するメカニズムがあるらしいことが明確になった<sup>16)</sup>。このメカニズムの分子の証明はまだされていない。

逆行性軸索輸送の機構はその分子メカニズムが明らかにされてきている。マウスモデルを用いて、筋肉内接種を行うと、接種側の後肢に初めのマヒが現れること、坐骨神経の切断によりそれがみられなくなるなどから、逆行性軸索輸送が実際にtgマウス個体内で起こっていることが証明された<sup>17)</sup>。さらに発症神経・筋接合部でウイルスがPVRと結合しシナプス小胞に取り込まれること、PVRの細胞質側ドメインが逆行性モータータンパク質である細胞質ダイニンと結合し、シナプス小胞ごと逆行性輸送されることなどが明らかにされている<sup>18,19)</sup>。このようにポリオウイルスは血液脳関門を積極的にこえていく性質をもっていることが明らかになってきた。

### 4. 中樞神経系選択的病原性とマウスモデルによるIFNの重要性の検証

ポリオウイルスの神経系選択的増殖メカニズムは、PVRの発現分布や、ウイルスゲノムの複製や翻訳機構に関与する宿主因子の発現分布などにより説明しようとする試みがされていたが、それを支持する証拠が得られなかった。われわれはいくつかの実験結果から、ウイルスが本来効率よく増殖しない組織では自然免疫によってウイルスが増えにくいのではないかと考えるにいたった。そこで初めにIFN  $\alpha/\beta$  レセプターを欠損しているノックアウトマウス (*Ifnar1*<sup>-/-</sup>)<sup>20)</sup> とPVR-tgマウスを交配してウイルスの病原性の変化を調べることにした<sup>21)</sup>。

*Ifnar1* を欠損したPVR-tgマウス (PVR-tg/*Ifnar1*<sup>-/-</sup>マウス) では、もともとのPVR-tgマウスと比較してウイルスに対する感受性が著しく増大し、静脈内接種や腹腔内接種をした場合にもきわめて少量のウイルスによってマヒが発症し死亡した。PVR-tg/*Ifnar1*<sup>-/-</sup>マウスでは本来の標的組織ではない肝臓、脾臓、膵臓、腎臓などにおいても大量のウイルスが増殖し、またウイルス抗原、病理変化も観察された (図4)。すなわちポリオウイルス本来の神経向性を失い、より広範囲な組織に対する向性を示すようになっていた。このことは肝臓や脾臓においてもウイルス複製に必要なPVRなどの宿主因子はすべてそろって発現していて潜在的にはウイルスが増殖可能

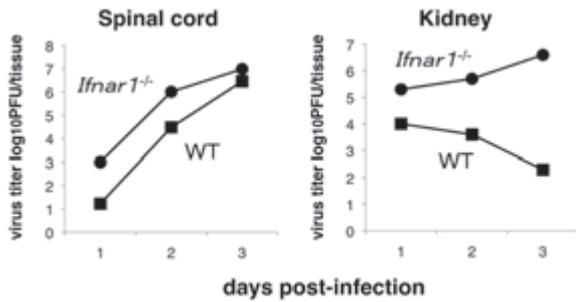


図4 野生型、*Ifnar1*<sup>-/-</sup>マウスにおけるウイルスの増殖

であるのだが、実際にはIFN系という増殖阻害機構が活発に作動しているために病理変化を起こすほどの増殖ができなかった可能性を強く示唆している。ポリオウイルス感染後のIFN-stimulated genes (ISGs) の発現上昇を調べると、非神経系組織ではISGの発現上昇がすみやかに起こるが、中枢神経系ではISG発現応答が他の組織と比較して鈍いことが判明した。すなわちI型IFN系はポリオウイルスの増殖を阻害することによってポリオウイルス特有の組織特異性を決定している負の制御因子であり、その作動の程度によって組織のウイルス感受性が決定されているという仮説にいたった(図5)。ウイルスが末梢から侵入して中枢神経系へ到達するという順番を考慮すると、IFNは非神経組織でウイルスの増殖を抑制することにより神経組織へのウイルスの到達を防いでいる壁の役割をしていることになる。ワクチン未接種のヒトが野生株のポリオウイルスに自然感染した場合においてもマヒ発症までにいたる割合が1%未満であり、不顕性感染や軽微な症状で感染がおさまることはIFNが自然免疫のバリアとして大きく寄与しているためであると考えられる。

近年、IFN誘導にかかわるRNAのセンサーが同定された。細胞質内RNAセンサーであるRIG-I-like receptorに属するRIG-I、MDA5とToll-like receptorに属するRNAセンサーTLR3、TLR7が同定され、それぞれのセンサーが異なった種類のRNAを検知していることが明らかになってきた<sup>22)</sup>。RIG-Iは5'末端に三リン酸構造(5'-ppp)をもつRNAや短いdsRNAを認識し<sup>23,24)</sup>、MDA5は長いdsRNAの認識を行う<sup>25)</sup>。TLR3、TLR7はそれぞれdsRNA、ssRNAを検知している<sup>26,27)</sup>。ウイルスRNAのセンサーが複数種類存在してそれぞれが異なった基質特異性を持ち、複製様式の異なるさまざまなウイルスを分担しながら検知することが宿主の防御戦略としては重要であると考えられる。

われわれはPVR-tgマウスとMDA5、RIG-I、あるいはTLR3、TLR7のアダプター分子であるTRIF、

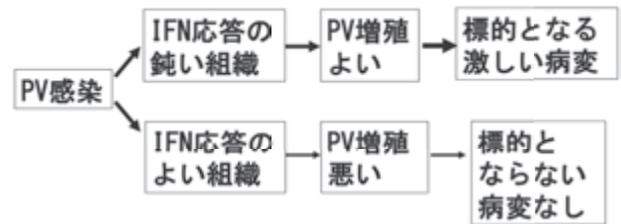


図5 IFN応答によるポリオウイルスのトロピズムの決定機構の仮説

MyD88欠損マウス、ならびにTLR3欠損マウスを交配し、ウイルス接種後のマウスの生存率、血中IFN、各臓器で増殖したウイルス量について野生型と比較した<sup>28)</sup>。*Trif*<sup>-/-</sup>、*Tlr3*<sup>-/-</sup>マウスの生存率は著しく低下し、*Myd88*<sup>-/-</sup>マウスもわずかな効果がみられた。*Trif*<sup>-/-</sup>・*Myd88*<sup>-/-</sup>マウスで最も大きな低下がみられ、その効果は*Ifnar1*<sup>-/-</sup>マウスとほぼ同等であった。また、ウイルス感染直後に誘導される血中IFNは*Trif*<sup>-/-</sup>、あるいは*Tlr3*<sup>-/-</sup>マウスでは観察されなくなり、組織におけるウイルス量は野生型マウスと比較して顕著に上昇し、*Ifnar1*<sup>-/-</sup>マウスのウイルス量と同等レベルにまで達した。すなわちTLR3経路はウイルス血症成立時にIFN産生を誘導し、非神経系の組織においてウイルス増殖を抑制し、中枢神経系へのウイルス到達を阻むことにより発症を抑える役割を果たしている最も重要なRNAセンサーであることが判明した。

## 5. 終わりに

ポリオウイルスの種特異的感染はウイルスと受容体との結合性によってコントロールされている。また、神経系選択的病原性発現にはウイルス受容体の発現だけではコントロールされておらず、非標的組織においてIFN応答によるウイルス増殖抑制機構が非常に重要な寄与をすることが判明し、さらにIFN応答を引き起こす中心的なセンサーがTLR3であることが明らかになってきた。自然免疫の重要性が指摘されたことにより、ポリオウイルスの感染者のうち大部分は不顕性感染で終わることなどが合理的に説明できるようになった。しかし、ノックアウトマウスを用いた実験は遺伝子型と表現系を結び付けているだけなので、詳細についてはまだまだ明らかでないことが多い。ポリオウイルスは現在根絶計画が進行し、感染者発生の可能性はますます低くなっている。そのため、研究成果を直接ポリオ感染症にはフィードバックすることは困難である。しかし、近年、近縁のエンテロウイルス71などによる中枢神経

感染症がアジア地域で大きな流行をみせている。ポリオウイルスの研究から明らかになったことをこのような近縁の感染症の研究に役立てられることを強く希望している。

### 謝辞

第18回日本神経感染症学会学術集会において特別講演として発表をさせていただき、さらに本稿執筆の機会を与えていただいた学会長布井博幸先生に深く感謝いたします。

### 文献

- 1) Raccaniello, V. Picornaviridae: The viruses and their replication. in *Fields Virology*, Vol. 1 (eds. Knipe, D.M., et al.) Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2007, 797-838.
- 2) Bodian, D: Histopathological basis of clinical findings in poliomyelitis. *Am.J.Med* 6 : 563-578, 1949.
- 3) Bodian, D: Emerging concept of poliomyelitis infection. *Science* 122 : 105-108, 1955.
- 4) Sabin, A.B: Pathogenesis of poliomyelitis; reappraisal in the light of new data. *Science* 123 : 1151-1157, 1956.
- 5) Holland, JJ, Mc, LL & Syverton, JT: The mammalian cell-virus relationship. IV. Infection of naturally insusceptible cells with enterovirus ribonucleic acid. *J Exp Med* 110 : 65-80, 1959.
- 6) Mendelsohn, C, et al.: Transformation of a human poliovirus receptor gene into mouse cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 : 7845-7849, 1986.
- 7) Mendelsohn, CL, Wimmer, E & Racaniello, VR: Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell* 56 : 855-865, 1989.
- 8) Koike, S, et al.: The poliovirus receptor protein is produced both as membrane-bound and secreted forms. *EMBO J* 9 : 3217-3224, 1990.
- 9) Ida-Hosonuma, M, et al.: Host range of poliovirus is restricted to simians because of a rapid sequence change of the poliovirus receptor gene during evolution. *Archives of virology* 148 : 29-44, 2003.
- 10) Koike, S, et al.: Transgenic mice susceptible to poliovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 : 951-955, 1991.
- 11) Ren, RB, Costantini, F, Gorgacz, EJ, et al.: Transgenic mice expressing a human poliovirus receptor: a new model for poliomyelitis. *Cell* 63 : 353-362, 1990.
- 12) Bodian, D: Experimental studies on passive immunization against poliomyelitis. I. Protection with human gamma globulin against intramuscular inoculation, and combined passive and active immunization. *Am J Hyg* 54 : 132-143, 1951.
- 13) Bodian, D: Experimental studies on passive immunization against poliomyelitis. II. The prophylactic effect of human gamma globulin on paralytic poliomyelitis in cynomolgus monkeys after virus feeding. *Am J Hyg* 56 : 78-89, 1952.
- 14) Bodian, D: Experimental studies on passive immunization against poliomyelitis. III. Passive-active immunization and pathogenesis after virus feeding in chimpanzees. *Am J Hyg* 58 : 81-100, 1953.
- 15) Nathanson, N & Langmuir, AD: The Cutter Incident. Poliomyelitis Following Formaldehyde-Inactivated Poliovirus Vaccination in the United States During the Spring of 1955. II. Relationship of Poliomyelitis to Cutter Vaccine. *Am J Hyg* 78 : 29-60, 1963.
- 16) Yang, WX, et al.: Efficient delivery of circulating poliovirus to the central nervous system independently of poliovirus receptor. *Virology* 229 : 421-428, 1997.
- 17) Ohka, S, Yang, WX, Terada, E, et al.: Retrograde transport of intact poliovirus through the axon via the fast transport system. *Virology* 250 : 67-75, 1998.
- 18) Ohka, S, et al.: Receptor (CD155)-dependent endocytosis of poliovirus and retrograde axonal transport of the endosome. *J Virol* 78 : 7186-7198, 2004.
- 19) Ohka, S, et al.: Receptor-dependent and -independent axonal retrograde transport of poliovirus in motor neurons. *J Virol* 83 : 4995-5004, 2009.
- 20) Muller, U, et al.: Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 264 :

- 1918-1921, 1994.
- 21) Ida-Hosonuma, M, et al.: The alpha/beta interferon response controls tissue tropism and pathogenicity of poliovirus. *J Virol* 79 : 4460-4469, 2005.
  - 22) Takeuchi, O & Akira, S: Innate immunity to virus infection. *Immunological reviews* 227 : 75-86, 2009.
  - 23) Hornung, V, et al.: 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 314 : 994-997, 2006.
  - 24) Pichlmair, A, et al.: RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* 314 : 997-1001, 2006.
  - 25) Kato, H, et al.: Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *The Journal of experimental medicine* 205 : 1601-1610, 2008.
  - 26) Alexopoulou, L, Holt, AC, Medzhitov, R et al.: Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413 : 732-738, 2001.
  - 27) Diebold, SS, Kaisho, T, Hemmi, H, et al.: Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303 : 1529-1531, 2004.
  - 28) Abe, Y, et al.: The toll-like receptor 3-mediated antiviral response is important for protection against poliovirus infection in poliovirus receptor transgenic mice. *J Virol* 86 : 185-194, 2012.

## 特別講演 2

## ベトナムの小児の医療状況と感染症情報

Pham Nhat An<sup>1</sup>、Thuy T.B<sup>1</sup>、Phan Huu Phuc<sup>1</sup>、  
Le Thanh Hai<sup>1</sup>、布井博幸<sup>2</sup>

【要旨】 ハノイ国立小児病院で5年間における2,565名の脳炎髄膜炎患者調査では、ウイルス性は34%、細菌性2%、寄生虫2%、非感染性は約1%で、培養、抗体価やPCR検査でも確定できなかった患者は約60%であった。病因が特定できたものでは、日本脳炎ウイルス、エンテロウイルス、単純ヘルペスウイルス、EBウイルス、サイトメガロウイルスの順であった。ウイルス性脳炎脳症では、特に日本脳炎の発生率がいまだ高く、予防接種率の向上が重要である。つぎに多いEV脳炎脳症に関しては、まだEV71予防接種が開発されておらず、十分な対策が立っていない状態である。細菌性髄膜炎は全体では2%しか占めていないが、予防接種にかかわらず、*S.pneumoniae*が55-60%の髄膜炎の病原菌であり、まだ抗生剤感受性は保たれていた。細菌性髄膜炎の重症因子として、痙攣（72時間以上続く）、髄中グルコース低下、抗生剤治療後の髄液無菌化の遅れや髄膜炎による合併症、および患児の栄養失調状態が罹患率や死亡率を増大させていた。

**Key Words:** ハノイ国立小児病院、脳炎髄膜炎患者調査、PCR診断、日本脳炎、EV71脳幹脳炎

## A. はじめに

ベトナムにおける小児医療状況は小児の衛生統計に示すように（表1）、1歳以下の死亡率は急速に改善し、感染性疾患による死亡率も低下している。一方で、事故や非感染性の疾患による死亡率が上昇している（図1）。WHOの2001年の統計からみると、ベトナムにおける国内総生産高（GDP）に対する1歳以下の子どもたちの生存率は960名をこえており、GDPが4-5倍のトルコやメキシコと同等であり、GDPがほぼ同じラオス（<910名）やギニア（<880名）にくらべるとよい状況である（図2）。

しかし、なお感染による死亡が多いことから、ベトナムで問題となっている神経感染症の事情について、その現状と対策を検討した。

ハノイ国立小児病院（National Hospital of Pediatrics: NHP、図3）は1969年7月14日に5分野、123ベッド、200名のスタッフで開院された。現在は1,150ベッドで、1,519名のスタッフ（医師337名、ナース663名、薬剤師33名、その他486名）で、29臨床部門、11研究室、1研究施設になっている。ハノイ国立小児病院におけるこの2002年から2011年の10

年間で入院患者数は約2.3万人から5.8万人へ、また外来患者数は17.6万から61.8万へ、手術件数は5,100から13,400へ増加している。そのためかベッドに対する患者数が160%とオーバーになっている。1000出生に対する新生児死亡率は2000年の16.39から2009年には4.49と改善している。心疾患手術は1,000例をこえている。肝移植、腎移植、骨髄移植も成功している。

感染症部門は小児科医16名（教授、PhD5名、感染症所属ドクター10名）、看護師42名、医療スタッフの総計58名で運営されている。年間入院患者は

表1 Some Health Data

DATA	2001	2010
Life Expectancy	68	73
Mortality of < 1 Y O	35	15,8
Mortality of < 5 Y O	42	25
Rate of < 2,500gr Newborn	7.1	5.1
Rate of Complete Vaccination for children	97 (6 vaccines)	95 (7 vaccines)
Rate of the MD/10,000 habitants	4	7
Rate of the Hospital bed/ 10,000 habitants	17,71	20,5

1：ハノイ国立小児病院（ベトナム）

2：宮崎大学小児科（〒889-1692 宮崎県宮崎市清武町木原5200）

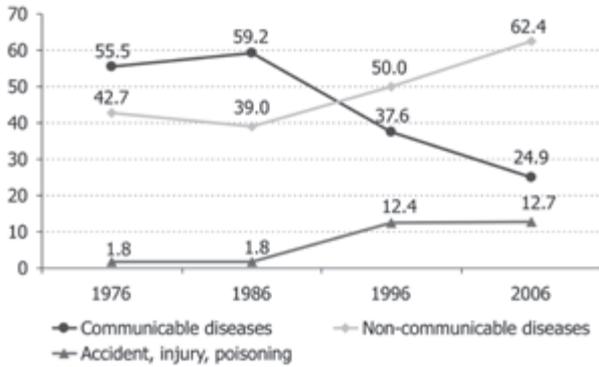


図1 Variations disease pattern in Vietnam in 10 years



図3

表2 Etiology of Acute Encephalitis

Etiology	Number	%
UNKNOWN ORIGIN	1,554	60.58
VIRAL	874	34.07
Bacterial	58	2.26
Parasite	51	1.99
Rickettsia	3	0.12
Fungal/HIV/AIDS	4	0.16
Non Infection (ADEM, Vaccine related, toxic - acute lead poisoning)	21	0.82
total	2,565	



図2

2,500-3,500名であり、おもな疾患は脳炎脳症400-500名、髄膜炎が150-200名で、流行状況により、手足口病、肝炎、敗血症であり、政府事業として手足口病の統計やベトナムにおける死亡統計などを、国際協力事業として日本（金沢大学）や米国（ハーバード大学）と共同研究を行っている。

### B. 研究方法

ハノイにおける神経感染症統計:感染症情報（特に神経感染症）について、2008年から2012年のベトナムの小児医療状況について解析した<sup>1)</sup>。

脳炎脳症：2008年から2012年の5年間における脳炎脳症患者2,565名を対象にその病因検索を髄液検査、頭部CT、MRI検査を行い、細菌培養、抗体検査、PCR検査にて行った。

ハノイ国立小児病院でのウイルス検査は multiplex PCR検査を行い、そのあとに細菌およびウイルス培養なども行われている<sup>2)</sup>。培養ができない場合はPCR検査の結果を採用している。PCR検査

については髄液および抹消血が用いられており、2012年から全自動DNA、RNA抽出器が導入され、最近ロタウイルスの流行期には1日3回の合計200-300検体の検査がreal time PCRや定性的PCRで行われている。2012年前まではまた医師の指示で個々のPCRウイルス解析が行われている。一部では血清抗体価測定によって行われている。基本的には呼吸系ウイルス（Respiratory virus: RSV, influenza A&B with subtype H1, H3, H5, H1s, Rhino virus, adenovirus）、髄膜炎脳炎ウイルス（HSV1&2, VZV, EV, Rubella, CMV, EBV, EV71）はPCRを、CMVとEBVは定量的PCRを、その他結核菌および *M. pneumoniae*、*C. pneumoniae*、*Hib*、*S. pneumoniae*、*E.coli*、*Klebshera*の培養を行っている。

脳炎脳症の基準はSIRSの定義（下記）を満たし、意識障害を呈した患者とした。

SIRSの定義は以下の2項目以上が該当するものとしている。(1) 体温 >38℃ または <36℃、(2) 心拍数 >90/min、(3) 呼吸数 >20/min または PaCO<sub>2</sub> : <32Torr、(4) 白血球数 >12,000/mm<sup>3</sup>、または <4,000/mm<sup>3</sup>、あるいは未熟顆粒球 >10%

表3 Etiology Structure of AE of Defined Group

Etiology	Numbers	%
Viral	874	86,45
Bacterial	58	5,74
Parasite	51	5,04
Rickettsia	3	0,3
Fungal/HIV/AIDS	4	0,4
Non infection (ADEM, Rasmussen, Vaccine related, toxic – poisoning)	21	2,08

表4 Etiology of Encephalitis / five years of follow- up

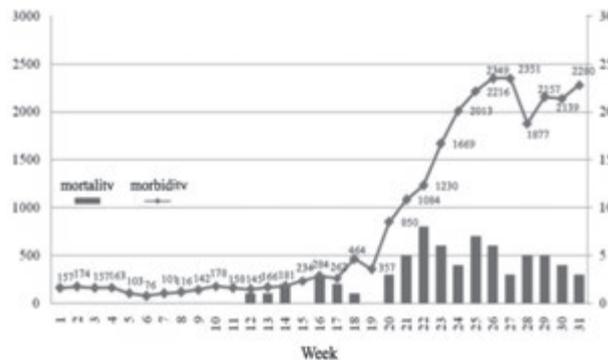
	HSV1	JE	EV	EBV	CMV	Rubella	Others	Defined total	Σ
2008	30	94	19	11	3		13	170	371
2009	21	69	92	13	7		19	221	515
2010	27	79	15	30	9		26	186	514
2011	33	54	12	7	3	103	33	245	600
2012	47	60	22	7	7		46	189	565
Σ	158	356	160	68	29	103	137	1011	2565

C. 結果

ハノイ国立小児病院における2008年から2012年の5年間に於ける脳炎脳症の病因検索結果(表2、3)で脳炎髄膜炎患者は2,565名であった。そのうち、培養、抗体価やPCRでも確定できなかった患者は1,554例(60%)であった。病因の明らかになったほとんどはウイルス性で874例(34%)、その他は137例(5.34%;細菌性2%, 寄生虫1%, 非感染性は約1%)であった。

1. ウイルス性神経感染症

- 1) 特定できた病因ウイルス(表4)は、日本脳炎ウイルス、エンテロウイルス、単純ヘルペスウイルス、EBウイルス、サイトメガロウイルスの順であった。風疹ウイルスが2011年に流行し、先天性風疹症候群患者による脳炎が多数認められたが、その1年だけであった。
- 2) 2011年夏にはエンテロウイルス71による手足口病の流行とそれに伴う死亡者報告(図4):2012年の最初の7ヵ月で63,789例の手足口病患者が記録された。58.7%はEV71であった。
- 3) 日本脳炎、HSV1、EV、Cryptococcus



Morbidity and Mortality of HFMD in Vietnam in 2011 by weeks

図4 Why EV71 Vaccine Development needed?

表5 Some data of Vaccination at provinces

Data of first 9 months in 2012: (Ratio completed expended vaccination to children under 1 YO / HBV to Newborn)	
1. Hà Nội:	80.4 / 54.4
2. Hải Phòng:	77.5 / 57.6
3. Thái Bình:	77.2 / 69.4
.....	
15. Bắc Cạn:	76.4 / 40.0
16. Quảng Ninh:	79.6 / 46.6
17. Hoà Bình:	75.2 / 35.0
..... ( data of National vaccination Program Commutee)	

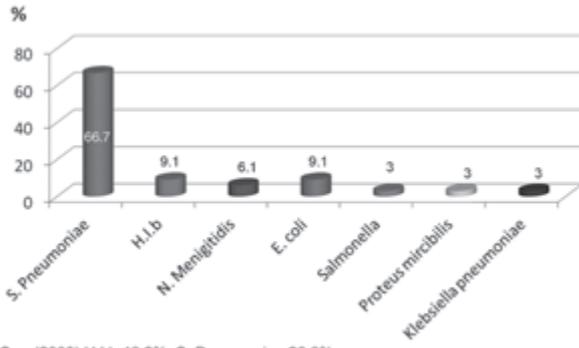
Neoformans、Neurocysticercosis、Toxoplazma等による脳炎や結核性髄膜炎の症例が提示された。

- 4) ベトナムでのワクチン接種については生後1ヵ月でBCG、HBVを、生後2、3、4ヵ月で3種混合(DTaP)、B群インフルエンザ菌ワクチン、肺炎球菌ワクチンを、また生後9ヵ月に麻疹、(流行性耳下腺炎、風疹)ワクチンが定期接種に定められている。1歳に日本脳炎ワクチンとバリセラワクチンが施行されている。しかし、実際はRotavirus、HVA、インフルエンザ、肺炎球菌ワクチンなどは各地域により接種率には幅があり、HBV接種が35-69%で、ほかの予防接種は75-80%にとどまっている(表5)。

2. 細菌性髄膜炎

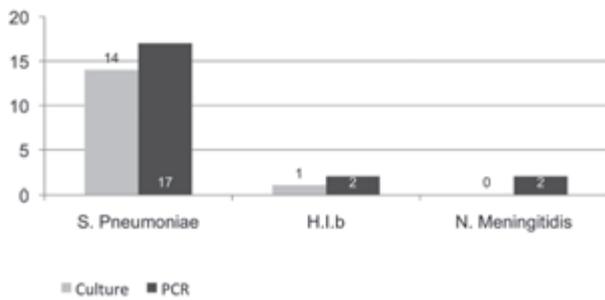
細菌性髄膜炎はスコア値(SF Gram染色陽性2点、髄液蛋白>80mg/dl 1点、髄液中白血球>1点、抹消血白血球数1点、痙攣1点)することにより、0点では細菌性髄膜炎を完全否定、1点では無菌性髄膜炎または髄膜刺激症状、2-6点では恐らく細菌性髄膜炎と診断した。

- 1) 2008年から2012年までの5年間で664例(133



H. Son (2008) H.i.b 46,2%; S. Pneumoniae 28,8%.  
NV Lam (2003-2008): Hib 64%; S. Pneumoniae 19%

図5 Etiology Structure



Papavasiliou (2011) PCR 78,6%, ぬい cily 21,4%

図6 Compare sensitivity of CSF culture and PCR test in 2012

例・年)の細菌性髄膜炎患者が入院した。細菌性と診断できた症例は321名で、そのうち275例が細菌培養にて培養でき、46名がPCRで細菌性髄膜炎を検出している。男女比は1.36/1で、男性に多かった。年齢別では1歳以下が71.4%、1-2歳で11.9%、2-5歳では5.6%であった。季節では4月から12月までに多かった。病原菌としてS. Pneumoniae, H.Influenza, N.Meningitids, E.coli, Salmonella, Proteus mirabilis, Klebsiella pneumoniaの順に多かった(図5)。

2) 髄液検査では白血球増多 (<math><100/\text{mm}^3</math>)が68.3%、髄液蛋白増加 (>0.8g/l)が88.9%、髄中高グルコース (>2.2 nmol/l)が69.8%と多かった。

3) 髄液中の細菌培養とPCRによる感度の比較(図6): S. Pneumoniae, H.Influenza, N. Meningitidsのいずれにおいても、PCRのほうがやや感度がよかった。

4) S. Pneumoniaeの抗生剤感受性(表6): Amoxicillin, Cefotaxim, Ceftriaxonへの感受性は保たれていた。Vancomycin, Levofloxacinにはいずれも良好な感受性を示した。読影では

表6 Antibiotic resistance of S. Pneumoniae

Antibiotic	S		I		R	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Penicillin					14	100
Amoxicillin	9	64,3	3	21,4	2	14,3
Cefotaxim	4	28,6	9	64,3	1	7,1
Ceftriaxon	6	42,9	6	42,9	2	14,2
Erythromycin					14	100
Vancomycin	14	100				
Levofloxacin	14	100				

N. V. Lâm (before 2009) Penicillin Resistance 25%; ; All sensitive to Cefotaxim, Ceftriaxon

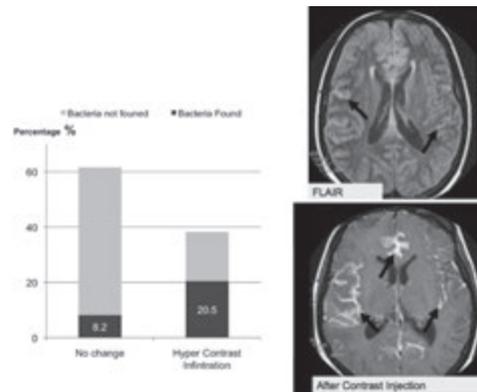


図7 Hyper contrast infiltration to Meninges

造影にてHyper contrast Infiltrationの傾向を認める症例が40%で細菌培養陽性者が20%であった(図7)。Subdural Effusionが約30%でそのうち13.7%が細菌培養陽性者であった。脳室拡大が同様に約30%で認められ、その半分が細菌培養陽性者であった。

5) 病因の変化 S.pneumoniaeがおもな病原菌であり、H.Influenza, N.Meningitidsと続いていた。新しい病原菌として、Elizabeth Kingia, Buckhoderiaが認められた。

6) PCRは細菌培養が陰性だった症例で、有効であったが、抗生剤治療後でも、継続してPCR陽性であった。

### D. 考察

ハノイ国立小児病院で5年間における脳炎髄膜炎患者は2,565名で、ウイルス性は34%、細菌性2%、寄生虫2%、非感染性は約1%で、培養、抗体価やPCR検査でも確定できなかった患者は約60%であった。

ハノイ小児国立病院の小児感染症部門で病因が特

定できた脳炎脳症では日本脳炎ウイルスが最も多かった(図3)。その原因として1) 提供されている日本脳炎ワクチンがベトナムで製造されているものと、諸外国で作成されたものが混乱していること、2) 2012年から接種が無料化したものの国内生産のワクチンでその実績がまだ十分検討されていないこと、3) 5歳以上ではワクチンの接種が有料であり、4) 3回接種を完了できていない子どもが多いことが考えられた。EV71ウイルスは重症の問題などがまだ十分解決されておらず、抗原性も強くないが、現在中国、台湾、シンガポールの企業でのEV71ワクチン開発が急がれている。しかし、まだ治験段階である。風疹の流行がワクチン接種により翌年から重傷者や死亡率を抑制できたことは予防接種の重要性を示している。

細菌性髄膜炎では肺炎球菌ワクチン接種にかかわらず、*S.pneumoniae*は55-60%の髄膜炎の病原菌であり、また適切で迅速な抗生剤治療にかかわらず、小児の最も高い罹患率と死亡率を示していた。痙攣(適切な抗生剤の治療後72時間以上続く)は神経学的後遺症や軽度の認知障害、学習障害の危険度を増加させた。髄中グルコース濃度の低下(20mg/dl;1.1mmol/L)が入院時にあると聴力障害と関連していた。髄液の無菌化の遅れは(抗生剤治療後16-18時間でも細菌培養陽性)髄膜炎による合併症

(中等度から重度の感覚性難聴や痙攣、半身麻痺、異常な神経後遺症など)を退院時に示していた。患児の栄養失調は罹患率と死亡率を増大させていた。

## E. 結論

ベトナムにおける小児医療状況とハノイ国立小児病院での感染症情報について報告した。小児の予防接種率が75-80%(HBVは35-60%)で、1歳以下の死亡率が約16%に留まっている状態である。ハノイ国立小児病院の5年間における脳炎髄膜炎患者は2,565名であり、ウイルス性は34%、細菌性2%、寄生虫2%、非感染性は約1%で、培養、抗体価やPCR検査でも確定できなかった患者は約60%であった。ウイルス性脳炎脳症では、特に日本脳炎とEV71予防接種の接種率向上と開発も重要である。細菌性髄膜炎では*S.pneumoniae*髄膜炎が重要で、まだ抗生剤感受性は保たれていたが、痙攣、髄中グルコース低下、抗生剤治療後の髄液無菌化の遅れ、および患児の栄養失調状態が重症化因子である。

## 文献

- 1) Pham Nhat An 第18回日本神経感染症学会 宮崎.
- 2) Journal of Clinical Virology 41 : 53-56, 2008.

## 神経感染症の画像診断

小玉隆男

**【要旨】** 中枢神経の感染症においては、CTやMRIなどの画像診断がその診断や加療において重要な役割を担っている。病態ごとに画像診断の適応、検査法や撮像法の選択を判断する必要がある。組織コントラストの高さや得られる情報の多さからはCTよりもMRIの診断的価値が高いが、CTはより多くの施設で施行可能であり、検査時間も短く、一般状態の不良な患者などで頭蓋内占拠病変や脳ヘルニアの除外のためにまずCTが施行されることもある。MRIでは、T1およびT2強調像、FLAIRなどのルーチン検査に加えて、拡散強調像、造影後T1強調像およびFLAIRなどが有用である。本稿では、神経感染症における画像診断の適応と進め方と代表的病態における画像診断について概説する。

**Key Words:** CT、MRI、拡散強調像、中枢神経感染症

### はじめに

中枢神経の感染症は、その原因、部位、波及形式などによってさまざまな病態を呈しうる。臨床経過や各種検査所見に加えて、CTやMRIなどの画像診断がその診断や加療において重要な役割を担っていることは広く認知されている<sup>1-5)</sup>。しばしば画像所見が質的診断に重要な情報をもたらす、治療法の選択、予後の推定、経過観察にも画像診断が寄与している。一方、髄液検査などの重要性が失われたわけではなく、髄膜炎の診断には髄液検査が必須であり、画像検査では異常を呈さない髄膜炎が存在することも知っておく必要がある。病態ごとの画像診断の適応、検査法や撮像法の選択が肝要である。

本稿では、神経感染症における画像診断の適応と進め方および代表的病態における画像診断について概説する。

### I. 画像診断の進め方

神経感染症の診断には、病歴、臨床症状および徴候、髄液検査が重要である。脳ヘルニアの兆候がある場合には腰椎穿刺は禁忌とされ、腰椎穿刺前の画像診断を依頼される場合も多い。しかし、腰椎穿刺前の頭部CTによって脳ヘルニアを予測することは

困難とするretrospective studyも多く、腰椎穿刺の可否を評価する目的での頭部CTについては必ずしも推奨されていない<sup>6)</sup>。神経学的局所徴候がみられる、髄液検査などでの診断が困難、合併症が疑われる、治療後の経過に問題がある、免疫不全を有する症例、臨床的に感染症を示唆する所見に乏しい場合などでは、特に画像診断が重要と考えられる。また、中耳炎、真珠腫、副鼻腔炎など、原因疾患の評価にも画像診断が必要である。

組織コントラストの高さや得られる情報の多さからはCTよりもMRIの診断的価値が高い。しかし、CTはより多くの施設で施行可能であり、検査時間も短く、一般状態の不良な患者などで頭蓋内占拠病変や脳ヘルニアの除外のためにまずCTが施行されることも多い。また、耳性あるいは鼻性の髄膜炎や脳膿瘍が疑われる場合には、CTによる詳細な骨構造の評価も必要となる<sup>7)</sup>。

MRIでは、T1およびT2強調像、FLAIR (fluid attenuated inversion recovery) などのルーチン検査に加えて、拡散強調像 (diffusion weighted imaging : DWI)、造影後T1強調像およびFLAIRなどが有用である。特にDWIは、脳膿瘍や急性脳炎・脳症の評価に優れている<sup>3-5, 8)</sup>。造影後のFLAIRは、血管の増強効果が乏しいことや低濃度の造影剤での増強効果が強いことなどから、髄膜炎などに伴う髄

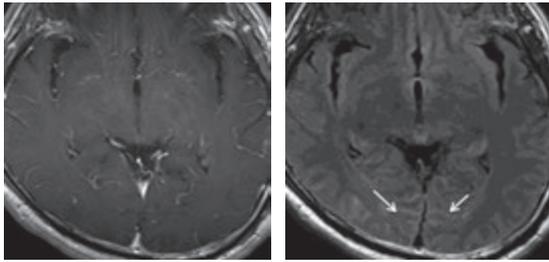


図1a

図1b

図1 髄膜炎

a) 造影 T1強調像、b) 造影FLAIR。造影後のT1強調像では静脈をはじめとした血管構造の増強効果がみられ、脳表の増強効果との鑑別が問題となる。造影後のFLAIRでは血管の増強効果がほとんどみられず、後頭葉内側の脳溝に沿った増強効果がより明瞭に認められる（矢印）。

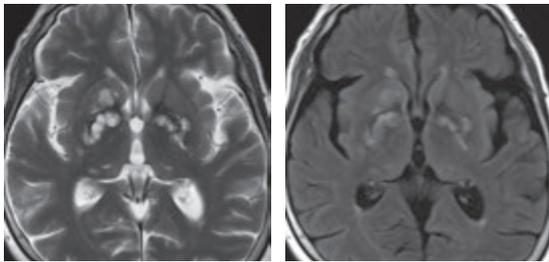


図2a

図2b

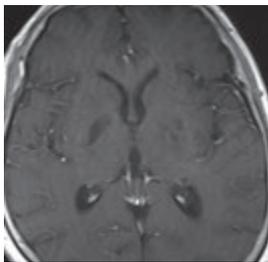


図2c

図2 クリプトコッカス症

a) T2強調像、b) FLAIR、c) 造影 T1強調像。T2強調像では、基底核領域に多数の嚢胞様T2強調像高信号が認められる。拡大した血管周囲腔に類似するが、FLAIRでは高信号を示す。造影検査での明らかな増強効果は認められない。

膜の異常増強効果の検出に優れている<sup>9, 10)</sup> (図1)。二次的な動脈炎などに伴う脳梗塞や炎症性の静脈洞血栓症が疑われる場合には、MR angiographyあるいはvenographyが必要となる。

## II. 代表的病態における画像診断

### 1. 髄膜炎 Meningitis

髄膜炎であるか否かの診断は臨床症状や髄液検査で可能であるが、続発する脳炎、脳梗塞、硬膜下蓄

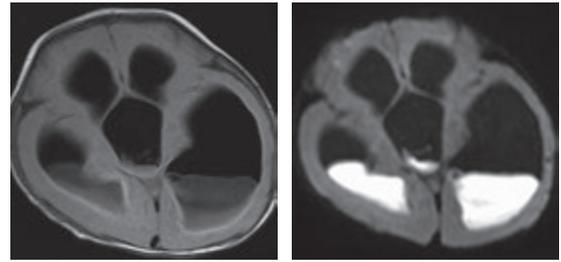


図3a

図3b

図3 脳室炎

a) FLAIRでは、両側側脳室三角部から後角に液面形成を伴う淡い高信号が認められる。b) DWIでは著明な高信号を示し、ADCは低値であった。

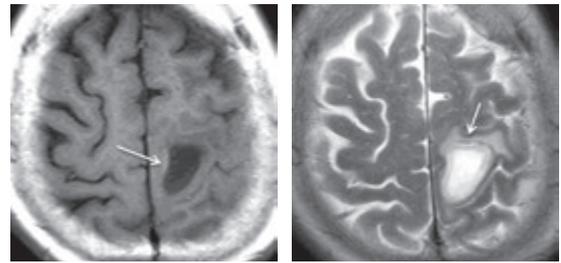


図4a

図4b

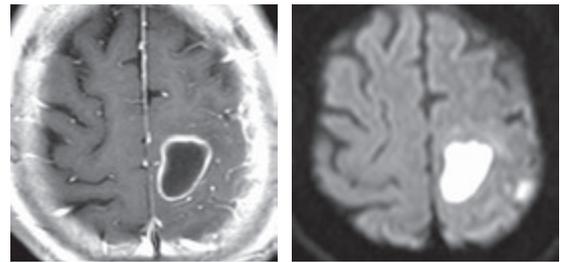


図4c

図4d

図4 脳膿瘍に硬膜下蓄膿を伴った例

a) T1強調像、b) T2強調像、c) 造影 T1強調像、b) DWI。膿瘍辺縁の被膜には、T1強調像での高信号およびT2強調像での低信号が認められる（矢印）。造影検査ではリング状の増強効果を示し、拡散強調画像では内部が著明な高信号を示す。

膿、脳室炎、水頭症などの評価には画像診断が重要である。一方、頭蓋内圧亢進や神経学的異常を認めない例では、画像診断は必ずしも必要ではない。髄膜炎が疑われ画像診断が必要とされる場合には、造影検査を含むMRIが最も有用と思われる。

造影MRIでは、髄膜の造影増強効果が主たる画像所見であるが、硬膜を主体とする場合とくも膜・軟膜を主体とする場合がある。前述のように、脳表の造影増強効果を評価するには、造影後FLAIRが有用である<sup>9, 10)</sup>。また、硬膜の造影増強効果は磁場強度や撮像法（スピンエコー vs. グラディエントエコー法）によって異なり、グラディエントエコー法を用いた造影T1強調像では正常の硬膜も増強効果を

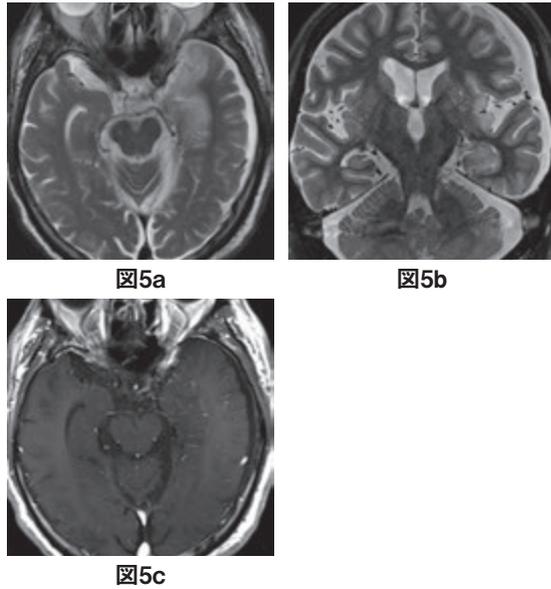


図5 単純ヘルペス脳炎

a) T2強調像、b) 冠状断 STIR、c) 造影 T1強調像。側頭葉腹側から島皮質を中心としたT2強調像およびSTIR 高信号が認められる。基底核の異常信号は認められない。

示すことなどにも留意する必要がある。

特異な画像所見を呈する疾患として、クリプトコッカス症があげられる。基底核領域などの血管周囲腔を主体としたゲラチン様の物質貯留により血管周囲腔の拡大に類似した所見がみられるが、FLAIRでは高信号を呈する<sup>11)</sup> (図2)。

髄膜炎の合併症として、脳梗塞、硬膜下蓄膿、脳室炎などがあげられ、画像診断が必要となることが多い。硬膜下膿瘍は副鼻腔炎や中耳炎からの波及、術後感染症として生じることが多い。髄膜炎の合併症として発生するのは比較のまれであるが、インフルエンザ桿菌や肺炎球菌での頻度が高く、小児に好発する。脳室炎では、脳室周囲の造影増強効果、脳室内の蓄膿（液面形成、FLAIR およびDWI高信号）などが認められる<sup>8,12)</sup> (図3)。

## 2. 脳膿瘍 Brain abscess

その時期によってさまざまな画像所見を呈しうる<sup>4)</sup>。脳実質炎早期 (early cerebritis) では、T2強調像／FLAIR 高信号、T1強調像軽度低信号、不均一な造影増強効果を示す。脳実質炎後期 (late cerebritis) では、壁の厚いリング状あるいは結節状の造影増強効果がみられ、周囲のT2強調像／FLAIR 高信号を伴う。被膜形成期にはリング状の造影増強効果を示し、DWIでの内部高信号および

ADC (apparent diffusion coefficient) 低下がみられることが特徴とされている (図4)。DWIでの所見は、膠芽腫、転移性腫瘍、亜急性脳出血などのリング状の造影増強効果を示す他疾患との鑑別に重要な所見である。また、拡散テンソル画像では、他の嚢胞性疾患とくらべて拡散異方性 (fractional anisotropy など) が高く<sup>13)</sup>、治療に対する反応を早期に反映することが報告されている<sup>14)</sup>。膿瘍壁はT1強調像高信号、T2強調像低信号を示すことが多く、マクロファージ内のフリーラディカルに伴う常磁性体効果と考えられる。MR spectroscopy (MRS) では、膿瘍内部はNAA、choline、creatine などの正常ピークがみられず、アミノ酸 (0.9 ppm)、乳酸 (1.3 ppm)、酢酸 (1.9 ppm)、コハク酸 (2.4 ppm)、などのピークが認められる。

ただ、起炎菌や発症後の時期によっては典型的な画像所見を示さないこともあり、注意を要する。特に、真菌症、トキソプラズマ、結核などでは膿瘍内部がDWIで高信号を示さない場合もある。

## 3. 脳炎・脳症 Encephalitis / Encephalopathy

脳炎はさまざまな原因でみられ、急性・亜急性の経過をたどるものと、いわゆる遅発性ウイルス性脳炎として発症するもの (後述) が知られている。また、感染症に伴う二次的変化としての脳症も重要である。脳炎／脳症が疑われる場合、可能であれば早期のMRI検査が望まれる。

成人型の単純ヘルペス脳炎 (1型) では、海馬を含む側頭葉、島、前頭葉の眼窩回や帯状回など、大脳辺縁系を主体に病変が進展し、大脳基底核への進展は認められないことが多い<sup>5)</sup> (図5)。出血を伴うことも多く、T1強調像高信号やT2強調像低信号を伴う。新生児ではびまん性の脳障害を認めることが多く、皮髄境界の不明瞭化がみられる。単純ヘルペス脳炎の鑑別診断としては、非ヘルペス性辺縁系脳炎 (傍腫瘍性、自己免疫性、など)、神経膠腫、神経梅毒、梗塞などがあげられる。

インフルエンザ脳症の関連病態として、急性壊死性脳炎、Reye 症候群、HSE 症候群 (hemorrhagic shock and encephalopathy syndrome) 等があげられる。画像所見は非特異的で、脳の腫脹・浮腫、皮質および皮質下白質のT2強調像／FLAIR高信号が認められ、拡散低下を示すこともある。急性壊死性脳症 (acute necrotizing encephalopathy) では 両側視床病変が特徴的で、浮腫性壊死～出血性変化を

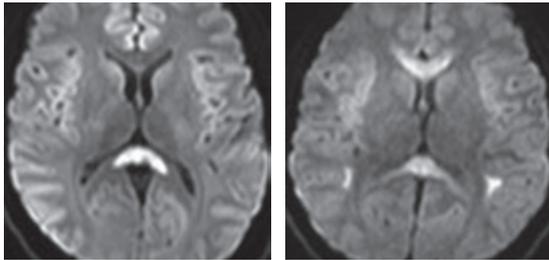


図6a

図6b

図6 MERS症例のDWI

a) Type 1、b) Type 2。Type 1の例では脳梁膨大部にほぼ限局したDWI高信号が認められ、Type 2の例では脳梁膝部や大脳白質にも高信号が認められる。いずれもADCの低下を認めた。

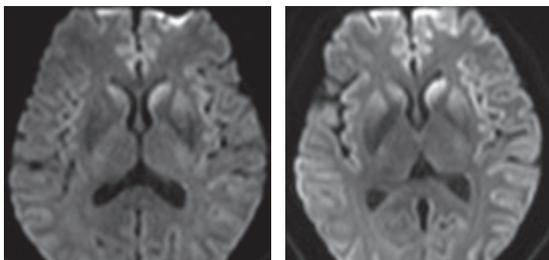


図7a

図7b

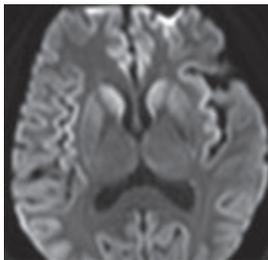


図7c

図7 CJD症例のDWI

a) 初回、b) 2週間後、c) 2ヵ月後。DWIでの高信号は、まず線条体腹側から出現し、次第に背側へ進展している。大脳皮質の高信号も経時的に進行している。

きたす。

近年、MRI所見を元に新たな脳症が提唱されている。

- ・ Acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion (AESD)<sup>15)</sup>：長時間続く熱性けいれんの数日後痙攣重積をきたす。その時点でのMRIにて皮質下白質の拡散低下を認める。前頭葉あるいは前頭頭頂葉に好発する。
- ・ Clinically mild encephalitis / encephalopathy with a reversible splenial lesion (MERS)<sup>15)</sup>：臨床的には比較的軽度の脳症で、せん妄状態、意識障害、痙攣などを伴う。MRIで脳梁膨大部の拡散低下を認め、経過観察で異常信号が完全に消失する。脳梁膨大部に限局することが多い (type 1)

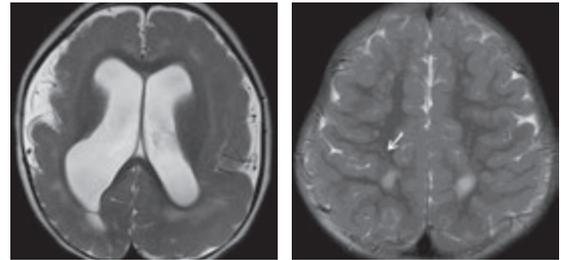


図8a

図8b

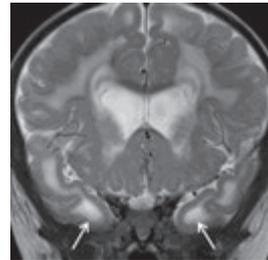


図8c

図8 先天性CMV感染の画像パターン (T2強調像)

a) 滑脳症/肥厚脳回症：前頭葉を中心として皮質の肥厚と脳回の不明瞭化がみられ、皮質下の高信号が認められる。b) 多小脳回：皮質の一部に肥厚がみられ、皮髄境界の凹凸不整を伴っている (矢印)。白質病変も認められる。c) 白質主体の障害：大脳白質に広範な高信号が認められる、側頭極の高信号が顕著である。

が、膨大部以外の脳梁や大脳白質を含む場合がある (type 2) (図6)。

#### 4. 遅発性ウイルス脳炎 Slow virus infection

感染後長い潜伏期を経て発症し、発症後は進行性の経過をたどる。

##### ①進行性多巣性白質脳症 (progressive multifocal leukoencephalopathy: PML)

JCウイルスの感染による。乏突起神経細胞をターゲットとするため、脱髄を主体とした病変である。多発性、両側性、非対称性のことが多く、皮質下のU fiberを含む白質病変で、皮質とは明瞭に境界される。後頭頭頂葉に好発する。T1強調画像で明瞭な低信号を示すのが特徴的で、造影増強効果には乏しい。拡散低下を示すことは少なく、mass effectは乏しい<sup>16)</sup>。多発性硬化症に対するNatalizumab治療後に発症するPMLでは、拡散低下や造影増強効果がみられると報告されている。

##### ②亜急性硬化性全脳炎 (subacute sclerosing panencephalitis: SSPE)<sup>17)</sup>

麻疹ウイルスの変異株により、麻疹罹患後数年～十数年で発症する。発症後数ヵ月は、画像で異常を認めないことが多い。まず、後部側頭葉、後頭頭頂葉を中心とした皮質・皮質下に非対称性のT2強調

像高信号が認められる。2年以内に皮質・皮質下病変は縮小し、脳室周囲の非対称性白質病変がみられ、脳萎縮が始まる。その後、白質病変と脳萎縮が進行する。大脳基底核や脳幹病変を伴うこともある。

### ③Creutzfeldt-Jakob 病 CJD

ウイルス感染ではないが、潜伏期の長いプリオン病の代表的疾患で、特徴的なMRI 所見を呈する。特に、その早期診断にはDWIが有用である(図7)。基底核(特に線条体)や皮質のDWI高信号およびADC 低下が特徴的で、線条体の異常信号は腹側から始まることが多い<sup>18, 19)</sup>。また、b値の高い拡散強調画像がCJDの診断に優れているとの報告もある<sup>20)</sup>。同様の拡散低下は低酸素/虚血性脳症、低血糖脳症などでもみられるがこれらは急性疾患であり、CJDのような慢性的臨床経過で同様の画像所見を示す疾患はきわめてまれである。なお、狂牛病に伴うnew variantのCJD では、両側視床内側の病変(“double hockey stick” appearance)が特徴的とされている<sup>21)</sup>。

## 5. 先天性/胎内感染

胎内感染の代表的な原因として、TORCH (Toxoplasma, Rubella, Cytomegalovirus, Herpes) が広く知られている。胎内感染における画像診断の目的は、その影響を評価し、機能的予後の予測などに寄与することである。近年、MRIなどによる胎内での画像診断も可能となっている<sup>22)</sup>。胎内感染では、胎生期のどの時期に感染したかでその影響が異なることを認識しておく必要がある。たとえば、妊娠3~16週での感染では奇形をきたす原因となり、それ以後では炎症性変化や組織破壊が主体となる。当然、両方の所見を呈することもある。また、時期が同じであれば、原因によらず同様の所見を呈することも多い。たとえば先天感染に伴う白質障害と周産期の低酸素などに伴う脳室周囲白質脳症(periventricular leukomalacia: PVL) が類似の画像所見を呈することがある。

なお、脳の石灰化などがみられ先天性感染症と鑑別を要する疾患としては、Aicardi-Goutières syndrome、Pseudo TORCH (Baraitser-Reardon syndrome) などがあげられる。

### ①サイトメガロウイルス(Cytomegalovirus: CMV)<sup>23)</sup>

経胎盤感染により、先天性感染症では最多である。妊娠初期の感染では脳奇形をきたす。第1期では滑脳症/肥厚脳回症を、第2期では多小脳回をもたらし、小脳低形成を伴うことがある。第3期では白質を主体とした脳障害を示し、PVL と類似した所見

を示すこともある。側頭葉様の萎縮と嚢胞様の変化(T2強調像高信号)も特徴的所見として知られている(図8)。

### ②トキソプラズマ(Toxoplasma)

水頭症、脈絡網膜炎、頭蓋内石灰化、精神運動障害などをきたし、妊娠20週までに感染した場合に症状が重篤化する。髄膜の広範な炎症とそれに伴う中脳水道狭窄による水頭症が認められる。

### ③風疹(rubella)

白内障、心奇形、難聴などを示す。頭部の画像所見としては、脳実質の体積減少による脳室拡大、血管炎に伴う梗塞~壊死巣、異常石灰化(脳室周囲、基底核、脳幹部など)、髄鞘化の遅延などが認められる。

## おわりに

画像診断が、中枢神経感染症の診断・治療において重要な位置を占めることは広く認識されている。臨床および検査所見を考慮しつつ、最適な撮像法を選択し、病態や組織学的状態を正しく評価することが求められる。

## 文献

- 1) Anslow P : Cranial bacterial infection. *Eur Radiol* 14 : E145-154, 2004.
- 2) Kastrup O, Wanke I, Maschke M : Neuroimaging of infections. *NeuroRx* 2 : 324-332, 2005.
- 3) Karampekios S, Hesselink J : Cerebral infections. *Eur Radiol* 15 : 485-493, 2005.
- 4) Rath TJ, Hughes M, Arabi M, et al.: Imaging of cerebritis, encephalitis, and brain abscess. *Neuroimaging Clin N Am* 22 : 585-607, 2012.
- 5) Sarrazin JL, Bonneville F, Martin-Blondel G : Brain infections. *Diagn Interv Imaging* 93 : 473-490, 2012.
- 6) 日本神経治療学会, 日本神経学会, 日本神経感染症学会監修: 細菌性髄膜炎の診療ガイドライン. *神経治療* 24 : 3-64, 2007.
- 7) Bayonne E, Kania R, Tran P, et al.: Intracranial complications of rhinosinusitis. A review, typical imaging data and algorithm of management. *Rhinology* 47 : 59-65, 2009.
- 8) Hong JT, Son BC, Sung JH, et al.: Significance of diffusion-weighted imaging and apparent diffusion coefficient maps for the evaluation of pyogenic

- ventriculitis. *Clin Neurol Neurosurg* 110 : 137-144, 2008.
- 9) Parmar H, Sitoh YY, Anand P, et al.: Contrast-enhanced flair imaging in the evaluation of infectious leptomenigeal diseases. *Eur J Radiol* 58 : 89-95, 2006.
  - 10) Splendiani A, Puglielli E, De Amicis R, et al.: Contrast-enhanced FLAIR in the early diagnosis of infectious meningitis. *Neuroradiology* 47 : 591-598, 2005.
  - 11) Kwee RM, Kwee TC : Virchow-Robin spaces at MR imaging. *Radiographics* 27 : 1071-1086, 2007.
  - 12) Jorens PG, Vootmolen MH, Robert D, et al.: Imaging Findings in Pyogenic Ventriculitis. *Neurocrit Care* 11 : 403-405, 2009.
  - 13) Nath K, Agarwal M, Ramola M, et al.: Role of diffusion tensor imaging metrics and in vivo proton magnetic resonance spectroscopy in the differential diagnosis of cystic intracranial mass lesions. *Magn Reson Imaging* 27 : 198-206, 2009.
  - 14) Nath K, Ramola M, Husain M, et al.: Assessment of therapeutic response in patients with brain abscess using diffusion tensor imaging. *World Neurosurg* 73 : 63-68, 2010.
  - 15) Takanashi J : Two newly proposed infectious encephalitis/encephalopathy syndromes. *Brain & Development* 31 : 521-528, 2009.
  - 16) Tan AS, Korolnik IJ : Progressive multifocal leukoencephalopathy and other disorders caused by JC virus: clinical features and pathogenesis. *Lancet Neurol* 9 : 425-437, 2010.
  - 17) Gutierrez J, Issacson RS, Koppel BS: Subacute sclerosing panencephalitis: an update. *Dev Med Child Neurol* 52 : 901-907, 2010.
  - 18) Vitali P, Maccagnano E, Caverzasi E, et al.: Diffusion-weighted MRI hyperintensity patterns differentiate CJD from other rapid dementias. *Neurology* 76 : 1711-1719, 2011.
  - 19) Fujita K, Harada M, Sasaki M, et al.: Multicentre multiobserver study of diffusion-weighted and fluid-attenuated inversion recovery MRI for the diagnosis of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: a reliability and agreement study. *BMJ Open* 2 : e000649, 2012.
  - 20) Hyare H, Thornton J, Stevens J, et al.: High-b-value diffusion MR imaging and basal nuclei apparent diffusion coefficient measurements in variant and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *AJNR Am J Neuroradiol* 31 : 521-526, 2010.
  - 21) Zeidler M, Sellar RJ, Collie DA, et al.: The pulvinar sign on magnetic resonance imaging in variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 355 : 1412-1418, 2000.
  - 22) Malinger G, Lev D, Lerman-Sagie T : Imaging of fetal cytomegalovirus infection. *Fetal Diagn Ther* 29 : 117-126, 2011.
  - 23) Malm G, Engman ML : Congenital cytomegalovirus infections. *Semin Fetal Neonatal Med* 12 : 154-159, 2007.

## Diagnostic imaging for neuroinfection

Takao Kodama

The cornerstones of the diagnosis of central nerve system (CNS) infections include history, host factors, physical examinations, cerebrospinal fluid (CSF) analysis, and so on. Imaging studies such as CT and MRI, however, can play important roles in the diagnosis and therapy of CNS infections particularly when faced with suspected focal damages. It is important to select the proper imaging methods (CT or MRI) and pulse sequences of MRI based on clinical and laboratory data.

Because of its higher tissue contrast and multiple tissue parameters such as proton density, T1, T2, and diffusion, MRI should be the imaging of the first choice. However, CT can be the first choice imaging to estimate critical information such as space occupying lesions and brain herniation, because of its wide utility and short examination time. In cases with rhinogenous or otitic CNS infections, CT is necessary for evaluating bony structures.

In addition to T1 and T2-weighted imaging and fluid attenuation inversion recovery (FLAIR) , post-contrast T1WI and diffusion weighted imaging (DWI) are mandatory pulse sequences of MRI for evaluating CNS infections. DWI is very important in the evaluation of CNS infections especially for brain abscess and some kind of encephalitis/encephalopathy. Post-contrast FLAIR can be a useful imaging for depicting meningitis because of its higher sensitivity to contrast media of low concentration and lack of contrast enhancement of vascular structures. In cases with suspected vascular complications such as cerebral infarction secondary to vasculitis or venous/sinus thrombosis, MR angiography or venography should be added.

In this article, I give an outline mainly on MRI about image findings in each clinical condition and disease.

**Key Words:** CT, MRI, diffusion weighted imaging, CNS infection

## 小児中枢神経感染の外科的治療

長嶋達也、山元一樹

【要旨】外科的治療を要する中枢神経系感染症は、先進国ではまれな疾患といえるが、罹病すると重篤な後遺障害の原因となりうる。外科的治療の原則は、排膿、異物除去、死腔の開放に尽きる。手術の時期や方法についてevidenceに基づいたガイドラインは存在せず、個々の症例に応じた判断が予後を決する。

脳膿瘍、硬膜下膿瘍、硬膜外膿瘍、化膿性髄膜炎に伴う硬膜下水腫や膿瘍、きわめてまれではあるが特発性脊髄硬膜外膿瘍と先天性皮膚洞に伴う中枢神経感染症などの疾患は、常に外科的治療を念頭に置いて早期の脳神経外科紹介を要する。

**Key Words:** 脳膿瘍、硬膜下膿瘍、髄膜炎、硬膜下水腫、脊髄硬膜外膿瘍

### 1. はじめに

現在の日本では外科的治療を要する中枢神経感染症はまれであるが、免疫不全、耐生菌、頭蓋内の人工物留置など複雑な病態に伴う新たな課題が生まれてきている。一方、発展途上国における中枢神経感染症はいまだ重要な脳神経外科的疾患である。

中枢神経感染症の外科的治療は、清潔手術と神経局所診断に基づく近代脳神経外科の夜明けとともに始まった。1887年、William Macewenは神経学的局在診断がなされた側頭葉脳膿瘍の小児を、クロロホルム麻酔下に清潔手術法によって手術し治癒させた<sup>1)</sup>。脳膿瘍が外科的ドレナージにより治療しうる病気であることが明らかにされたとはいえ、局在診断、感染制御の困難から依然高い死亡率が続いた。1943年にはペニシリンの全身および髄腔内投与による連鎖球菌性髄膜炎例の治療成功例が報告された。同時期の第2次世界大戦中に、脳神経外科医Hugh Cairnsは汚染された重症頭部外傷の治療に初めて用い、中枢神経感染症に対する外科的治療におけるペニシリンの臨床応用を確立した<sup>2)</sup>。抗生剤の導入後の20年間に脳膿瘍による死亡率は低下したとはいっても、やはり受け入れがたいほど高い死亡率が続いた。Mayor Clinicからの報告では、1946-1955年と1961-1973年の脳膿瘍の死亡率はいずれも17%であった<sup>2)</sup>。

1970年台後半のCTスキャン導入によって、早期診断と局在診断が可能になったことから膿瘍の治療成績は飛躍的に向上した<sup>3)</sup>。その後、画像診断の進歩、抗生剤の開発、画像誘導手術法の導入により治療成績は向上して現在にいたっているが、外科的治療の原則は「膿瘍のドレナージと異物除去」そして感受性のある抗生剤の投与に尽きる。

### 脳膿瘍

#### 1. 疫学、病態

脳膿瘍はその発生率が100万人あたり4人のまれな疾患である。抗菌薬の発達により致死率は低下しているが、今なお死亡例や重度の後遺障害を残す例がある。感染経路は、直接波及、手術などの医源性、外傷、血行性波及の4経路がある<sup>4)</sup>。小児脳膿瘍の感染経路は、先天性心疾患に伴うものが30-34%、心内膜炎に伴うものが9-10%、敗血症に伴うものが8%とおおむね敗血症や心疾患に伴うものがその約半数を占め、続いて耳鼻科疾患からの波及が約2割、頭部外傷や髄膜炎、脳外科手術に伴うものが約1割ある。およそ80%が基礎疾患を有する<sup>4)</sup>。ファロー四徴例のように右-左シャントを伴う例(50%)に脳膿瘍が発生しやすい<sup>5)</sup>。また、感染経路が明らかでない症例も15-30%存在する<sup>6)</sup>。近年増加している免疫不全に伴う脳膿瘍では、全身性の真菌感染が

脳に波及したものがあり予後不良である<sup>7)</sup>。

## 2. 起炎菌

耳・歯科からの感染では、*Streptococcus*群、*Bacteroides sp.*などの嫌気性菌が多く、外傷では黄色ブドウ球菌が多い。免疫不全患者における真菌性脳膿瘍の原因として*Aspergillus sp.*、後天性免疫不全症候群に伴う脳膿瘍の起炎菌として*Toxoplasma gondii*が知られている。30-60%は複数の起炎菌によるという報告もある<sup>5)</sup>。脳膿瘍からの起炎菌が同定されることはむしろ少なく、10%以下との報告もある<sup>8)</sup>。

## 3. 臨床症状

頭痛、嘔吐など頭蓋内占拠性病変としての症状を示す。必ずしも感染兆候は明らかではないが、過半数に微熱を伴う。局所神経症状、意識障害を高率に伴い、膿瘍が大きくなると脳ヘルニアをきたして死亡する。白血球増加やC蛋白上昇など非特異的な感染兆候を示す<sup>5)</sup>。

## 4. 画像所見

脳膿瘍の病期は組織病理学および画像所見より早期脳炎期、晩期脳炎期、早期被膜形成期、晩期被膜形成期の4期に分けるのが一般的である。早期脳炎期は感染後3日目までに相当し、CT上は若干の低吸収域を伴う。4-9日目は晩期脳炎期に相当し、中心部に壊死組織、貪食細胞、周囲に線維芽細胞を有し、CT上周囲に淡い造影域を伴う。10-14日目は早期被膜形成期に相当し(図1)、以降CT上しっかりとした被膜が造影されるようになり、14日目以降は厚いコラーゲン被膜に囲まれるようになる<sup>8,9)</sup>。

MRIは三次元構造の把握と多発性膿瘍の描出に優れる<sup>7)</sup>。脳幹や下垂体膿瘍の診断には不可欠である。T2強調画像で膿瘍周囲の浮腫は高輝度に、中心部は等一高輝度に、被膜は低輝度に描出される。鑑別診断として悪性脳腫瘍、腫瘍様の画像所見を示す脱髄疾患を考慮する。

## 5. 薬物治療

時期を逸しない外科的治療が基本であり、すみやかな脳神経外科紹介を要する。内科的治療では、スルバクタム/アンピシリンとセフトキシム等の第3世代セフェム系抗生物質との併用が第一選択とされる。起炎菌の同定と感受性のある抗生剤の選択の原則に従う<sup>10)</sup>。画像上リング状の増強効果が消失するか、感染・炎症所見が治まるまで通常6-8週間の抗

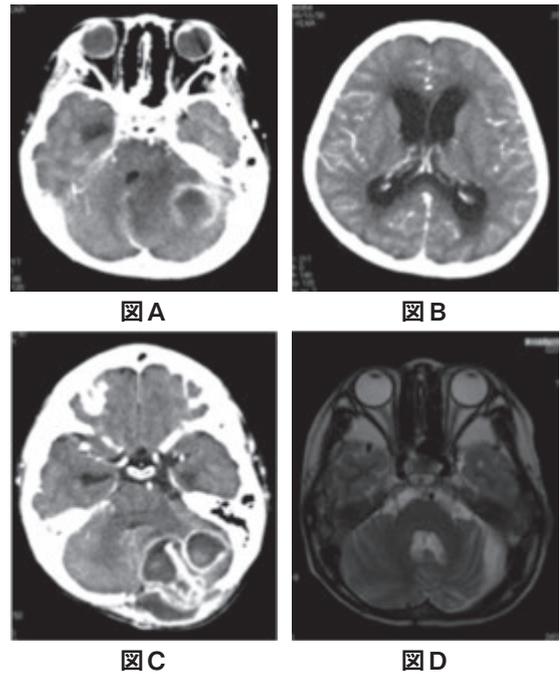


図1 脳膿瘍

11歳、男児。多発心奇形の手術後、抗凝固剤の内服中、2週間前からの発熱、頭痛、嘔吐を主訴に緊急入院。小脳半球に脳炎期、早期被膜形成期の脳膿瘍を認めた(図A、B—造影CTスキャン)。入院後傾眠傾向となり、水頭症に対し脳室ドレナージ術、入院2日目に脳幹圧迫による意識障害進行のため開頭小脳膿瘍摘出術および膿瘍ドレナージ術を施行した(図C—造影CTスキャン)。起炎菌は口腔内常在菌である*Streptococcus mitis*であり、8週間の抗生剤投与(CTX)を続けて神経学的脱落症状なく治癒した(図D—2ヵ月後のMRIT2強調画像)。

菌薬の投与を行う。小さな膿瘍や、脳炎期は抗菌薬のみでの治癒が期待できる<sup>8,11)</sup>。直径2.5cmをこえない多発性脳膿瘍は内科的治療が原則である<sup>12)</sup>。内科的治療中は、6-8週間は毎週CTスキャンによる経時的評価を要する。抗生剤の終了後は、毎月のCTで完全に吸収されたことを確認しなければならない。脳膿瘍の完全な吸収には3-4ヵ月を要する。晩期再発が5-20%にあるため、抗生剤の終了後1年間は、2-4ヵ月ごとの経過観察を要する<sup>5,12)</sup>。

副腎皮質ステロイドは、高度の脳浮腫を伴う場合に限定的にかつ短期間使用されるのみである。痙攣発作の頻度が高いことから治療終了から3-6ヵ月の抗痙攣剤投与が推奨される<sup>4)</sup>。

## 6. 外科的治療

膿瘍が大きく脳圧排を伴い、頭蓋内圧亢進症状や巣症状を呈している例、抗菌薬の無効例に考慮する。

膿瘍の穿刺・排膿、ドレナージが基本だが、2週間の抗菌薬投与にもかかわらず増大傾向にあるもの、3-4週間の抗菌薬投与にもかかわらず縮小傾向のないもの、一般的には直径3cmをこえて脳の圧排が強い大きな膿瘍で非優位脳の脳表に近いもの、小脳膿瘍等は開頭による摘出術が適応となる。深部に存在する場合には定位的脳手術あるいはナビゲーションによる膿瘍ドレナージの有効性が報告されている<sup>4)</sup>。異物が存在するときには、膿瘍ドレナージあるいは摘出時に異物を摘出する必要がある。一方、脳膿瘍の原因の多くを占める先天性心疾患に伴う脳膿瘍の場合、心機能および血液凝固機能に問題がある症例が多いことより、開頭による膿瘍摘出の死亡率が71%と高く<sup>6)</sup>、より侵襲の少ない穿頭による穿刺、ドレナージを選択することが多い。ただし、穿刺・排膿のみでも17%に生命にかかわるチアノーゼ性の合併症があるといわれる。

抗菌薬の発達とCT導入により、小児脳膿瘍の死亡率が31%から5.6%に低下した<sup>4)</sup>。予後不良因子としては、脳室穿破や、発症時の重い意識障害、多発性脳膿瘍、小脳膿瘍などがあげられる。*Nocardia*、*Listeria*脳膿瘍は3倍の死亡率がある<sup>6,8)</sup>。脳膿瘍の後遺症としてはてんかん発作が最多を占め、脳神経外科的処置が必要となった症例では50-70%の発症率とされるが、その多くは遅発性であり、1年以内の発症はその半数に過ぎないため長期にわたる経過追跡が必要である<sup>6)</sup>。

## II. 硬膜下膿瘍

### 1. 疫学、病態、起炎菌

硬膜下膿瘍 (subdural abscess, subdural empyema) は硬膜下に膿瘍が貯留する病態であり、先進国ではまれな疾患と言える。硬膜外膿瘍との大きな違いは、膿瘍と脳実質を隔離する組織がくも膜以外存在しないため、一度炎症が波及すると急速に悪化し、膿瘍による圧迫や脳浮腫、脳表の静脈の血栓性静脈炎により死にいたることもある緊急性の高い病態である<sup>13,14)</sup>。

乳幼児期は髄膜炎に続発することが多いが、一般的には副鼻腔の発達している10代から30代の男性に多い。副鼻腔炎や中耳炎、外科的治療が関係しており、2/3の症例が前頭洞や篩骨洞からの波及、2割程度が中耳炎あるいは乳突蜂巣炎からの波及であり、波及経路は、直接波及や骨髄炎、静脈炎等静脈チャンネルを介した波及、血行性波及等とされている<sup>13,14)</sup>。

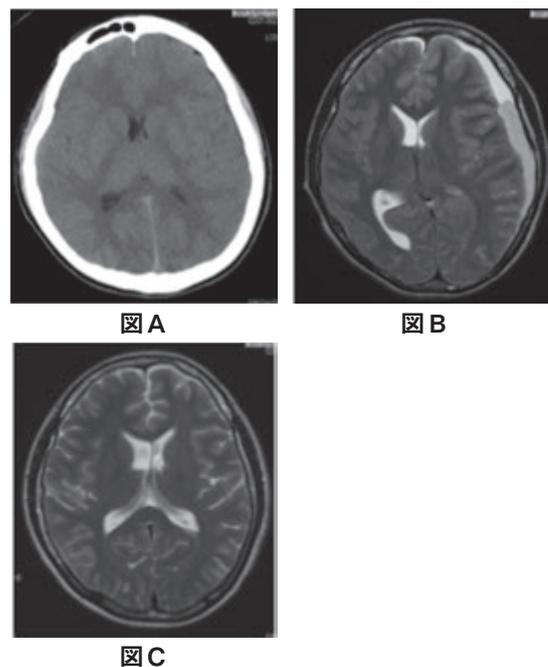


図2 硬膜下膿瘍

14歳、男児。2週間前からの発熱で発症し、けいれん重積発作にて前医へ救急搬送された。当初髄膜炎として治療されていたが、硬膜下膿瘍を認めたため当院へ転院となった (図A—CTスキャン、図B—MRIT2強調画像)。緊急穿頭膿瘍ドレナージおよび内視鏡的に副鼻腔の開窓術を行い、MEPM+VCMの投与を開始した。培養結果は *Streptococcus Viridans* であり、MEPMを6週間投与し、神経学的脱落症状なく治癒退院した (図C—4ヵ月後MRIT2強調画像)。

起炎菌はおおむね先行する副鼻腔炎の起炎菌と一致し、嫌気性の *Streptococcus* 等が多い。手術後は *Staphylococcus aureus* が一般的である<sup>14)</sup>。

### 2. 臨床症状、画像所見

頭痛、発熱、嘔気・嘔吐などの髄膜刺激症状、頭蓋内圧亢進症状や片麻痺などの局所神経症状を示す。いったん発症すると進行が速いので、すみやかな治療を要する。後頭蓋窩硬膜下膿瘍は閉塞性水頭症を併発するため、急速な悪化をきたしやすい。

造影CTとMRIにより診断される。CTでは辺縁が造影される低吸収域として描出される。MRIではT1強調画像で低輝度、T2強調画像で高輝度を示す。副鼻腔などの頭蓋外病変の波及経路は、bone density CTにおける骨破壊像として診断できる。また、頭蓋内空気の使用は、頭蓋外病変との交通を示唆する (図2)。

### 3. 外科的治療、予後

硬膜下膿瘍の治療は、一部の例外をのぞいてすみやかな外科的治療と抗菌薬の投与である<sup>13,14)</sup>。脳膿瘍と同様に4-8週間の治療が推奨される。外科治療は、脳圧迫や頭蓋内圧亢進症状、意識障害やけいれんなどの臨床症状を呈する場合、膿瘍が小さくても内科的治療に反応しない場合などが適応になる。手術には開頭による膿瘍摘出あるいは穿頭による排膿ドレナージ術が選択される。前者は十分な排膿および減圧開頭を兼ね強い脳腫脹に対する対応が可能である一方、手術侵襲は大きい。後者は手術侵襲がより少ないものの、排膿および減圧が不十分になることがあり、20%に再手術あるいは開頭術を追加する必要がある。また、感染源として副鼻腔が多いため、耳鼻科と合同での排膿が必要な場合がある。近年ではより侵襲の少ない手術法が選択される傾向にあるが、症例ごとに臨機応変に対応する必要がある<sup>13)</sup>。内科的には感染経路を推定しつつ脳膿瘍に準じた強力な抗菌薬治療を行う。

予後は治療前の意識レベルによって決まる。意識レベルが良好であれば死亡率は10%以下であるが、悪ければ50%に及ぶ<sup>13)</sup>。死亡例の90%に脳表の血栓性静脈炎による脳梗塞を併発したと報告されている。おもな後遺障害はてんかん発作であり、急性期に約60%、2年の経過ではほぼ半数が罹患し、巣症状や知能障害も約2割に認められる<sup>13,14)</sup>。

## III. 硬膜外膿瘍

### 1. 疫学、病態、起炎菌

頭蓋内感染症の2%を占めるまれな疾患である。比較的年長な児童(12-16歳)に好発し、頭蓋外感染の直接波及、血行性感染、あるいは導出静脈の炎症を介して発生する。髄液腔との間に硬膜が存在するため、髄膜炎や脳膿瘍を合併することは少なく、硬膜下膿瘍に比して症状は軽く予後も良好である。先行病変として、前頭洞炎などの副鼻腔炎、開放性頭蓋骨折、先天性皮膚洞、脳外科手術などがある<sup>14)</sup>。副鼻腔炎からの波及は*Microaerophilic or hemolytic streptococcus*が、脳外科手術後では*Staphylococcus sp.*が多い<sup>13,14)</sup>。

### 2. 臨床症状、画像所見

発熱、髄膜刺激症状、鼻部・眼窩周囲の軟部組織腫脹、頭皮の発赤や圧痛、進行すると嘔気・嘔吐・意識障害などの頭蓋内圧亢進症状を呈する。髄膜炎に波及すると急速に悪化して致命的になりうる。

CTスキャン、MRIにより診断される。硬膜外膿瘍は骨髄炎を伴うことがあり、頭蓋単純写真や骨 CT scanで評価される。

### 3. 外科的治療、予後

外科的な膿瘍ドレナージと並行して抗生剤投与を行う。抗生剤は6週間投与する。穿頭による膿瘍ドレナージは奏功しないことが多く、開頭による感染巣の搔爬、ドレナージ、感染骨の除去が基本となる。原病変が副鼻腔炎である場合、内視鏡的な副鼻腔解放とドレナージを同時に行うことがある。頭蓋形成術が必要な場合は3ヵ月待って感染が完治したあとに行う<sup>13,14)</sup>。

時機を逸せず治療すると予後は良好である。脳外科的には、外傷あるいは手術に関連して生じた感染骨を除去したあとに大きな骨欠損が残る場合があり、小児の場合には頭蓋形成術がむずかしい問題になることがある。

## IV. 髄膜炎に合併する病態— 硬膜下水腫・膿瘍、シャント感染

### 1. 疫学、病態

髄膜炎は基本的に内科疾患であるが、進行性の硬膜下水腫、硬膜下膿瘍の増大や水頭症の進行、適切な抗生剤治療に反応せず頭蓋内圧亢進症状を呈する場合には外科的治療を考慮する<sup>15)</sup>。日本神経感染症学会の「細菌性髄膜炎の診療ガイドライン」では髄膜炎急性期で急速に症状が進行する場合に脳室ドレナージ、髄膜炎治療後に脳室拡大が進行する場合には脳室—腹腔短絡術を考慮すると記されている<sup>11)</sup>。硬膜下水腫は乳児期の髄膜炎の40-60%に合併する病態であるがその多くは治療により数週間から数ヵ月で軽快する<sup>16)</sup>。

著者らの経験では、ワクチン接種の推奨により2008年以降*H. influenzae*による髄膜炎に伴う硬膜下水腫(膿瘍)で外科的治療を要した例は激減している。Vinchonらは、1992年にフランスでワクチンが導入された結果、外科的治療を要する*H. influenzae*による髄膜炎後硬膜下水腫の発生が激減したあと、1996年には消滅し、代わって*N. meningitidis*が最も多い起炎菌になったと報告している<sup>17)</sup>。髄膜炎の炎症過程の一部として硬膜下腔に貯溜した液体が、漿液性であるのか化膿性であるのかをCTやMRIで鑑別することは困難であり、漿液性であるものの黄赤色、一部血性で白血球に富むものから膿性まで連続的に変化する<sup>17,18)</sup>。

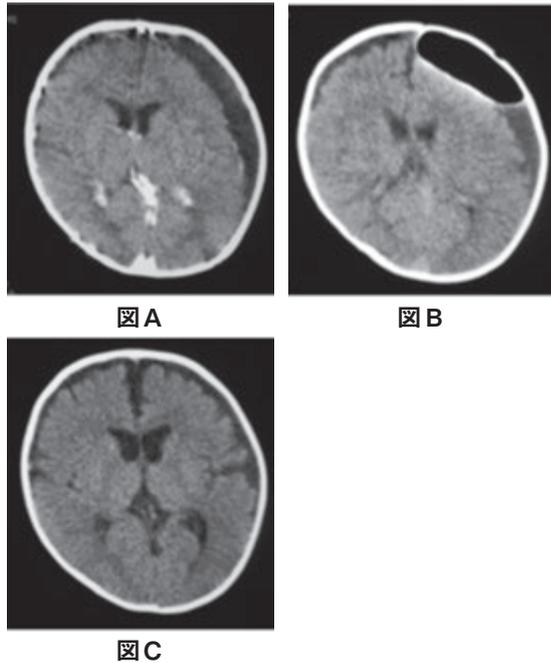


図3 髄膜炎に伴う硬膜下水腫

9ヵ月、男児。発熱にて発症した髄膜炎であり、髄液細胞数117/3、起炎菌は肺炎球菌であった。頭部CT上硬膜下水腫の増大および間代性痙攣を認めたため、発症後2週間で当院転院となった(図A-CTスキャン)。入院時に大泉門は緊満していた。穿頭ドレナージ術を行いすみやかに症状は消失し(図B)、術後2ヵ月の経過で水腫は消失した(図C)。

水頭症に対する脳室-腹腔シャントに代表されるシャント手術は小児脳神経外科的治療のなかでも一般的なものであるが、新規シャントが6ヵ月以内に感染する率は8.5% (0-20%) と高い<sup>19,20)</sup>。原因菌は *Sepidermidis* や *S.aureus* などの皮膚に常在するグラム陽性球菌が多くを占める。

## 2. 外科的治療

硬膜下水腫に対する手術方法としては、硬膜下穿刺や穿頭、開頭によるものがあげられる。硬膜下穿刺は簡便な方法ではあるが再発(無効)率が42-78%あるとされる<sup>18,21)</sup>。開頭術は多胞性の病変の場合適応となるが侵襲が大きい。したがって穿頭術あるいは症例によってドレナージ術を併用する方法が外科的治療としては一般的である<sup>16)</sup>(図3)。画像診断により脳の圧排程度が正確に評価できる現在では、適切な硬膜下水腫の除去により手術直後から神経症状および炎症所見の改善を認めることが多い。急速な水頭症進行症例に対しては脳室ドレナージを施行し、髄膜炎治癒後に必要なら脳室-腹腔短絡術を行う。

シャント感染に対する治療はシャントシステムの抜去およびドレナージが基本となる。初期治療としてバンコマイシンおよび第3,4世代セフェム系抗菌薬またはバンコマイシンおよびカルバペネム系抗菌薬が推奨されている。抗菌剤終了後2-3回の髄液培養陰性を確認してからシャント再建を行うのが一般的である<sup>19,20)</sup>。

## V. 脊髄感染症

脊髄感染症で外科的治療を要するものはきわめてまれであるが、診断・治療が遅れて後遺障害を残したりすると、医事紛争の原因となりやすいため常にその可能性を考えなければならない。つぎに述べる疾患は、常に脳神経外科的緊急を念頭に置かなければならない。

### 1. 脊髄硬膜外膿瘍

#### (1) 疫学、病態、起炎菌

頻度は1万人の入院あたり2人、小児1万人の入院あたり1.5人のまれな疾患である<sup>22,23)</sup>。免疫不全例、硬膜外カテーテル留置例、薬物中毒の増加に伴い、脊髄硬膜外膿瘍の頻度が増加する傾向にある<sup>24)</sup>。MRSAを含む黄色ブドウ球菌が培養陽性例の45-100%を占める。起炎菌培養の1日以上前に抗生剤が開始されている例が多く、培養陰性例が増えている<sup>23)</sup>。

#### (2) 臨床症状、画像所見

古典的な3主徴は、背部痛、発熱、神経症状である。しかし、すべての症状がそろうことは8-10%と少ない<sup>23)</sup>。危険因子として、成人例の66.2%に伴う前駆する感染、糖尿病、腎疾患、薬物中毒、免疫不全などがあげられている<sup>23)</sup>。小児例ではこれらの危険因子を伴うことは少ないとされるが、まず危険因子の有無を確認することが重要である。予後不良の最大原因である診断の誤りや遅れは、11-75%に生じるとされる<sup>23)</sup>。すみやかにMRIを行うことにより診断が得られる。

#### (3) 外科的治療

外科的治療が基本であるが、脊髄症状を有さない例、全脊椎に及ぶような広範に進展する例、全身状態不良な例、脊髄症状が完成して48時間以上経過するような例では抗生剤による保存的治療も考慮する<sup>23)</sup>。特発性脊髄硬膜外膿瘍の成人例では、抗生剤による保存的治療を行った患者の41%以上で治療奏功せず外科的治療を要したとの報告もあり、保存的治療の選択には慎重を要する<sup>22)</sup>。神経症状を伴う例では、すみやかに椎弓切除、膿瘍除去、脊髄減圧と

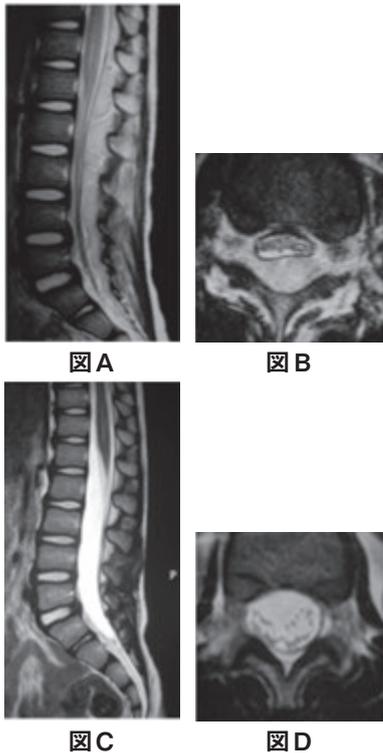


図4 脊髄硬膜外膿瘍

6歳、女児。背部痛、発熱で発症し、MRIにて腰仙部脊髄背側硬膜外に広範な占拠性病変を認めた(図A, B—T2強調画像)。脊髄硬膜外膿瘍の診断のもとL3椎弓半側切除、硬膜外ドレナージを3日間施行した。起炎菌はMSSAであった。抗生剤投与(CEZ)により治癒した(図C, D—T2強調画像)。

ともに抗生剤投与を加えることが推奨されている<sup>22,23)</sup>(図4)。

完全麻痺が24時間以上経過すると不可逆になるといわれるが、小児例では回復力が成人より高いので必ずしも当てはまらない。神経症状がない例では90%が神経脱落症状なく完全に回復するが、神経症状を有するものでは33%にとどまる。硬膜外膿瘍を鑑別診断にあげて、早期診断と治療を行うことにより、永続的神経症状や死亡を防ぐことが肝要である<sup>22,23)</sup>。

## 2. 先天性皮膚洞に伴う髄膜炎、脊髄膿瘍

### (1) 疫学、病態、起炎菌

皮膚洞は、先天性の神経外胚葉奇形であり皮膚から中枢神経に連続する細菌感染経路となりうる。脊椎から頭蓋正中軸のレベルに存在しうるが、多いのは鼻部から前頭蓋底、後頭部から後頭蓋窩、そして腰仙椎レベルの背部から脊椎管内への連続である。頸胸椎レベルにも発生しうるが腰仙椎レベルが最も

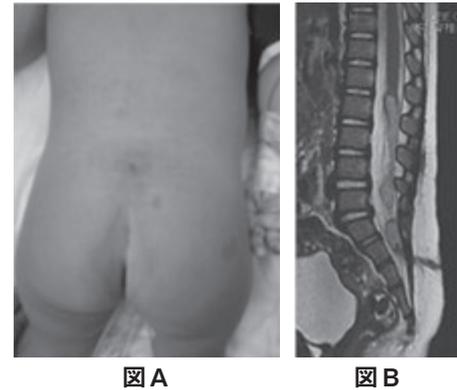


図5 先天性皮膚洞と繰り返す髄膜炎

17ヵ月、女児。繰り返す髄膜炎で発症し、近医で入院による抗生剤投与を繰り返していた。殿裂より高位の腰仙部正中皮膚陥凹を認めた(図A)。腰部MRIにより、腰仙部皮膚洞から髄腔内へ交通を確認し、それにより生じた髄膜炎と診断された(図B—MRIT2強調画像)。起炎菌は*Enterococcus faecalis*であり、ABPC400mg/kg/日を投与しながら先天性皮膚洞の全摘出術を行い、後遺障害なく治癒した。

多い。皮膚洞の深さによって、皮下膿瘍、硬膜外・硬膜下膿瘍、髄膜炎、脊髄髄内膿瘍などいずれの部位にも感染巣を形成しうる<sup>25)</sup>。

### (2) 臨床症状、画像所見

腰仙部の針で突いたような分かりにくい皮膚陥凹と繰り返す髄膜炎は、皮膚洞の危険な合併症として知られているが、その頻度の低さゆえに見逃されることも少なくない。治療の遅れは重篤な後遺障害につながりうる<sup>25,26)</sup>(図5)。繰り返す髄膜炎は最も危険な臨床症状であり、先天性皮膚洞を鑑別診断にあげて、好発部位の皮膚を確認することが最も重要である。皮膚所見を認めた場合は、すみやかなMRIによる脊椎管内の評価と脳神経外科医への紹介を要する。起炎菌は、*Staphylococcus*, *Streptococcus*, *E. coli*などである。

### (3) 外科的治療

皮膚所見から脊椎管内の感染を生じる前に診断し、予防的な手術が行われることが一般的である。脊髄髄内膿瘍や硬膜下膿瘍はすみやかな外科的ドレナージと頭蓋内感染と同様の抗生剤治療を要する。外科的治療の要点は、皮膚洞が中枢神経に連続する部位まで完全に摘出することであり、しばしば皮膚陥凹の存在するレベルから数椎体レベルをこえる頭側まで連続することがある。また、類皮腫や皮腫のような脊髄腫瘍を伴う場合には、炎症性に脊髄に癒着した被膜を含めた摘出を要するため手術難度が増す<sup>25,26)</sup>。

## 文献

- 1) Canale DJ: William Macewen and the treatment of brain abscesses: revisited after one hundred years. *J Neurosurg* 84:133-142, 1996.
- 2) Chalif JI, Gillies MJ, Magdum SA, et al.: Everything to gain: Sir Hugh Cairns' treatment of central nervous system infection at Oxford and abroad. *Neurosurgery* 72:135-142, 2013.
- 3) Rosenblum ML, Hoff JT, Norman D, et al.: Decreased mortality from brain abscesses since advent of computerized tomography. *J Neurosurg* 49:658-668, 1978.
- 4) Gaskill SJ, Marlin AE, Brain abscess and encephalitis, in Albright AL, Pollack IF, Adelson PD, eds, *Principle and Practice of Pediatric Neurosurgery*, Thieme, New York, Stuttgart, 2008 pp1162-1181.
- 5) Hall WA, Truweit CL: The surgical management of infections involving the cerebrum. *Neurosurgery* 62 Suppl 2:519-530, 2008.
- 6) Frazier JL: Management of brain abscesses in children. *Neurosurg Focus* 24:E8,2008.
- 7) Sheehan JP, Jane JA, Ray DK, et al.: Brain abscess in children. *Neurosurg Focus* 24 (6) :E6, 2008.
- 8) Moorthy RK: Management of brain abscess: an overview: *Neurosurg Focus* 24 (6) :E3, 2008.
- 9) Britt RH : Neuroradiological and computerized tomographic findings in experimental brain abscess. *J Neurosurg* 55:590-603,1981.
- 10) Felsenstein S, Williams B, Shingadia D, et al.: Clinical and microbiologic features guiding treatment recommendations for brain abscesses in children. *Pediatr Infect Dis J* 32:129-135, 2013.
- 11) 日本神経感染症学会 細菌性髄膜炎の診療ガイドライン. *神経治療* 24:3-64, 2007.
- 12) Su TM, Lan CM, Tsai YD, et al.: Multiloculated pyogenic brain abscess: experience in 25 patients. *Neurosurgery* 62 Suppl 2:556-561, 2008.
- 13) Cochrane DD, Price A, Dobson S: Intracranial epidural and subdural infections. in Albright AL, Pollack IF, Adelson PD, eds, *Principle and Practice of Pediatric Neurosurgery*, Thieme, New York, Stuttgart, 2008 pp1148-1161.
- 14) Gupta S, Vachhrajani S, Kulkarni AV, et al.: Neurosurgical management of extraaxial central nervous system infections in children. *J Neurosurg Pediatr* 7:441-451, 2011.
- 15) Tunkel AR, Hartman BJ, Kaplan SL, et al: Practical guideline for The management of bacterial meningitis: Practice Guidelines for Bacterial Meningitis. *Clin Infect Dis* 39:1267-1284, 2004.
- 16) Liu ZH, Chen NY, Tu PH, et al.: The treatment and outcome of postmeningitic subdural empyema in infants. *J Neurosurg Pediatr* 6:38-42, 2010.
- 17) Vinchon M, Joriot S, Jissendi-Tchofo P, et al.: Postmeningitis subdural fluid collection in infants: changing pattern and indications for surgery. *J Neurosurg* 104 (6 Suppl) :383-387, 2006.
- 18) Tolia C, Sgouros S, Walsh AR, et al.: Outcome of surgical treatment for subdural fluid collections in infants. *Pediatr Neurosurg* 33: 194-197, 2000.
- 19) Campbell JW: Shunt Infections, in Albright AL, Pollack IF and Adelson PD (eds) :*Principles and Practice of Pediatric Neurosurgery*, 2nd ed. New York: Thieme,2008, pp. 1141-1147.
- 20) Kebriaei MA, Shoja MM, Salinas SM, et al.: Shunt infection in the first year of life.*J Neurosurg Pediatr* 12:44-48, 2013.
- 21) Litofsky NS, Raffle C, McComb JG : Management of symptomatic chronic extra-axial fluid collections in pediatric patients. *Neurosurgery* 31: 445-450, 1992.
- 22) Alton TB, Patel A, Bellabarba CB, et al.: Spinal Epidural Abscesses: Risk Factors, Medical vs Surgical Management, A Retrospective Review of 128 Cases. *Spine J.* 2013 Nov 11. pii: S1529-9430 (13) 01652-5. [Epub ahead of print]
- 23) Connor DE Jr, Chittiboina P, Caldito G, et al.: Comparison of operative and nonoperative management of spinal epidural abscess: a retrospective review of clinical and laboratory predictors of neurological outcome.*J Neurosurg Spine* 19:119-127, 2013.
- 24) Hawkins M, Bolton M: Pediatric spinal epidural abscess: a 9-year institutional review and review of the literature. *Pediatrics* 132 (6) :e1680-1685, 2013.
- 25) Morimoto K, Takemoto O, Nakamura H, et al.: Spinal dermal sinus associated with intramedullary abscess and dermoid. *Pediatr Neurosurg* 39:225-226, 2003.
- 26) Houx L, Brochard S, Peudenier S, et al.: Recovery after tetraplegia caused by dermal sinus infection: intramedullary abscess and tetraparesis.*Pediatr Neurol* 44:229-232, 2011.

## 脳炎・脳症の病理

高橋健太、鈴木忠樹、中島典子、飛梅 実、佐藤由子、  
片野晴隆、長谷川秀樹\*

**【要旨】** ウイルス感染は中枢神経系にさまざまな病態をもたらす。ウイルス性脳炎ではウイルスが脳実質に侵入、増殖することで、組織学的に炎症像が認められる。一方、ウイルス性脳症では明らかな組織学的炎症像を欠く。ウイルス性脳症のなかには、インフルエンザ脳症のように脳実質にウイルスを認めず、全身の反応の一部として、組織学的に浮腫などの非特異的な所見しか認められない疾患が存在する。本稿ではウイルス性脳炎および脳症の代表的疾患につき病理組織像を提示しながら概説するとともに、原因不明脳炎に対する新規の網羅的ウイルス検索法についても紹介する。

**Key Words:** 脳炎、脳症、ウイルス感染症、病理

### はじめに

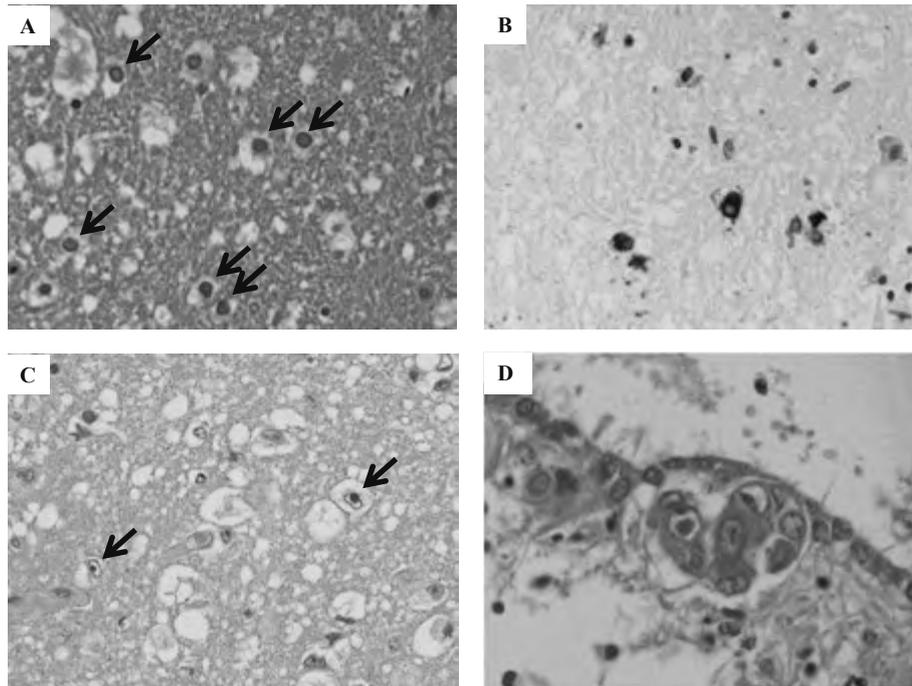
中枢神経系ではウイルス感染を契機として種々の病態が生じる。病理学的に脳炎と脳症は通常、組織においてリンパ球、好中球等の炎症細胞浸潤が認められるか否かによって判断される。つまり、組織学的に炎症がみられなければ病理学的には脳炎とはいえず、脳炎と脳症は宿主側の反応の違いで区別される。

ウイルス性脳炎ではウイルスが脳実質に侵入、増殖し、神経細胞やグリア細胞等の脳固有細胞・組織の障害が認められ、炎症細胞浸潤を伴い、臨床的に多様な神経症状を呈する。たとえばヘルペス脳炎では脳実質の変性・壊死、神経細胞の貪食像や血管周囲の炎症細胞浸潤等の所見とともに細胞内にウイルス封入体を認め、ウイルスの感染・増殖に伴う生体反応としての典型的なウイルス性脳炎像を呈する。エイズ患者や免疫抑制剤使用患者など宿主の免疫能が高度に低下している場合、ウイルスが脳実質で増殖していたとしても炎症所見が乏しいことがある。

一方、病理学的なウイルス性脳症の組織では、一般に炎症像は認められない。臨床的な急性脳症は、意識障害や痙攣、頭蓋内圧亢進症状を主症状とした症候群で、非炎症性の広範な浮腫による急性脳機能不全を認める。ウイルス性脳症の組織ではウイルス

が増殖しているとも限らず、インフルエンザ脳症のような一部のウイルス性脳症においては、ウイルスの脳実質への感染はないが、脳実質で非特異的な浮腫を伴う病態が存在し、サイトカインによる免疫の過剰な応答と、全身の血管あるいは血管内皮傷害が背景に存在すると考えられている<sup>1,2)</sup>。こうしたウイルスが間接的に関与するものまでが脳症に含まれる。

ほかの感染症と同様に、ウイルス性脳炎、脳症の病理診断においても、ヘマトキシリン・エオジン (hematoxylin and eosin: HE) 染色での観察が基本であり、ウイルス封入体などの特異的な組織像を示す疾患は比較的容易に診断されるが、血管周囲や脳実質、髄膜へのリンパ球主体の炎症細胞浸潤や、神経貪食像、ミクログリア結節、反応性の星細胞の増生像などの非特異的所見のみを呈する疾患も多い。またこれらの非特異的組織所見は、血管炎を含む膠原病や脱髄疾患、また中枢神経原発リンパ腫などで認められる像と鑑別困難であることも多く、注意を要する。こうした理由から、ウイルス感染症の病理診断には免疫組織化学や*in situ* hybridization法、polymerase chain reaction (PCR) によるウイルス核酸の検索や電子顕微鏡によるウイルス粒子の同定などの病原体検索が重要であり、形態と併せて総合的に診断される。



**図1** ヘルペスウイルス科ウイルスによる脳炎。単純ヘルペス脳炎 (A、B)、水痘・帯状疱疹ウイルス脳炎 (C)、サイトメガロウイルス脳室脳炎 (D) の組織像

- A. 神経細胞の核にfull型の封入体を認める (矢印)。HE染色。  
 B. 免疫染色でHSV-1のウイルスタンパク質の陽性像を認める。  
 C. Cowdry A型の核内封入体を有する感染細胞を認める (矢印)。HE染色。  
 D. 脳室上衣直下に、Owl's eyeの像を呈するCowdry A型の核内封入体を有する巨細胞を認める。HE染色。

本稿では平成25年10月に宮崎で開催された第18回日本神経感染症学会総会学術集会における教育セミナー「脳炎・脳症の病理」で行った講演の内容を基本に、ウイルス性脳炎・脳症の代表的な疾患の病理について、自験例を中心とした組織像を提示しながら概説し、最後に不明脳炎に対する新規の網羅的なウイルス解析法についても紹介したい。

### ウイルス性脳炎の病理

#### ヘルペス脳炎

単純ヘルペスウイルス (herpes simplex virus: HSV) 1型または2型の初感染あるいは潜伏感染後再活性化による脳炎で、おもに免疫能に異常のない健常者に発症がみられる<sup>3)</sup>。ウイルス性脳炎では最も多い疾患であり、小児-成年例でみられる単純ヘルペス脳炎はほとんどがHSV-1による。おもに産道感染に伴う新生児ヘルペス脳炎は欧米ではHSV-2が優位であるが、本邦では約2:1の割合でHSV-1がHSV-2より多い<sup>4)</sup>。

単純ヘルペス脳炎の典型例では側頭葉内側、前頭葉底部を中心として島や帯状回にかけて病変の主座がみられる。脳実質へのウイルス侵入経路は、嗅神

経を介した経路や、三叉神経節に潜伏感染したウイルスが再活性化して三叉神経の軸索を介した経路、あるいは脳組織にすでに潜伏感染しているウイルスの再活性化が考えられている<sup>5)</sup>。新生児ヘルペス脳炎ではウイルスが血行性に中枢神経へ到達することが考えられ<sup>6)</sup>、病変は通常、脳に広範に分布する。肉眼的に出血性壊死性病変を形成し、組織学的に髄膜への単核球浸潤、脳実質の浮腫、出血、壊死に加え、リンパ球主体の血管周囲への炎症細胞浸潤や脳実質へのマクロファージの浸潤、神経細胞の貪食像であるneuronophagia、ミクログリア結節が認められる。神経細胞やグリア細胞で核内封入体を認め(図1A)、免疫染色では単純ヘルペスウイルスタンパク質が検出される(図1B)。電子顕微鏡による検索ではヘルペスウイルス粒子も認められる。

#### 水痘・帯状疱疹ウイルス脳炎

まれではあるがおもに免疫抑制状態にある患者で、水痘・帯状疱疹ウイルス (varicella-zoster virus: VZV) による脳炎が認められる。VZVは三叉神経節や脊髄後根神経節での潜伏感染のあとに免疫抑制状態に伴い再活性化され、血管炎や血管症 (vasculopathy)、髄膜炎、脊髄炎、脳室炎や脳炎の

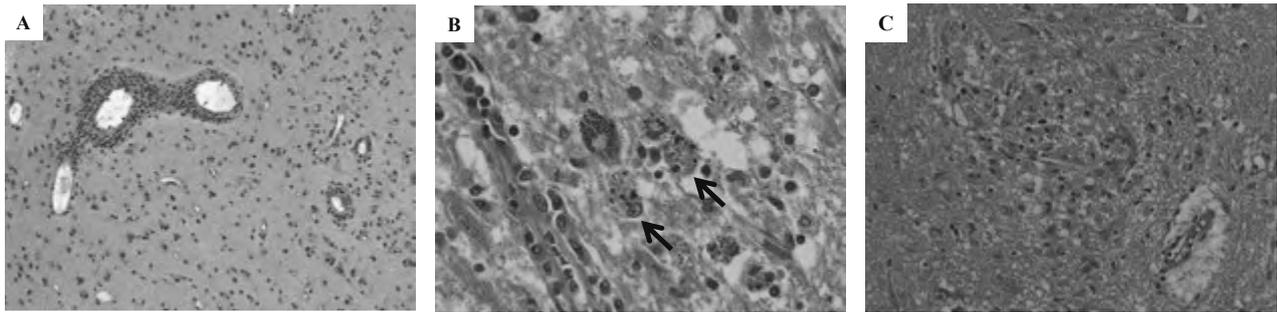


図2 日本脳炎の組織像。HE染色

- A. 血管周囲のリンパ球主体の炎症細胞浸潤。  
 B. 中脳黒質における神経貪食像（矢印）。  
 C. 下オリーブ核でみられるミクログリア結節。

原因となる<sup>7)</sup>。

組織学的には脳実質の浮腫と変性、壊死を認め、血管内皮の腫大、血管周囲や脳実質への単核球主体の炎症細胞浸潤、核内封入体を有する感染細胞が出現する（図1C）。

#### サイトメガロウイルス脳炎

サイトメガロウイルスによる中枢神経系病変はエイズなどの免疫抑制状態にある患者に日和見感染症として発症する。中枢神経系では脳室脳炎の形をとることが多く、脳室上衣、脈絡叢に多く感染細胞を認めるほか、脳室周囲のグリア細胞、神経細胞、血管内皮細胞にも感染がみられる。またミクログリア結節形成を特徴とする脳炎（microglial nodule encephalitis）も多く、脊髄・神経根炎を伴う病型もみられる<sup>8)</sup>。

脳室脳炎症例では肉眼的に脳室周囲は褐色に変性、軟化し、組織学的には上衣細胞および上衣下白質のグリア細胞に感染を認め、フクロウの目（Owl's eye）と呼称される明瞭な核内封入体や細胞質内封入体を有した細胞がみられる<sup>9)</sup>（図1D）。周囲白質は変性、壊死に陥り、多数のマクローファージの浸潤を認める。

#### 日本脳炎

コガタアカイエカ等が媒介する日本脳炎ウイルスによる感染症で、本邦ではワクチンの接種により患者数は激減したが西日本を中心に毎年10例程度までの報告がされている。世界的には南-東南アジアを中心に年間およそ5万例の発生を認める。感染後も大多数は無症状であるが、脳炎発症例では高熱や頭痛、悪心、嘔吐に続き麻痺や痙攣、意識障害等の神経症状を認め、致死率は20-40%に達する。生存例でも約半数で麻痺、痙攣やパーキンソニズム等の重

度の神経後遺症を認める<sup>10)</sup>。

組織学的に特異的な所見に乏しく、血管周囲や脳実質の炎症細胞浸潤、出血、神経貪食像、ミクログリア結節がみられる（図2A-C）。大脳皮質や基底核、視床、脳幹や小脳、脊髄灰白質で広範に病変を認め、特に基底核、視床、中脳黒質は障害を受けやすい。同じフラビウイルス感染症であるウエストナイル脳炎との形態学的な鑑別は困難である。

#### エンテロウイルス71脳炎

手足口病の原因ウイルスの一つとして知られるエンテロウイルス71であるが、肺水腫を含めた多臓器障害や、中枢神経系では髄膜炎や脳脊髄炎症例も認められる<sup>11)</sup>。

脳組織では日本脳炎と同様に特異的な所見には乏しく、壊死と浮腫、実質への好中球を含む急性炎症細胞浸潤像、変性した神経細胞と神経貪食像、ミクログリア結節、血管周囲の炎症細胞浸潤像がみられる。組織学的な鑑別に日本脳炎があげられるが、日本脳炎症例とは病変分布に差が認められ、特に橋レベルでは、エンテロウイルス71による脳炎では背側に病変が認められるのに対し、日本脳炎では腹側まで病変が認められることが報告されている<sup>12)</sup>。

#### 狂犬病

狂犬病は1956年を最後に本邦での発生は50年以上報告されていない。しかし2006年、フィリピン滞在中に犬による咬傷を受けた男性2名が帰国後に発症し、ネパールからの1970年の同様の症例以来36年ぶりの発生となり注目された<sup>13)</sup>。発症するとほぼ例外なく死にいたり、世界的にはいまだに年間55,000人以上が狂犬病により死亡している<sup>14)</sup>。臨床経過は受傷後、数ヶ月程度の潜伏期間を経て感冒様症状にて発症し、典型例では通常5-7日程度の経過で飲水困

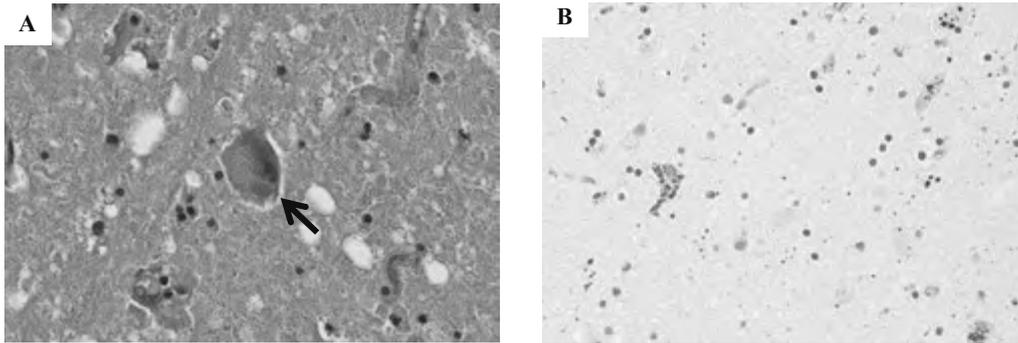


図3 狂犬病症例の脳組織像

- A. 神経細胞に細胞質内封入体（Negri小体）を認める（矢印）。HE染色。  
B. 狂犬病ウイルスに対する免疫染色で陽性シグナルを認める。

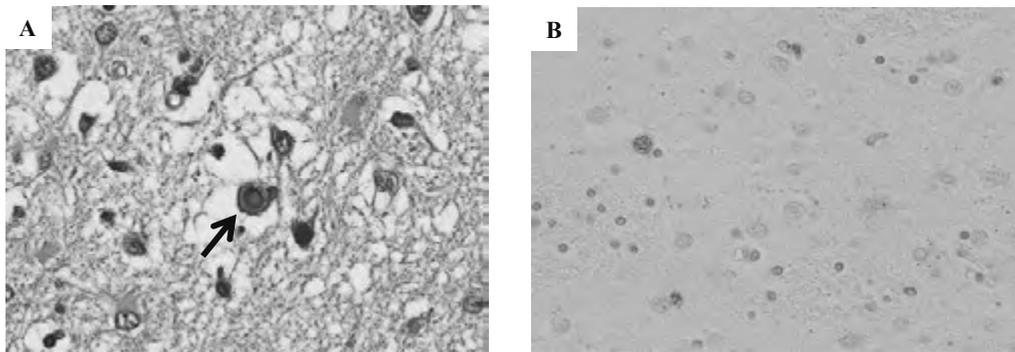


図4 亜急性硬化性全脳炎の組織像

- A. 大脳皮質神経細胞で核内封入体を認める（矢印）。HE染色。  
B. 麻疹ウイルスに対する免疫染色で感染細胞に陽性シグナルを認める。

難に伴う脱水と恐水症状、興奮状態、痙攣重積、昏睡、循環・呼吸障害を伴い、死にいたる。狂犬病ウイルスは咬傷部より神経線維を介して中枢神経系に達し増殖し、末梢神経系全体に広く伝播する。生前診断には後頸部皮膚生検からのRT-PCR、免疫組織化学が有効とされている。

狂犬病症例の脳には通常、肉眼的に異常所見を認めない。組織学的には炎症細胞浸潤の程度はさまざままで、まったく認められないこともある。神経細胞の好酸性細胞質内封入体であるNegri小体は、海馬の錐体細胞やPurkinje細胞に多く認められ特徴的な所見であるが（図3A）、症例によってはNegri小体が不明瞭な場合や数が少ない場合もあり、診断には狂犬病ウイルスに対する免疫染色が有用である（図3B）。

#### 亜急性硬化性全脳炎

亜急性硬化性全脳炎（subacute sclerosing panencephalitis: SSPE）は、変異型麻疹ウイルスの中枢神経系への持続感染により、感染後数年程度で発症し、症例により罹病期間は異なるが慢性緩徐性に進行する予後不良な疾患で、大多数は致死経過

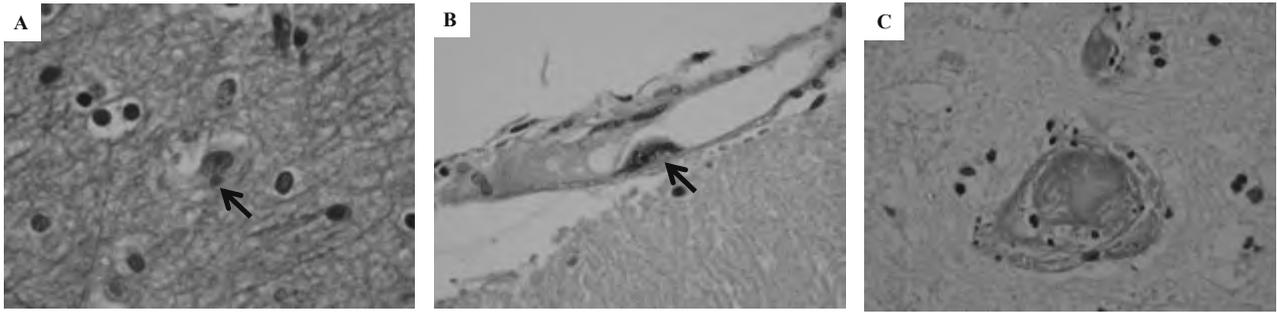
をたどる<sup>15,16</sup>。本邦では約100-200人程度の患者が存在すると想定されている<sup>17</sup>。

経過の長い症例では肉眼的に大脳萎縮と脳室拡大を認める。組織学的に神経細胞の脱落、血管周囲や脳実質、髄膜の単核球主体の炎症細胞浸潤、反応性の星細胞の増生、脱髄を認め、おもに神経細胞や乏突起膠細胞で核内や胞体内に封入体がみられる（図4A）。経過の長い症例ではリン酸化タウの蓄積によるアルツハイマー型神経原線維変化もみられる。麻疹ウイルスの免疫染色では感染細胞に陽性シグナルを認める（図4B）。

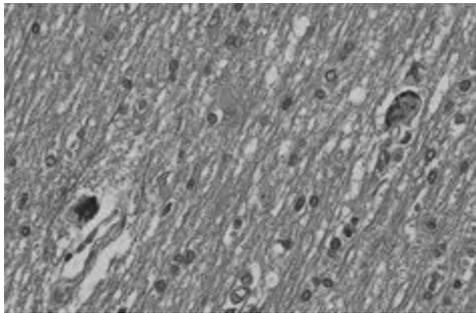
#### ニパ脳炎

ニパウイルス感染症は1998年から1999年にマレーシアおよびシンガポールでアウトブレイク（局地的流行）がみられ、急性脳炎が認められた265名の患者のうち105名が死亡した<sup>18,19</sup>。自然宿主はコウモリで中間宿主のブタを介してヒトに感染し、発熱、頭痛、嘔吐等とともに脳炎を発症する。

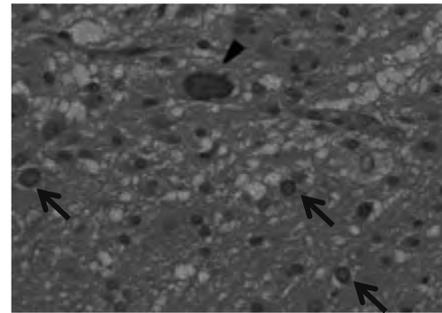
組織学的には浮腫、神経貪食像や血管周囲の炎症細胞浸潤に加え、神経細胞や血管内皮細胞の細胞質および核に好酸性封入体を形成し（図5A、B）、免



**図5** ニパ脳炎の組織像。HE染色  
 いずれもMalaya大学K.T. Wong教授の御厚意により提供。  
 A. 神経細胞の封入体 (矢印)。  
 B. 封入体を有する血管内皮の感染細胞 (矢印)。  
 C. 微小血管内血栓と梗塞巣。



**図6** HIV脳症の組織像。HE染色  
 多核巨細胞が認められる。



**図7** PMLの組織像。HE染色  
 腫大した核を有する乏突起膠細胞 (矢印) と奇怪な形態を呈する星細胞 (矢頭)。

疫染色でウイルスタンパク質が証明される。また血管内皮細胞感染に伴う血管内皮傷害と血栓形成 (図5C) によると考えられるnecrotic plaqueといわれる特徴的な梗塞巣の形成を認める。急性期より回復したあとに再発する症例 (relapse Nipah encephalitis) もみられ、同心円状の境界をもったより大型の壊死巣の形成が認められる<sup>20)</sup>。

**ウイルス性脳症の病理**

**HIV脳症**

エイズ患者のおよそ30%の症例で認知症など中枢神経症状を認め、HIV関連神経認知障害 (HIV-1 associated neurocognitive disorder: HAND) といわれる。HANDにはほとんど組織学的に変化を認めない軽微なものから、慢性炎症や免疫による間接的な神経障害のほかにhuman immunodeficiency virus (HIV) そのものによる脳症が含まれる。Highly active antiretroviral therapy (HAART) の導入によりHIV脳症の例は激減しているが、軽微な認知障害はむしろ増加している<sup>21)</sup>。

HIV脳症の典型例では組織学的に白質においてマ

クロファージに由来する特徴的な多核巨細胞 (図6) やミクログリア結節が出現する。また脊髄ではおもに側索・後索の髄鞘で空胞形成を伴うvacuolar myelopathyが認められる症例も知られている<sup>22)</sup>。

**進行性多巣性白質脳症**

進行性多巣性白質脳症 (progressive multifocal leukoencephalopathy: PML) は、おもに免疫抑制状態にある患者においてJCウイルスにより惹起される致死性疾患であり、近年では多発性硬化症やクローン病の治療薬として使用されるナタリツマブなどの抗体医薬による発症が報告され注目されている。JCウイルス初感染は通常幼・小児期に無症候性に成立する。臨床症状、画像所見、ほかの疾患の除外によりPMLが疑われる症例において、PCRによる脳脊髄液からのウイルスゲノム検出はPML診断に高い特異性を示す。確定診断には脳組織検索が必要である<sup>23)</sup>。

組織学的にはPML脳病変部は、癒合傾向を示す白質の多巣性脱髄病変、核の腫大した乏突起膠細胞、奇怪な形態を呈する星細胞を認める (図7)。脱髄を伴う病変中心部では炎症細胞浸潤はほとんどみら

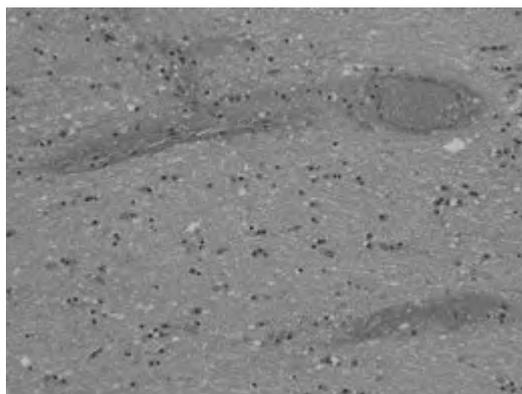


図8 インフルエンザ脳症の組織像。HE染色  
血管周囲の炎症性滲出物。炎症像を欠く。

れず、変性した組織を貪食するマクロファージを多数認める。HAART 導入後の免疫再構築症候群として発症したPML症例では炎症像を呈する症例もみられる。また小脳顆粒細胞や大脳皮質神経細胞へのウイルス感染を有する症例も報告されている<sup>24,25)</sup>。免疫染色では標的ウイルスタンパク質ごとに染色性が異なり、VP1は核と一部胞体に陽性、VP2/3は核に陽性、agnoproteinは胞体に陽性で、これら後期タンパク質の免疫染色は特異性が高い。

#### インフルエンザ脳症

インフルエンザウイルス感染に伴う脳症で本邦では年間数百例程度までの報告がされている。5歳以下での発症が多く、典型的にはインフルエンザの発症当日ないし翌日に神経症状が出現し、39-40℃の発熱、意識障害、痙攣、嘔吐、頭痛等の症状を認める<sup>2)</sup>。治療ガイドライン導入により死亡率は30%から10%以下に改善するも依然として後遺症は約20%の症例にみられる<sup>26)</sup>。

病理所見では肉眼的に高度の脳浮腫を認め、小脳扁桃ヘルニアを伴うこともある。組織学的には高度の浮腫と血漿成分の脳実質への漏出を認めるが、脳実質への炎症細胞浸潤を欠き(図8)、脳実質細胞にウイルスの感染および増殖所見は認めない<sup>27,28)</sup>。また急性脳症における浮腫に伴う変化として、星細胞で細胞突起がビーズ状に断裂するclasmatodendrosisを認め、免疫染色にてglial fibrillary acid protein (GFAP) 陽性の小顆粒がびまん性にみられる<sup>29)</sup>。

#### 不明脳炎の診断

ウイルス性脳炎においては、一部のウイルス感染

症では疾患特異的な像を呈するために臨床的検索および通常の病理学的検索にて確定診断が行われるが、実際には臨床的に原因病原体の推定が困難で、病理組織においても非特異的なウイルス性脳炎の所見しか認められない症例も多く存在する。

これらウイルス感染が疑われ、原因ウイルスの推定が困難である不明感染症症例の病理検体に対し、原因ウイルスを網羅的にスクリーニングする目的で、われわれの施設ではmultivirus real-time PCR systemを開発した<sup>30)</sup>。この検索ではreal-time PCRを応用し、臨床検体より抽出したDNA・RNAを鋳型として、96 wellプレート各wellに2種類の蛍光色素を有するプローブ・プライマーセットを使用することで、163種類のウイルスを網羅的に同時に検出することが可能である。不明脳炎を含めた不明ウイルス感染症の解析に有効であり、国立感染症研究所感染病理部においては診断困難な不明脳炎として検索依頼された症例のうちおよそ25%の症例で、同検索法により原因ウイルスが同定されている。また、近年では次世代シーケンサーを用いた網羅的病原体解析も行われている。サンプル内のすべての核酸の遺伝子配列を明らかにする次世代シーケンサーは病原体検索にもきわめて有力なツールである。これら新しい網羅的病原体遺伝子検出系は、高い費用と検索可能な施設に限られる点が問題である。今後、こうした高度な検出系が低価格化、簡易化され、普及することを期待したい。

#### おわりに

本稿では、ウイルス感染による代表的な脳炎・脳症について組織像を示しながら概説した。ウイルス感染症は多岐にわたりウイルス性脳炎あるいは脳症の全疾患を本稿で網羅することは困難であるが、本稿が多少なりともウイルス性脳炎・脳症の病理学的側面からの理解の一助となれば幸いである。

#### 謝辞

本稿を執筆するにあたり、国立感染症研究所感染病理部に中枢神経系病変の解析依頼をいただいた先生方、ニパ脳炎症例につき快く組織写真使用の許可をいただいたマレーシアMalaya大学病理学K.T. Wong教授に深く御礼申し上げます。

## 文献

- 1) Kawada J, Kimura H, Ito Y, et al.: Systemic cytokine responses in patients with influenza-associated encephalopathy. *J Infect Dis* 188 : 690-698, 2003.
- 2) 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.
- 3) Kleinschmidt-DeMasters BK, Gilden DH : The expanding spectrum of herpesvirus infections of the nervous system. *Brain Pathol* 11 : 440-451, 2001.
- 4) 森島恒雄 : 本邦臨床統計. *日本臨牀* 58 : 845-850, 2000.
- 5) Steiner I, Kennedy PG, Pachner AR : The neurotropic herpes viruses: herpes simplex and varicella-zoster. *Lancet Neurol* 6 : 1015-1028, 2007.
- 6) Kimura H, Futamura M, Kito H, et al.: Detection of viral DNA in neonatal herpes simplex virus infections: frequent and prolonged presence in serum and cerebrospinal fluid. *J Infect Dis* 164 : 289-293, 1991.
- 7) Kleinschmidt-DeMasters BK, Gilden DH : Varicella-Zoster virus infections of the nervous system: clinical and pathologic correlates. *Arch Pathol Lab Med* 125 : 770-780, 2001.
- 8) Kalayjian RC, Cohen ML, Bonomo RA, et al.: Cytomegalovirus ventriculoencephalitis in AIDS. A syndrome with distinct clinical and pathologic features. *Medicine (Baltimore)* 72 : 67-77, 1993.
- 9) Matsukawa T, Goto H, Takahashi K, et al.: A fatal case of cytomegalovirus ventriculoencephalitis in a mycosis fungoides patient who received multiple umbilical cord blood cell transplantations. *Int J Hematol* 95 : 217-222, 2012.
- 10) Misra UK, Kalita J : Overview: Japanese encephalitis. *Prog Neurobiol* 91 : 108-120, 2010.
- 11) Ooi MH, Wong SC, Lewthwaite P, et al.: Clinical features, diagnosis, and management of enterovirus 71. *Lancet Neurol* 9 : 1097-1105, 2010.
- 12) Wong KT, Ng KY, Ong KC, et al.: Enterovirus 71 encephalomyelitis and Japanese encephalitis can be distinguished by topographic distribution of inflammation and specific intraneuronal detection of viral antigen and RNA. *Neuropathol Appl Neurobiol* 38 : 443-453, 2012.
- 13) Tobiume M, Sato Y, Katano H, et al.: Rabies virus dissemination in neural tissues of autopsy cases due to rabies imported into Japan from the Philippines: immunohistochemistry. *Pathol Int* 59 : 555-566, 2009.
- 14) World Health Organization. Rabies. Fact Sheet No 99. (Accessed January, 2014, at <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/en/>)
- 15) Garg RK : Subacute sclerosing panencephalitis. *J Neurol* 255 : 1861-1871, 2008.
- 16) Gutierrez J, Issacson RS, Koppel BS : Subacute sclerosing panencephalitis: an update. *Dev Med Child Neurol* 52 : 901-907, 2010.
- 17) 岡 明、愛波秀男、鈴木保宏、ほか : 亜急性硬化性全脳炎の全国サーベイランス調査の進捗状況。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 平成二十四年度 総括・分担研究報告書 (研究代表者 山田正仁) 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業 (難治性疾患克服研究事業) : 99-105, 2013.
- 18) Chua KB, Goh KJ, Wong KT, et al.: Fatal encephalitis due to Nipah virus among pig-farmers in Malaysia. *Lancet* 354 : 1257-1259, 1999.
- 19) Parashar UD, Sunn LM, Ong F, et al.: Case-control study of risk factors for human infection with a new zoonotic paramyxovirus, Nipah virus, during a 1998-1999 outbreak of severe encephalitis in Malaysia. *J Infect Dis* 181 : 1755-1759, 2000.
- 20) Wong KT, Shieh WJ, Kumar S, et al.: Nipah virus infection: pathology and pathogenesis of an emerging paramyxoviral zoonosis. *Am J Pathol* 161 : 2153-2167, 2002.
- 21) Ances BM, Ellis RJ: Dementia and neurocognitive disorders due to HIV-1 infection. *Semin Neurol* 27 : 86-92, 2007.
- 22) Petit CK, Navia BA, Cho ES, et al.: Vacuolar myelopathy pathologically resembling subacute combined degeneration in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 312 : 874-879, 1985.
- 23) 進行性多巣性白質脳症 (Progressive Multifocal Leukoencephalopathy : PML) 診療ガイドライン 2013. 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業 (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 (研究代表者 山田正仁) , 2013. (Accessed January,

- 2014, at <http://prion.umin.jp/file/PML2013.pdf>.)
- 24) Koranik IJ, Wüthrich C, Dang X, et al.: JC virus granule cell neuronopathy: A novel clinical syndrome distinct from progressive multifocal leukoencephalopathy. *Ann Neurol* 57 : 576-580, 2005.
- 25) Wüthrich C, Dang X, Westmoreland S, et al.: Fulminant JC virus encephalopathy with productive infection of cortical pyramidal neurons. *Ann Neurol* 65 : 742-748, 2009.
- 26) 森島恒雄 : 小児の急性脳炎・脳症の現状. *ウイルス* 59 : 59-66, 2009.
- 27) 森島恒雄 : インフルエンザ脳症の発症因子の解明と治療及び予防方法の確立に関する研究. 厚生労働科学研究費補助金 (新興・再興感染症研究事業) 平成15年度 研究報告書 3-19, 2004.
- 28) 山田晋一郎、安井敬三、長谷川康博、ほか : パンデミック (H1N1) 2009インフルエンザ脳症の1割検例. *臨床神経学* 52 : 480-484, 2012.
- 29) 大浜栄作 : アストロサイトの解剖学と病理学. *Clinical Neuroscience* 29 : 1228-1233, 2011.
- 30) Katano H, Kano M, Nakamura T, et al.: A novel real-time PCR system for simultaneous detection of human viruses in clinical samples from patients with uncertain diagnoses. *J Med Virol* 83 : 322-330, 2011.

# Ras-Raf-ERK経路からみたA型インフルエンザ（H1N1）感染

松川昭博、伊藤利洋

**【要旨】**「炎症」は生体侵襲に対する最初の生体防御系として働く。しかし、過剰な炎症反応は生体にとってむしろ有害である。炎症反応は、細胞外（炎症メディエーター）、細胞表面（レセプター）、細胞内（シグナル伝達）、核内（転写因子）で制御される（**図1**）。制御系の破綻は全身性の炎症に進展し、ときに致死的となる。われわれは、細胞内サイトカイン情報伝達とそのフィードバック制御による炎症制御に着目して研究を展開している。本稿では、サイトカインシグナル伝達系について概説し、A型インフルエンザ（H1N1）感染時のRas-Raf-ERK経路とその内因性制御因子の役割についてわれわれの研究成果を紹介したい。

**Key Words:** A型インフルエンザウイルス、サイトカインシグナル伝達、生体防御

## はじめに

インフルエンザウイルス感染症は毎年継続して流行し、社会活動にも大きな影響を与えている。数年から数十年の周期で新型のインフルエンザウイルスが出現し、そのパンデミックが起こっている。2009年の新型インフルエンザ（H1N1）が世界中で猛威を振るったのは記憶に新しい<sup>1)</sup>。ウイルスは標的細胞の表面に吸着し、細胞内に侵入して核内で増殖する。JAK-STATやMAPKは炎症を伝達するサイトカインシグナル伝達系であるが、最近このサイトカインシグナル伝達系のウイルス感染における意義が注目されている。本稿では、サイトカインシグナル伝達系について概説し、H1N1感染時のRas-Raf-ERK経路とその内因性制御因子の役割について紹介したい。

## シグナル伝達抑制経路

JAK/STAT (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription) 経路は代表的なサイトカインシグナル伝達経路である。サイトカインが受容体に結合すると受容体は重合してJAKが活性化され、ついで転写因子STATが活性化される。STATはダイマーとなり核内に移行し、遺伝子プロ

モーターに結合してさまざまな遺伝子発現を誘導する。このとき、JAK/STAT経路の抑制に働くSOCS (suppressor of cytokine signaling) 因子も産生され、サイトカインシグナル伝達の負の制御因子として働く<sup>2)</sup>。SOCSは、①JAKのキナーゼ活性を阻止、②STATのサイトカインレセプターへの移動を阻止、③サイトカインレセプターやJAKをプロテアソームで分解する、ことでJAK/STAT経路を抑制する（**図2**）。SOCSは8つのファミリー（CISとSOCS1-7）からなる。なかでも、SOCS3・SOCS5はそれぞれTh2・Th1細胞に発現し、Th1・Th2反応を抑制して免疫応答を調整することが知られている<sup>2)</sup>。

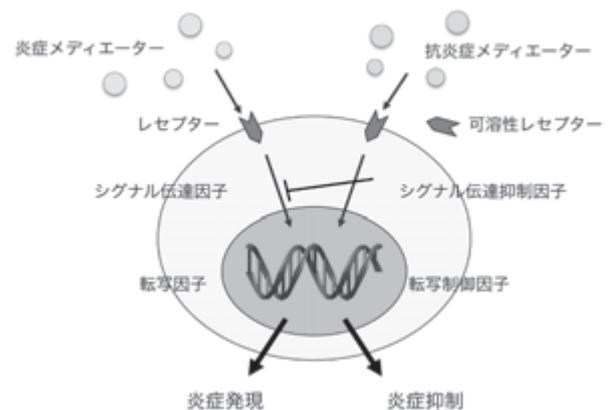


図1 炎症の多段階調節機構

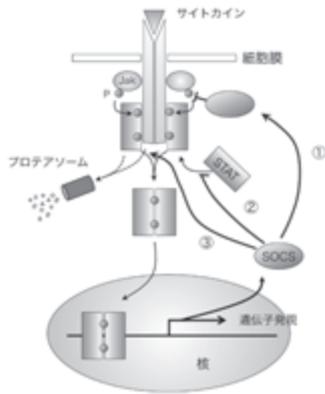


図2 JAK/STAT経路とSOCS

SOCSは、①JAKのキナーゼ活性を阻止、②STATのサイトカインレセプターへの移動を阻止、③サイトカインレセプターやJAKをプロテアソームで分解する、ことでサイトカイン情報を抑制する。

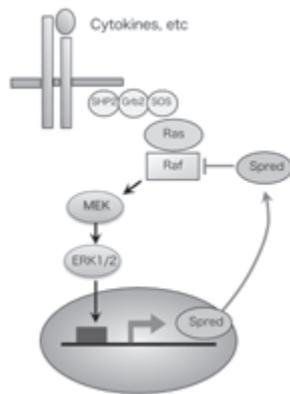
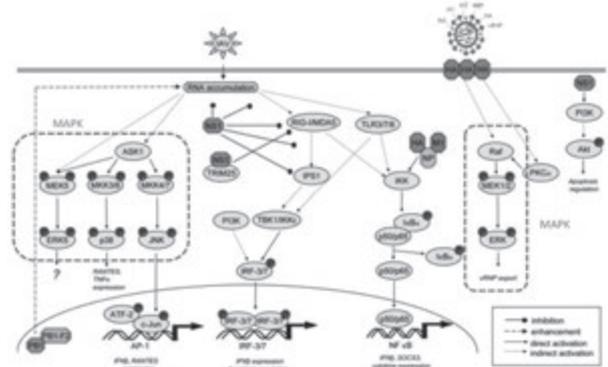


図3 ERK-MAPKとSpred因子

MAPK (mitogen-activated protein kinase) 経路は、もう一つの代表的なサイトカインシグナル伝達経路である。MAPK経路はERK (Extracellular Signal-regulated Kinase) -1/2、JNK (c-jun N-terminal kinase)、p38経路からなる<sup>3)</sup>。ERK1/2はMAPKファミリーのなかで最初に同定された古典的MAPKで、成長因子やサイトカイン・ケモカインが受容体に結合すると受容体細胞内ドメインのリン酸化が生じ、Ras、Raf、MEKが活性化され、ついでERKの活性化が起こる。ERKは核内に移行して細胞増殖、分化、遊走にかかわる遺伝子発現を誘導する。Sprouty/SpredファミリータンパクはERK1/2の内因性制御因子である<sup>4)</sup>。SpredはRasに結合し、Rafのリン酸化を抑制してERK経路を抑制する(図3)。Spred因子は3つのファミリータンパクからなり、Spred-1/-2は神経系に選択的に発現するが、Spred-2は緒臓器一般に発現する<sup>5)</sup>。



Microbes and Infection 12 (2010) 81-87より改変

図4 H1N1感染とシグナル伝達

### A型インフルエンザウイルス感染と Ras-Raf-ERK経路

Ras-Raf-ERK経路は、インフルエンザウイルスの表面上に存在する抗原性糖タンパク質 Hemagglutinin (HA) の標的細胞表面のシアル酸への結合やウイルス感染による酸化ストレスおよびサイトカイン刺激で活性化される(図4)<sup>6)</sup>。われわれは、ERK経路とその抑制因子Spredに焦点をあてインフルエンザウイルス感染の分子基盤を解析している。気道上皮細胞MLE-12にA型インフルエンザウイルス(H1N1)を感染させると、ERK活性化とSpred-2の発現は上昇する。Spred-2をsiRNAでノックダウンするとMLE-12細胞でのERK活性は増強する。Spred-2欠損マウスにH1N1を感染させると、肺でのERK活性化は野生型マウスにくらべて増強する。これらの結果は、H1N1感染時における内因性Spred-2による感染制御機構を示唆する。Spred-2欠損マウスにH1N1を感染させると、H1N1肺炎は野生型マウスと比較して有意に増悪し、マウス死亡率は上昇した。このとき、肺内ウイルス量は増加し、タイプIインターフェロン、インターロイキン6やCXCLケモカイン産生量は上昇した。Spred-2欠損マウスにU0126(ERK阻害剤)を投与すると、H1N1感染後のERK活性化は減少し、サイトカイン産生とウイルス量の減少がみられ、マウス死亡率は改善した。野生型マウスとSpred-2欠損マウスの骨髄キメラマウスの実験から、肺胞上皮由来のSpred-2がH1N1感染の重篤度にかかわることが明らかとなった。Spred-2をノックダウンしたMLE-12にH1N1を感染させるとウイルス量は有意に増加した。一方、Spred-2をノックダウンしたRAW細胞(マクロファージ)においても、H1N1感染後のサイトカイン産生量は有意に増加した。以上より、

Spred-2は気道上皮細胞でのウイルス増殖抑制とウイルス感染後に二次的に起こる肺胞マクロファージからのサイトカイン産生抑制に関与すると考えられる。

### おわりに

インフルエンザウイルス感染にERK/MAPK経路がかかわること、その経路はSpred-2によって制御されることを示した。われわれは、H1N1感染後にARDSで死亡した剖検肺においてもSpred-2の発現を確認している。Spred-2はインフルエンザウイルス感染制御の新規ターゲットになる可能性がある。ほかのウイルス感染におけるSpred-2の役割も興味深い。今後の研究展開に期待したい。

### 文献

- 1) Glatman-Freedman A, Portelli I, Jacobs SK, et al: Attack rates assessment of the 2009 pandemic H1N1 influenza A in children and their contacts: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 7: e50228, 2012.
- 2) Tamiya T, Kashiwagi I, Takahashi R, et al: Suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins and JAK/STAT pathways: regulation of T-cell inflammation by SOCS1 and SOCS3. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31: 980-985, 2011.
- 3) Kim EK, Choi EJ: Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim. Biophys. Acta* 1802:396-405, 2010.
- 4) Wakioka T, Sasaki A, Kato R, et al: Spred is a Sprouty-related suppressor of Ras signalling. *Nature* 412:647-651, 2001.
- 5) Engelhardt CM, Bundschu K, Messerschmitt M, et al: Expression and subcellular localization of Spred proteins in mouse and human tissues. *Histochem. Cell Biol* 122:527-538, 2004.
- 6) Ehrhardt C, Seyer R, Hrincius ER, et al: Interplay between influenza A virus and the innate immune signaling. *Microbes Infect* 12:81-87, 2010.

## 教育講演 6

## 新生児脳症と周産期医療

鮫島 浩

【要旨】周産期医療の発達に伴い児の救命率は改善した。一方、脳性麻痺発生率は減少せず、その背景には、未熟児で増加し、成熟児で減少している現状がある。われわれは新生児脳症に注目して脳性麻痺に関する population-based 研究を実施し、低酸素/仮死、未熟性、発育不全が周産期死亡と脳障害とに連続的に関与していることを明らかにした。これは脳障害のリスク因子が周産期医療の発達とともに死亡から脳障害に移動している可能性を示唆している。今後、低酸素/仮死、未熟性、発育不全というリスク因子に焦点を当て、その複合的作用を検討する研究が重要である。

**Key Words:** 脳性麻痺、新生児脳症、population-based 研究、未熟性、低酸素虚血

## 目的

周産期医療の発展に伴い、周産期死亡率は著明に減少し、日本では約30年間で1,000分あたり20から4へと1/5にまで減少した（図1）。この減少率に比し、周産期脳障害の発症率はほとんど変化せず、日本を含め先進諸国でも発展途上国でも、過去30年間、2/1,000前後で変化していない（表1）<sup>1)</sup>。

脳性麻痺が減少していない背景には多くの要因が推測され、さまざまな仮説が報告されている。2002年、米国小児科学会と同産婦人科学会とが脳性麻痺に関するタスクフォースを立ち上げ、新生児脳症と

いう新たな「切り口」を加えることで脳性麻痺の定義を一本化し、その研究を推進させる方向性を打ち出した<sup>2)</sup>。

われわれは宮崎大学が中心となって周産期予後不良症例の全例調査を行い、1997年から population-based 研究として実施している<sup>3,4)</sup>。これまで16年間、分娩数では17万例をこえるデータベースとなっている。そのなかで、神経学的予後不良症例に関しては新生児脳症の観点からデータ収集を行ってきた。この蓄積されたデータを基に、今回、周産期医療と脳障害に関して後方視的検討を加えた。

表1 脳障害発症率

Year	Country	CP (/1,000)
1966	England	1.5
1975	Norway	2.6
1977	England	2.2
1980	USA	2.0
	Japan	1.4
	Slovenia	2.3
1985	USA	2.3
	India	1.2
	Canada	2.6
1990	England	2.5
	China	2.3
	Malta	2.0
2001-2010	Miyazaki	2.08

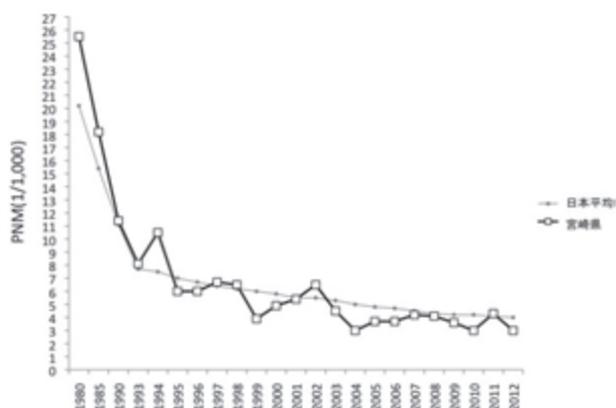


図1 周産期死亡率 (PNM, 1/1,000) の比較

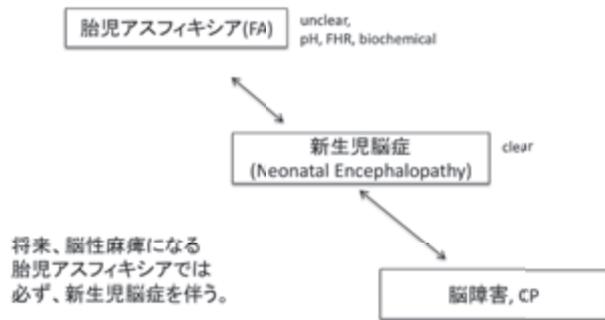


図2 産科医療と新生児脳症

## 対象・方法

### 1) 新生児脳症

新生児脳症とは、米国小児科学会と同産婦人科学会の2002年の共同声明によると、新生児期に以下の神経学的症状を示すものと定義されている<sup>2)</sup>。すなわち、意識障害、神経反射や筋緊張の異常、摂食障害、呼吸障害、痙攣であり、これらの障害が一過性のものも含む。この神経学的症状はきわめて明確であり、臨床的診断は比較的容易である。

ただし、未熟性によって影響を受けるため、現時点では妊娠34週以降に限る、と暫定的に定義してある。

### 2) 分娩時事象

現在では、分娩時の低酸素事象が原因で脳性麻痺になる場合、必ず、新生児脳症を発症すると考えられている。換言すれば、新生児脳症とは、分娩時事象と脳性麻痺とをつなぐ架け橋である。

ただ、このなかで問題となる点は、分娩時の低酸素事象の定義が曖昧な点である。臍帯動脈血pH値で7.0未満が临床上、汎用されているが、7.0未満であるからといって必ず脳障害を引き起こすわけではなく、同様に、7.0以上であるからといって脳障害にならないとはいえない、という限界をもつ。アプガー値も同様である。胎児心拍数モニタリング所見でも、よいパターンでは児は健康であるといえるが、悪いパターンと脳障害との関連性は低いことが知られている。これまでに種々の生化学的検査が脳障害のマーカーとなりうるかが検討されてきたが、いずれも脳障害との直接的な関連性は低い。

このような背景のなか、周産期医療の現場では、分娩時の異常と後発する脳障害との架け橋が臨床的に求められていた。2002年の米国小児科学会と同産婦人科学会の共同声明により、図2に示すように、胎児アシフィキシアと脳障害とをつなぐ架け橋とし

て新生児脳症が置かれた<sup>2)</sup>。

すなわち、胎児アシフィキシアが疑われる所見があれば、新生児早期の新生児脳症の有無を確認し、所見を認めれば脳障害ハイリスクとして重点的に治療と観察を行い、嚴重にフォローアップすることが可能となる。一方、新生児脳症の臨床症状をひとつも認めない症例では、分娩時の低酸素事象が直接的な原因で脳障害となる危険性はないに等しいと考えられる。

この概念は明確であり、臨床診断も明確であることから、新生児脳症を診断基準に盛り込んだ判断基準が提唱されるにいたった。

### 3) 新生児脳症を含む診断基準

前述のように、脳性麻痺にいたるほどの分娩時低酸素症であれば、早期新生児脳症を必ず発症する。そこで脳性麻痺の原因となる分娩時低酸素症の十分条件として、4つの因子がすべてそろふことという診断基準が提唱された<sup>2)</sup>。

1. 代謝性アシドーシス (pH<7.0, BE)-12mmol/L)
2. 34週以降で、早期発症の新生児脳症
3. 痙攣四肢麻痺 (dyskinetic typeを含む)
4. ほかの除外因子を含まないこと (遺伝子異常、感染症、外傷など)

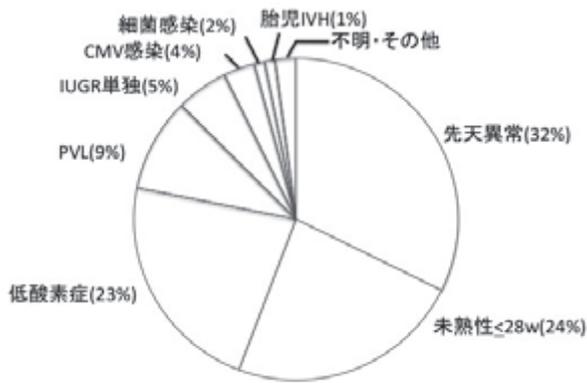
また、上記の4つの必須条件以外でも、以下の5項目があれば分娩中の事象が原因である可能性があり、関連因子として重要である。

1. 分娩時の常位胎盤早期剝離などの明らかな低酸素事象が認められる
2. 正常な胎児心拍数パターンから明らかな異常パターンの出現
3. アプガー 5分値が4点未満
4. 生後72時間までに出現した多臓器障害
5. 早期の脳画像診断

必須条件の4項目がすべてそろえば分娩時事象が原因で脳性麻痺になったと、高い蓋然性でいえると考えられている。しかし、この命題の「裏」や「逆」は必ずしも正しいとは限らない。すなわち、必須の4条件がすべてそろっていないからといって、「脳性麻痺の原因は分娩時ではない」とはいえない。

## 結果：宮崎県のpopulation-based研究の結果

宮崎大学では、新生児脳症に焦点を当て、宮崎県で発生した周産期死亡と脳障害に関して、全県下をフィールドとした全数調査臨床研究を1997年から継続して実施している (脳障害に関しては1998年から



宮崎県総出生数 136,756例対象, (1998~2010年)

図3 宮崎県Population-based study: 脳障害275例

開始)。その詳細はこれまでの報告に譲る<sup>3,4)</sup>。

まず、宮崎県の周産期死亡率を日本の平均と比較した(図1)。多少の変動はあるものの、2003年以降、日本の平均より周産期死亡が低いレベルを維持している。このように、近年の宮崎県は周産期医療の先進地域であるといえ、今回、そこをフィールドとして脳障害発症のリスク因子を検討した。

2010年までに出生した136,756例中、早産児を含めて新生児脳症を経由して脳障害と診断された症例は275例であり、発症頻度は2/1,000であった。この頻度は世界的にみて、先進国の標準的数値である。275例のリスク因子の内訳を図3に示す。先天異常が1/3、28w以下の未熟性単独が1/4、低酸素症が1/4、その他、PVL(脳室周囲白質軟化症)、IUGR(子宮内胎児発育遅延)、感染症などが抽出されている。分娩中の低酸素症の割合は、これまでの報告と同様であり、全体の10-20%前後であった。

宮崎県のpopulation-based研究の資料を基に、さらに詳細な研究を進めており、今回、そのなかの2つを簡略に示す。

1) 周産期死亡と脳障害とのリスク因子の関連性

たとえば、重篤な仮死で出生することが予測される場合、死産となる可能性もあれば、娩出したものの新生児死亡となる可能性、また新生児蘇生法によって救命できたものの脳障害を残す危険性、さらに脳低体温等の治療によりintact survivalになる可能性など、いろいろな状況が想定される。

したがって、脳性麻痺の現状を解明するためには、単に脳障害の原因を検討するだけでは不十分であり、周産期死亡の原因との関連性や連続性まで加味した検討が重要であろうと推測される。

この観点から、1998年から2008年までの11年間、

表2 周産期予後不良に及ぼすリスク因子

多変量解析の結果

リスク因子	胎内死亡	新生児死亡	脳障害
未熟性<34w	12.5 (10.1-15.5)	10.0 (8.7-11.7)	9.2 (8.1-10.6)
発育遅延	2.7 (2.3-3.2)	2.3 (2.0-2.7)	1.9 (1.7-2.2)
仮死-低酸素	7.6 (6.5-8.8)	7.9 (6.0-10.4)	11.8 (9.5-14.6)

オッズ比、95%信頼区間

12万分娩のデータを用い、周産期死亡例492例、脳障害例233例の解析を行った<sup>5)</sup>。死産、新生児死亡、脳障害のリスク因子のなかで頻度順に高いほうから5因子を分析したところ、34週未満の早産、先天異常、低酸素関連、IUGRが周産期死亡例にも脳障害例にも含まれていた。そこで先天異常をのぞいた3因子を独立変数とするモデルを作成し、死産、新生児死亡、脳障害を従属変数として、12万症例による多変量解析を行った。

その結果、表2に示すように、低酸素関連は、死産、新生児死亡、脳障害に対して約10倍の危険因子であることが判明した(早産やIUGRを加味してもオッズ比約10倍)。同様に、34週未満の早産も、死産、新生児死亡、脳障害に対して約10倍の危険因子であり、IUGRも死産、新生児死亡、脳障害に対して約2倍の危険因子であった。

すなわち、低酸素症を例にとってみると、死産、新生児死亡、脳障害に、ほぼ同じ相対危険度で影響を及ぼしていると考えられ、脳障害の原因として検討するには周産期死亡との関連性を重要視する必要があることを示唆している。早産でも、未熟性が周産期死亡に及ぼす影響と同様に、脳障害に及ぼす影響も大きいことを示しており、臨床の現場で実際に経験する事象を裏付けるデータでもある。

2) 周産期死亡と脳障害の経時的変化

つぎに、2001年からの5年間(前期)と、2006年からの5年間(後期)に分けて、それぞれ約5万分娩を対象に経時的変化に注目して検討した<sup>6)</sup>。

22週以降の死産数は、前期の176例から後期の136例に有意に減少した。新生児死亡数も79例から47例に有意に減少した。さらに脳性麻痺も有意な減少を示した。一般に、死産を予防し、さらに新生児死亡を予防すると、結果的に乳児死亡が増加したり、脳性麻痺が増加することが報告されている。われわれのデータから、脳性麻痺が減少したことに着目し、さらに検討を加えた。

在胎週数別に、37週以降の正期産児、26-36週の

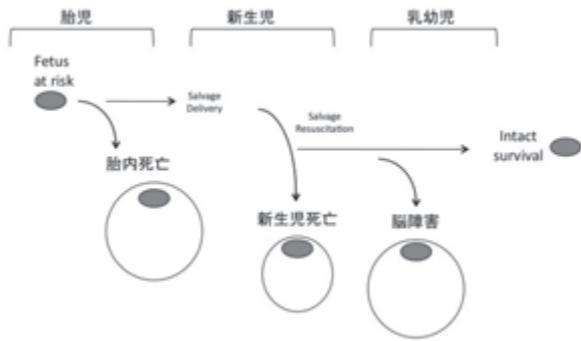


図4 リスク因子の平行移動 (説)

早産児、22-25週の超早産児（本研究で独自に用いた分類）の3群に分けて検討した。すると、正常産児では前期に比べ後期では死産は減少し、新生児死亡も減少し、脳障害も減少していた。しかし、早産児では、死産と新生児死亡は減少したが、一方、脳障害数は増加していた。22-25週の超早産児では検討症例数が少ないこともあり有意な変化を示さなかった。このように、正常産児と早産児とで異なるパターンを示した。

正常産児で脳障害が減少した内訳をみると、低酸素症によるものが前期の18例から1/2以下に激減し、脳性麻痺減少の最も大きな要因であった。一方、26-36週の早産児では、PVLの倍増が最も大きな因子であり、脳性麻痺の有意な増加につながっていた。早産のなかでも、脳性麻痺の増加は26-31週に限定されており、この週数でのPVLの増加が早産児の脳性麻痺増加の主要な原因であることが判明した。

## 考察

われわれの約17万症例を基にしたpopulation-based研究で、周産期死亡率が3～5/1,000分娩というレベルに維持された周産期医療体制のなか、脳障害発症に関するリスク因子を検討した。

その結果、脳障害発症率は2/1,000分娩であり、先進諸国と同様のレベルであった。脳障害のリスク因子は、先天異常が約1/3、28週以下の未熟性が1/4、低酸素が1/4であり、これまでの先進地域からの報告と同様の結果であった。

脳障害のリスク因子を周産期死亡のリスク因子と比較すると<sup>5)</sup>、先天異常、未熟性、低酸素症、発育遅延が共通して認められ、それぞれを補正しても独立した危険因子であることが判明した。すなわち、周産期死亡と脳性麻痺には連続した、関連したリスク因子が存在しており、脳性麻痺の原因を研究する際には周産期死亡の原因も一緒に検討することが重

要であろうと推測された。

さらに、過去10年間の変化を前半と後半とで比較すると<sup>6)</sup>、正常産児では周産期死亡も脳性麻痺も減少していた。一方、早産児（26-36週）では周産期死亡は減少するものの、逆に脳性麻痺は増加しており、その増加の要因としてPVLの関与が最も大きかった。

胎児は低酸素症、発育遅延、早産などの種々のリスク因子をもっており、その一部は胎内死亡に、一部は新生児死亡に、一部は脳性麻痺になり、残りの大部分はintact survivalになると考えられる（図4）。このように、リスク因子が周産期医療の発展とともに平行移動する、と考えると、Clarkらが示している世界各国の脳性麻痺の頻度が数値としては変化しないこと、経年的変化でもあまり改善していないこと、の説明が可能である<sup>1)</sup>。

われわれの検討でも、成熟児では、死亡や脳障害のリスク因子が胎内から新生児期に移り、さらに低体温療法などの脳障害対策も有効であれば、リスク因子はintact survivalにまで移動しているものが多いと推測される。一方、早産児では、周産期死亡は減少しているものの、脳障害は増加しており、いまだに脳障害予防と治療対策が十分ではない可能性を示唆している。脳性麻痺の割合が、早産児が増加し、成熟児が増加している世界的な現象と一致している<sup>7)</sup>。

## 結論

周産期脳障害を研究する際、新生児脳症との関連性に着目した方法を用いることが重要である。また、周産期脳障害のリスク因子を検討する場合には、リスク因子が平行移動している可能性を考慮し、周産期死亡との関連性、連続性の視点からリスク因子を評価することが重要である。われわれのpopulation-based研究の結果から、低酸素/仮死、未熟性、発育不全が周産期死亡と脳障害とに連続的に関与しており、これらの因子に焦点を当てた研究が必要である。

## 文献

- 1) Clark SL, Hankins GD: Temporal and demographic trends in cerebral palsy--fact and fiction. *Am J Obstet Gynecol* 188 (3) :628-633, 2003.
- 2) Neonatal encephalopathy and cerebral palsy. Defining the pathogenesis and pathophysiology.

- ACOG, AAP, 2002.
- 3) Sameshima H, Ikenoue T: Miyazaki Perinatal Data Group: Risk factors for perinatal deaths in Southern Japan: population-based analysis from 1998 to 2005. *Early Hum Dev* 84 (5) :319-323, 2008.
  - 4) Tokunaga S, Sameshima H, Ikenoue T: Applying the ecology model to perinatal medicine: from a regional population-based study. *J Pregnancy* 2011:587390, 2011. doi: 10.1155/2011/587390.
  - 5) Doi K, Sameshima H, Kodama Y, et al: Miyazaki Perinatal Data Groups: Perinatal death and neurological damage as a sequential chain of poor outcome. *J Matern Fetal Neonatal Med* 25 (6) :706-709, 2012.
  - 6) Kodama Y, Sameshima H, Doi K, et al: Ikenoue T. Trends in cerebral palsy: a regional population-based data in southern Japan. 59th. Society for Gynecologic Investigation, Miami, USA. 2011.
  - 7) Reid SM, Carlin JB, Reddihough DS: Rates of cerebral palsy in Victoria, Australia, 1970 to 2004: has there been a change? *Dev Med& Child Neurol* 53:907-912, 2011.

## Neonatal encephalopathy and perinatal medicine

Hiroshi Sameshima

In the last decades, perinatal deaths have decreased while infants with developmental brain damage have not changed in the developed countries. We focus on neonatal encephalopathy and its relationship to brain damage as a cause of birth asphyxiating insult, and have performed some regional population-based studies. As a result, major risk factors relating to increasing brain damage are hypoxia/ischemia (OR 10), prematurity < 34 weeks (OR 10), and growth restriction (OR 2) in non-anomalous infants. Intriguingly, the 3 major risk factors have as similar magnitude (OR) to cause perinatal deaths, suggesting the sequential impact on death and brain damage during the perinatal period. Besides, temporal changes over the last 10 years showed that perinatal mortality decreased and infants with brain damage also decreased significantly. In-depth study showed that term brain-damaged infants have decreased significantly probably due to a reduction in asphyxiated neonates, while preterm brain-damaged infants have increased due probably to increases in periventricular leukomalacia. More researches are required to investigate the 3 risk factors and their combination to cause severe damages in the developing brain.

**Key Words:** cerebral palsy, neonatal encephalopathy, population-based study, prematurity, hypoxia-ischemia

## 免疫性ニューロパチーと抗糖脂質抗体

楠 進

【要旨】 免疫性ニューロパチーでは、しばしば抗糖脂質抗体が血中に上昇する。IgMパラプロテイン血症を伴うニューロパチーでは、多くの例でIgM M蛋白がSGPGを認識する。Guillain-Barré症候群では約6割の症例で糖脂質に対する抗体上昇がみられる。抗体は標的抗原の局在部位に特異的に結合して臨床病型を決定すること、抗体産生には先行感染の病原体がもつ糖鎖とヒト神経組織の糖脂質の類似（分子相同性）が関与することが示されている。また近年2種類の糖脂質の糖鎖が形成する複合体を認識する抗体も報告された。CIDPでも一部で抗体陽性例が存在する。抗糖脂質抗体は有用な診断マーカーであるとともに病態解明の手がかりでもあり、今後のさらなる検討が必要である。

**Key Words:** Guillain-Barré症候群、CIDP、糖脂質、ガングリオシド、IgMパラプロテイン

自己免疫機序による末梢神経障害である免疫性ニューロパチーには、急性单相性の経過をとるGuillain-Barré症候群（Guillain-Barré syndrome, GBS）と、慢性の経過をとる慢性炎症性脱髄性多発根ニューロパチー（chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy, CIDP）、その亜型である多巣性運動性ニューロパチー（multifocal motor neuropathy, MMN）、およびIgMパラプロテイン血症を伴うニューロパチーなどがある。

IgMパラプロテイン血症を伴うニューロパチーで、IgM M蛋白が、ミエリンの糖蛋白であるmyelin-associated glycoprotein (MAG) とともに糖脂質の sulfated glucuronyl paragloboside (SGPG) の糖鎖を認識することが明らかになって以降、MMNやGBSで高頻度に糖脂質を認識する抗体がみられることがわかってきた。

本原稿では、IgMパラプロテイン血症を伴うニューロパチー、GBS、CIDPおよびMMNの順に、抗糖脂質抗体について概説することとする。

### 1) IgMパラプロテイン血症を伴うニューロパチー

IgMパラプロテイン血症は、しばしばニューロパチーを伴う。その多く（50-70%）がMAGに対する抗体活性をもつことが知られる<sup>1)</sup>。抗MAG活性をもつIgM M蛋白は、大部分がミエリンの糖脂質であ

るSGPGにも反応する<sup>2)</sup>。MAGとSGPGの両者がもつHNK-1エピトープとよばれる糖鎖をIgM M蛋白が認識するためである。このタイプのニューロパチーは脱髄性ニューロパチーであり、深部感覚障害が強く運動失調をきたすことが多い。抗MAG/SGPG IgM M蛋白は、末梢神経のミエリンを免疫染色する。また患者の末梢神経ミエリンにはIgMの沈着がみられる。これらの所見から、IgM M蛋白がミエリンの抗原に結合して脱髄性ニューロパチーをきたすと考えられる。

IgMパラプロテイン血症を伴うニューロパチーでは、GD1bなどのジシアロシル基をもつガングリオシドに結合するタイプのIgM M蛋白がみられる場合もあり、やはり感覚障害性運動失調性ニューロパチーをきたすことが知られる<sup>3)</sup>。後根神経節の大径ニューロンに局在するGD1bが主たる標的抗原と考えられる。

### 2) GBS

GBSでは約6割の症例で、急性期血中に糖脂質に対する抗体がみられる<sup>4)</sup>。急性期血中における抗糖脂質抗体の上昇はGBSの特徴であり、抗糖脂質抗体の測定はGBSの診断に有用である。ただし、陰性であるからといってGBSが否定はできないことに注意が必要である。GBSにおける抗糖脂質抗体の産生は、

表 1 GBSにみられる代表的抗糖脂質抗体と関連する臨床病型および抗原の局在

標的抗原	臨床病型	抗原の局在
GM1	軸索障害型 純粹運動型	ランビエ絞輪部軸索膜 (推定)
GD1a	軸索障害型	不明
GalNAc-GD1a	軸索障害型 純粹運動型	軸索周囲膜
GD1b	感覚障害性運動失調 脱髄型	後根神経節大径ニューロン 傍絞輪部ミエリン
ガラクトセレブロシド	脱髄型	ミエリン
GQ1b	Fisher症候群 運動失調	脳神経 III IV VI の傍絞輪部ミエリン 一部の後根神経節ニューロン

先行感染の病原体のもつ「神経系の糖脂質に類似した糖鎖」に対する免疫反応によることが、*Campylobacter jejuni* や *Mycoplasma pneumoniae* 感染後の GBS における抗 GM1 抗体<sup>5)</sup> や抗ガラクトセレブロシド抗体<sup>6)</sup> について示されている。この分子相同性機序が、ひとつの重要なメカニズムと考えられる。ガングリオシドなどの糖脂質は、ヒト神経組織において分子種ごとに特有の局在を示すことがわかっており、各抗体陽性症例の症状の分布は、標的抗原の局在部位によって説明できることが多い (表 1)。

さらに、近年の研究により、抗糖脂質抗体による神経障害には、補体の関与が重要であることが明らかとなってきた<sup>7)</sup>。抗 GQ1b 抗体は、眼球運動麻痺と運動失調を呈する Fisher 症候群にみられるが、眼球運動麻痺や運動失調に加えて四肢麻痺も呈する GBS でもみられることがあり、その場合は有意に人工呼吸器を要する例が多いことが報告されている<sup>8)</sup>。マウスの腹腔に抗 GQ1b 抗体を投与して、その後補体を加えることにより、呼吸筋麻痺を呈すること、さらに補体をブロックする eculizumab を投与すると症状が改善することが示された<sup>7)</sup>。こうしたことから、抗糖脂質抗体の作用には補体が重要な役割を果たしており、補体をブロックすることは GBS の新規治療となる可能性があると考えられる。

さらに解析を進めていくなかで、複数のガングリオシドの糖鎖により形成される新しいエピトープを認識する抗体の存在が明らかとなった。最初に見つかったのは、重症の GBS にみられた GD1a と GD1b の複合体に対する抗体である<sup>9)</sup>。抗 GD1a/GD1b 複合体抗体は、それぞれのガングリオシド単独に対しては、反応しないかきわめて弱い反応しか示さないが、両者が共存すると非常に強い反応を示した。そののちの検討により、そのほかにも抗 GM1/GalNAc-GD1a

抗体<sup>10)</sup>、GQ1b と GM1、GD1a などとの複合体に対する抗体<sup>11)</sup> など、多種類の複合体に対する抗体が見い出されている。

一方、抗糖脂質抗体の神経系細胞への結合が、細胞内シグナル伝達系に作用することが報告されている<sup>12)</sup>。深部感覚を伝える後根神経節の大型神経細胞には GD1b が豊富に存在し、GD1b を特異的に認識する抗体は、感覚障害性運動失調に関連するが、GD1b の感作によるウサギの運動失調性ニューロパチーの動物モデルでは後根神経節の大型神経細胞のアポトーシスがみられることも示されている<sup>13)</sup>。したがって、抗糖脂質抗体による神経障害のメカニズムについては、さらに詳細な検討が必要と考えられる。

### 3) 慢性炎症性脱髄性多発根ニューロパチーおよびその亜型

慢性炎症性脱髄性多発根ニューロパチー (CIDP) では、GBS と異なり抗糖脂質抗体の陽性頻度は低く、標的抗原は明らかではない。われわれは、末梢神経ミエリンに局在する LM1 に対する抗体を検討した。その結果 CIDP の 10 ~ 25% に LM1 および LM1 関連複合体 (LM1/GM1 や LM1/GD1b) に対する抗体がみられた<sup>14,15)</sup>。またそれらの抗体陽性の症例は、脳神経麻痺の合併が少なく、運動失調が多いことがわかった<sup>15)</sup>。LM1 は脳神経に少なく、後根に多く含まれることが、そうした臨床特徴に関連する可能性が考えられる。

CIDP の亜型である多巣性運動性ニューロパチー (MMN) では、抗 GM1 抗体陽性がひとつの特徴であるが、近年イギリスおよびイタリアのグループから、GM1 とガラクトセレブロシドの複合体に対する抗体の重要性が報告されており<sup>16,17)</sup>、今後さらに症例を増やして検討することが必要と考えられる。

以上、免疫性ニューロパチーにみられる抗糖脂質抗体について概説した。診断マーカーとしての意義、および病態形成における役割などについては、さらに検討が進められているところであり、今後の発展が期待されるところである。

## 文献

- 1) 飯島正博、小池春樹、祖父江元：慢性炎症性脱髄性多発根ニューロパチー（CIDP）、多巣性運動ニューロパチー（MMN）とパラプロテイン血症を伴うニューロパチー、免疫性神経疾患ハンドブック（楠 進、編）南江堂、東京、2013、pp146-167.
- 2) Shiina M, Kusunoki S, Miyazaki T, et al.: Variability in immunohistochemistries of IgM M-proteins binding to sulfated glucuronyl paragloboside. *J Neuroimmunol* 116: 206-212, 2001.
- 3) Willison HJ, O'Leary CP, Veitch J, et al.: The clinical and laboratory features of chronic sensory ataxic neuropathy with anti-disialosyl IgM antibodies. *Brain* 124: 1968-1977, 2001
- 4) Kusunoki S, Kaida K, Ueda M: Antibodies against gangliosides and ganglioside complexes in Guillain-Barré syndrome: New aspects of research. *Biochim Biophys Acta* 1780: 441-444, 2008.
- 5) Yuki N, Yamada M, Koga M, et al.: Animal model of axonal Guillain-Barré syndrome induced by sensitization with GM1 ganglioside. *Ann Neurol* 49: 712-720, 2001.
- 6) Kusunoki S, Shiina M, Kanazawa I: Anti-Gal-C antibodies in GBS subsequent to mycoplasma infection: Evidence of molecular mimicry. *Neurology* 57: 736-738, 2001.
- 7) Halstead SK, Zitman FM, Humphreys PD, et al.: Eculizumab prevents anti-ganglioside antibody-mediated neuropathy in a murine model. *Brain* 131: 1197-1208, 2008.
- 8) Kaida K, Kusunoki S, Kanzaki M, et al.: Anti-GQ1b antibody as a factor predictive of mechanical ventilation in Guillain-Barré syndrome. *Neurology* 62: 821-824, 2004.
- 9) Kaida K, Morita D, Kanzaki M, et al.: Ganglioside complexes as new target antigens in Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurol* 56: 567-571, 2004.
- 10) Kaida K, Sonoo M, Ogawa G, et al.: GM1/GalNAc-GD1a complex: a target for pure motor Guillain-Barré syndrome. *Neurology* 71: 1683-1690, 2008.
- 11) Kanzaki M, Kaida K, Ueda M, et al.: Ganglioside complexes containing GQ1b as targets in Miller Fisher and Guillain-Barré syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79: 1148-1152, 2008.
- 12) Ueda A, Shima S, Miyashita T, et al.: Anti-GM1 antibodies affect the integrity of lipid rafts. *Mol Cell Neurosci* 45: 355-362, 2010.
- 13) Takada K, Shimizu J, Kusunoki S: Apoptosis of primary sensory neurons in GD1b-induced sensory ataxic neuropathy. *Exp Neurol* 209: 279-283, 2008.
- 14) Kuwahara M, Suzuki S, Takada K, et al.: Antibodies to LM1 and LM1-containing ganglioside complexes in Guillain-Barré syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Neuroimmunol* 239: 87-90, 2011.
- 15) Kuwahara M, Suzuki H, Samukawa M, et al.: Clinical features of CIDP with LM1-associated antibodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 84: 573-575, 2013.
- 16) Galban-Horcajo F, Fitzpatrick AM, Hutton AJ, et al.: Antibodies to heteromeric glycolipid complexes in multifocal motor neuropathy. *Eur J Neurol* 20: 62-70, 2013.
- 17) Nobile-Orazio E, Giannotta C, Musset L, et al.: Sensitivity and predictive value of anti-GM1/galactocerebroside IgM antibodies in multifocal motor neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, in press, doi: 10.1136/jnnp-2013-305755.

## 急性自律性感覚性ニューロパチー

小池春樹、祖父江元

【要旨】急性自律性感覚性ニューロパチーは、ギランバレー症候群に類似した急性の経過で自律神経障害と感覚障害が出現し、症状が完成するが、筋力は保たれていることを特徴とするニューロパチーである。自律神経障害は発症初期から広汎で重篤であるのに対し、感覚障害は初期には表在感覚障害が目立ち、時間が経過するとともに深部感覚障害が高度になる傾向がある。感覚障害の分布は左右非対称で四肢近位部や顔面や頭部や体幹を含む傾向がある。約2/3の例で発症前に先行感染を示唆する症状を認める。末梢神経伝導検査所見は感覚神経に局限した軸索障害型ニューロパチーの所見を呈する。生検腓腹神経では小径線維優位の神経線維の脱落を呈し、剖検例では後根神経節と交感神経節の神経細胞の脱落を認める。以上の所見から、急性自律性感覚性ニューロパチーは、小型の神経節細胞から障害され、重症例では大型の神経節細胞の障害にいたる、免疫性の機序が関与した神経節障害であると推測される。

**Key Words:** 急性自律性感覚性ニューロパチー、自律神経ニューロパチー、ギランバレー症候群、自己免疫性自律神経節障害

## 疾患概念

1980年にColanらが急性発症で重度な自律神経障害と感覚障害を呈したが運動障害を認めなかったニューロパチーを報告して以来<sup>1)</sup>、類似の症例は急性自律性感覚性ニューロパチー (acute autonomic and sensory neuropathy; AASN) として報告されるようになった<sup>2~10)</sup>。Colanらの症例は、広汎で重度な自律神経障害に加え、表在感覚と深部感覚も高度に障害され、感覚性運動失調を伴っていたが、その後、表在感覚障害が目立ち、感覚性運動失調を認めない例もAASNとして報告されている<sup>2)</sup>。上気道炎などの先行感染を契機に発症する例が多いことから、AASNの発症にはギランバレー症候群類似の何らかの自己免疫性の機序の関与が推測される<sup>11,12)</sup>。ギランバレー症候群との関連では抗GD1b抗体が失調をきたすことが知られているが<sup>13,14)</sup>、AASNでは著明な自律神経障害を病初期から認める点が既報告の抗GD1b抗体陽性例とは異なる。

発症年齢は幼児から高齢者まで幅広いものの、平均すると20歳台後半であり、男女比は1:2程度で女性に多い<sup>2)</sup>。約2/3の例で発症前に先行感染を示唆

する症状を認める<sup>2)</sup>。上気道炎の頻度が最も高いが、消化器系の感染症状を認める場合もある<sup>2)</sup>。Coxsackie B群ウイルスの先駆感染が報告されているほかに<sup>6)</sup>、先行感染症状は認めなかったがEpstein-Barrウイルスを髄液中に認めた例が報告されている<sup>7)</sup>。上気道感染症状を認めた例のうち、1例は精巣腫瘍を合併していた<sup>3)</sup>。また、ニューロパチー発症に先立って皮疹を認めた例も報告されている<sup>2,6,9)</sup>。さらに、妊娠中絶やインターフェロン療法を契機に発症した例の報告もある<sup>2,9)</sup>。妊娠第3期に発症した例も報告されている<sup>2)</sup>。ギランバレー症候群では先行感染症状の出現から発症までの期間は1-2週間であるのに対し、AASNでは先行感染症状の出現から1、2日でニューロパチーを発症する例があり、潜伏期間は通常のギランバレー症候群とくらべて短い傾向がある<sup>2,11)</sup>。

## 臨床症候

自律神経系は典型例では交感神経系および副交感神経系ともに障害され、病初期から重篤な場合が多い。特に、下痢や嘔吐や便秘/腹部膨満などの腹部

症状を初期に強く訴える例が多い。このため、発症初期に消化器科等を受診するため診断が遅れる場合もある<sup>12)</sup>。麻痺性イレウスをきたす場合も多く、経腸での栄養摂取が長期にわたり困難な例もある<sup>2)</sup>。そのほかの自律神経障害としては、起立性低血圧、尿閉、散瞳、発汗障害、性機能障害などがある<sup>2,3)</sup>。起立性低血圧はADL低下のおもな要因となり、座位保持も困難な例や、体向により血圧が大きく低下する例も多い<sup>2,11)</sup>。

感覚障害の分布は四肢遠位に限局している例から全身に広がった例までさまざまであり、遠位優位の多発神経炎型というより、左右非対称で四肢近位部や顔面や頭部や体幹を含む傾向がある<sup>2,6,8)</sup>。病初期には、しびれや痛みのような表在感覚障害とそれに関連した症状が目立ち、時間が経過するとともに深部感覚障害が高度になっていく傾向がある<sup>2)</sup>。このため、症状がピークに達するまでの期間が短い例では感覚障害は表在感覚のみに限局しており、比較的軽症であることが多い。これに対して、症状がピークに達するまでの期間が長い例ほど深部感覚障害が高度になり、それに伴った感覚性運動失調のために重症になる場合が多い。また、感覚障害は、咽頭部を含めた気道全般に及ぶことも多く、重症例では気管支鏡を施行しても咳反射がまったく誘発されない場合もあり、誤嚥性肺炎をきたす例も多い<sup>11)</sup>。

自律神経と感覚障害以外の症候として、筋痛、発作性咳嗽、抑うつ症状や幼稚化などの精神症状/性格変化、睡眠時無呼吸、乳汁漏出/無月経、抗利尿ホルモン不適合分泌症候群 (syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone ; SIADH) なども報告されている<sup>2,11)</sup>。

## 検査所見

AASNは先行感染に続いて急性に発症する例が多いことから、ギランバレー症候群に類似した自己免疫性の機序の関与が推測できるが、現在までに抗ガングリオシド抗体などの病態に関連した自己抗体は明らかになっていない<sup>12)</sup>。また、自律神経ニューロパチーと関連して近年報告されている、抗ganglionic acetylcholine receptor (AChR) 抗体も測定された例では陰性と報告されている<sup>2)</sup>。髄液検査ではギランバレー症候群と同様、蛋白細胞解離の所見を認める<sup>2)</sup>。

末梢神経伝導検査所見は感覚神経に限局した軸索障害型ニューロパチーの所見を呈する<sup>1,2,9)</sup>。感覚神経活動電位は、感覚性運動失調を呈する例では高度

低下ないしは誘発不能である場合が多いのに対し<sup>12)</sup>、深部感覚は保たれて表在感覚障害のみが目立つ例では保たれる傾向がある<sup>7,8)</sup>。

MRIでは、深部感覚障害に伴う感覚性運動失調をきたした症例で脊髄後索のT2\*高信号を認める<sup>2,15,16)</sup>。この所見は感覚神経節からの求心線維の障害を反映していると推測され、同様の所見がシェーグレン症候群に伴う感覚性運動失調型ニューロパチーにおいても報告されており、感覚性運動失調の程度が重度になるにつれてT2\*高信号の範囲も広くなる<sup>2)</sup>ことが知られている<sup>17,18)</sup>。

## 病理所見

生検腓腹神経では無髄線維も含めた小径線維優位の軸索障害型ニューロパチーの所見を呈する(図1)<sup>2)</sup>。臨床症候を反映して、感覚障害が表在感覚のみに限局した例では比較的大径有髄線維が残存しているのに対し<sup>2,6,8)</sup>、表在感覚と深部感覚がともに障害された例では大径有髄線維も含めたすべての神経線維の高度な脱落を認める<sup>2,4)</sup>。神経ときほぐしの所見は軸索障害が主体であり、脱髄を示唆する所見はみられない<sup>2)</sup>。また、長期間経過した例でも軸索再生像はみられない<sup>2)</sup>。

剖検例では後根神経節と交感神経節の神経細胞の高度な脱落を認める<sup>2~4)</sup>。以上の所見から、AASNにおいては感覚神経および自律神経の神経節障害 (ganglionopathy) が病変の主体であり、小型の神経節細胞から障害され、重症例では大型の神経節細胞の障害にいたると推測される<sup>2)</sup>。

## 治療・予後

AASNの病態にはギランバレー症候群類似の自己免疫性の機序の関与が示唆されるが、通常のギランバレー症候群にくらべて先行感染症状の出現からニューロパチー発症までの期間が短い症例が存在することなども含めて不明な点も多い。経過はギランバレー症候群と同様、通常は1ヵ月以内に症状のピークに達するものの、長期間経過しても症状が残存している例が多く<sup>2,11)</sup>、ある程度の回復が自律神経障害に関しては見込めるものの、感覚障害、特に感覚性運動失調に関しては残存する傾向がある<sup>11)</sup>。治療に関しては、経静脈的免疫グロブリン療法、血液浄化療法、副腎皮質ステロイド療法などが施行されているが、ギランバレー症候群と同様の单相性の経過を呈するため、効果の判定は困難な場合もあり、有

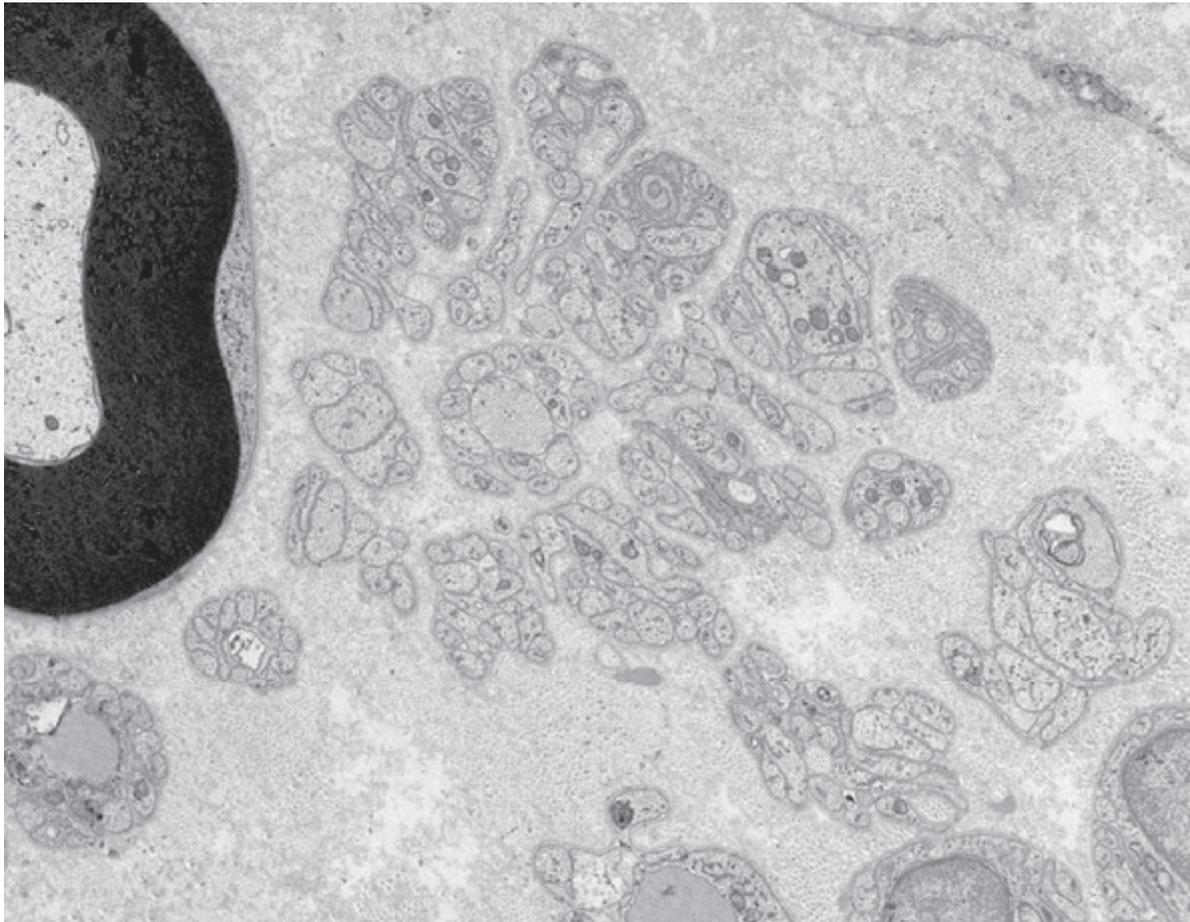


図1 急性自律性感覚性ニューロパチーの腓腹神経病理所見  
無髄線維の脱落に伴って生じたempty Schwann cell subunitの集簇を認める。

効性に関しての定まった知見はない<sup>2,11)</sup>。

種々の自律神経障害や痛みなどに対する対症療法も含めた濃密な全身管理が必要となる例が多い<sup>2)</sup>。麻痺性イレウスのために長期間の中心静脈栄養が必要になる例や、気道の感覚脱失による咳反射消失のために誤嚥性肺炎をきたす例も多い<sup>2,11)</sup>。さらに、自律神経障害と感覚神経障害に関連した諸症状以外にも、重篤な発作性咳嗽、精神症状/性格変化、睡眠時無呼吸などに対する対処も必要である場合も多い<sup>2,11,12)</sup>。

### 鑑別診断

AASN以外の自律神経ニューロパチーのスペクトラムに属する疾患としては、感覚障害を合併するAASN以外にも、自律神経障害のみを呈する自己免疫性自律神経節障害 (autoimmune autonomic ganglionopathy; AAG) や<sup>19,21)</sup>、感覚障害と運動障害を合併する急性自律性感覚性運動性ニューロパチー (acute autonomic sensory and motor

neuropathy; AASMN) などがある<sup>22)</sup>。また、AAG、AASN、AASMNの典型例は広汎な自律神経障害を呈するが、障害が限局したタイプである、コリン作動性自律神経異常症 (cholinergic dysautonomia)、体位性起立性頻拍症候群 (postural tachycardia syndrome; POTS)、慢性偽性腸閉塞症 (chronic intestinal pseudo-obstruction; CIP) なども報告されている<sup>11,12)</sup>。

以下にAASNとの鑑別を要するおもな類縁疾患について述べる。

#### 1. AAG

感覚障害と運動障害を有さず、自律神経障害のみを呈する、いわゆる特発性の自律神経ニューロパチーは、pure pandysautonomia、acute pandysautonomia、acute panautonomic neuropathy、autoimmune autonomic neuropathy、またはidiopathic autonomic neuropathyなどとして報告されてきた<sup>11)</sup>。近年、このような症例で抗ganglionic AChR抗体が陽性となる場合があることが明らかになり<sup>11,12,21)</sup>、自己免疫性

の機序が関与し、病変の主座が自律神経節にあると推測されることから、自己免疫性自律神経節障害 (autoimmune autonomic ganglionopathy ; AAG) という名称が用いられるようになってきている<sup>21)</sup>。

典型例では自律神経症状は数日から数週間のうちにピークに達し、单相性の経過をとるが、症例によっては年単位の慢性の経過をとる場合があり、純粹自律神経失調症 (pure autonomic failure; PAF) のような変性疾患との鑑別が問題になる場合がある<sup>19,20)</sup>。AASNと同様、咳嗽発作、精神症状、SIADHの合併も報告されている<sup>11)</sup>。また、AAGでは感覚は他覚的には正常とされているが、約25%の例ではチクチクした感じなどの自覚症状を訴えるといわれており<sup>21)</sup>、AASNとの連続性に関しては今後の研究課題である。

## 2. AASMN

急性の経過で、重度の自律神経障害に加え、感覚障害と運動障害も出現し、完成するニューロパチーは急性自律性感覚性運動性ニューロパチー (acute autonomic, sensory and motor neuropathy; AASMN) として報告されている<sup>11,22)</sup>。定義上、運動障害を有するためにギランバレー症候群との異同が問題になるが、病初期から重度で広範な自律神経機能不全をきたす例のなかで、AAGやAASNと同様の神経節障害が示唆される例が報告されている<sup>23)</sup>。また、中枢神経障害やSIADHの合併が報告されている点もAAGやAASNと類似している<sup>11)</sup>。過去のAASNの症例報告では、軽度の筋力低下が記載されていることもあり<sup>46)</sup>、免疫性の障害が自律神経と感覚神経に局限している場合でも、末梢神経系の軸索変性を起こした際に近傍の運動神経の線維に二次性の障害をきたすことも考えられる。以上のことから、AASNとAASMNの関係に関しても今後の研究課題である。

## 3. Cholinergic dysautonomia

副交感神経系の障害は著明であるのに対し、交感神経系の障害は発汗障害のみに局限しており、起立性低血圧を認めない、選択的なコリン作動性の末梢性自律神経障害を呈する例が報告されている<sup>11,20)</sup>。障害は自律神経系に局限した例が多いが、感覚障害を合併した例も報告されている<sup>11,24)</sup>。発症様式は急性から亜急性であり、先行感染を認める場合もある<sup>11)</sup>。経過は单相性であるが、回復は不完全な場合が多い<sup>11)</sup>。AAGやAASNやAASMNと同様、SIADHの合併が報告されている<sup>25)</sup>。

## 文献

- 1) Colan RV, Snead OC 3rd, Oh SJ, et al.: Acute autonomic and sensory neuropathy. *Ann Neurol* 8: 441-444, 1980.
- 2) Koike H, Atsuta N, Adachi H, et al.: Clinicopathological features of acute autonomic and sensory neuropathy. *Brain* 133: 2881-2896, 2010.
- 3) Fagius J, Westerberg CE, Oosson Y: Acute pandysautonomia and severe sensory deficit with poor recovery. A clinical, neurophysiological and pathological case study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 46: 725-733, 1983.
- 4) Tohgi H, Sano M, Sasaki K, et al.: Acute autonomic and sensory neuropathy: report of an autopsy case. *Acta Neuropathol* 77: 659-663, 1989.
- 5) Kanda F, Uchida T, Jinnai K, et al.: Acute autonomic and sensory neuropathy: a case report. *J Neurol* 237: 42-44, 1990.
- 6) Pavesi G, Gemignani F, Macaluso GM, et al.: Acute sensory and autonomic neuropathy: possible association with coxsackie B virus infection. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 55: 613-615, 1992.
- 7) Bennett JL, Mahalingam R, Wellish MC, et al.: Epstein-Barr virus-associated acute autonomic neuropathy. *Ann Neurol* 40: 453-455, 1996.
- 8) Kurokawa K, Noda K, Mimori Y, et al.: A case of pandysautonomia with associated sensory ganglionopathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 65: 278-279, 1998.
- 9) Irioka T, Yamada M, Yamawaki M, et al.: Acute autonomic and sensory neuropathy after interferon alpha-2b therapy for chronic hepatitis C. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 70: 408-410, 2001.
- 10) Sakakibara R, Uchiyama T, Asahina M, et al.: Micturition disturbance in acute idiopathic autonomic neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75: 287-291, 2004.
- 11) Koike H, Watanabe H, Sobue G: The spectrum of immune-mediated autonomic neuropathies: insights from the clinicopathological features. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 84: 98-106, 2013.
- 12) Koike H, Sobue G: The wide range of clinicopathological features in immune-mediated autonomic neuropathies. *Clin Exp*

- Neuroimmunol 4: 46-59, 2013.
- 13) Kusunoki S, Hitoshi S, Kaida K, et al.: Monospecific anti-GD1b IgG is required to induce rabbit ataxic neuropathy. *Ann Neurol* 45: 400-403, 1999.
  - 14) Kaida K, Kamakura K, Ogawa G, et al.: GD1b-specific antibody induces ataxia in Guillain-Barre syndrome. *Neurology* 71: 196-201, 2008.
  - 15) Yasuda T, Sobue G, Hirose Y, et al.: MR of acute autonomic and sensory neuropathy. *AJNR Am J Neuroradiol* 15: 114-115, 1994.
  - 16) Yasuda T, Sobue G, Mokuno K, et al.: Clinicopathophysiological features of acute autonomic and sensory neuropathy: a long-term follow-up study. *J Neurol* 242: 623-628, 1995.
  - 17) Mori K, Koike H, Misu K, et al.: Spinal cord magnetic resonance imaging demonstrates sensory neuronal involvement and clinical severity in neuropathy associated with Sjögren's syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 71: 488-492, 2001.
  - 18) Mori K, Iijima M, Koike H, et al.: The wide spectrum of clinical manifestations in Sjogren's syndrome-associated neuropathy. *Brain* 128: 2518-2534, 2005.
  - 19) Koike H, Koyano S, Morozumi S, et al.: Slowly progressive autonomic neuropathy with antiganglionic acetylcholine receptor antibody. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 81: 586-587, 2010.
  - 20) Koike H, Hashimoto R, Tomita M, et al.: The spectrum of clinicopathological features in pure autonomic neuropathy. *J Neurol* 259: 2067-2075, 2012.
  - 21) Vernino S, Sandroni P, Singer W, et al.: Invited Article: Autonomic ganglia: target and novel therapeutic tool. *Neurology* 70: 1926-1932, 2008.
  - 22) Ohyama K, Yasui K, Hasegawa Y, et al.: Differential recovery in cardiac and vasomotor sympathetic functional markers in acute autonomic sensory and motor neuropathy: a case report. *Intern Med* 52: 497-502, 2013.
  - 23) Hodson AK, Hurwitz BJ, Albrecht R: Dysautonomia in Guillain-Barré syndrome with dorsal root ganglioneuropathy, wallerian degeneration, and fatal myocarditis. *Ann Neurol* 15: 88-95, 1984.
  - 24) Warner G, Sharief MK, Anand P: Small sensory fibre dysfunction in selective cholinergic dysautonomia. *Eur J Neurol* 9: 109, 2002.
  - 25) Hart RG, Kanter MC: Acute autonomic neuropathy. Two cases and a clinical review. *Arch Intern Med* 150: 2373-2376, 1990.

## Acute autonomic and sensory neuropathy

Haruki Koike, Gen Sobue

Acute autonomic and sensory neuropathy is characterized by autonomic and sensory impairment without motor dysfunction that reaches its nadir within a short period of time. The character of its progression is similar to that of Guillain-Barré syndrome. Antecedent events, mostly an upper respiratory tract or gastrointestinal tract infection, are reported in two-thirds of patients. The initial symptoms are those related to autonomic disturbance or superficial sensory impairment, while deep sensory impairment accompanied by sensory ataxia subsequently appears in some patients. The distribution of sensory deficits tends to be asymmetrical and segmental, rather than presenting as a symmetric polyneuropathy. Pain of the involved region is a common and serious symptom. Nerve conduction studies reveal the reduction of sensory nerve action potentials in patients with sensory ataxia, while they are relatively preserved in patients without sensory ataxia. Sural nerve biopsy reveals small-fiber predominant axonal loss without evidence of nerve regeneration. In autopsy cases, neuronal cell loss in the thoracic sympathetic and dorsal root ganglia with well preserved anterior horn cells are observed. Although recovery of sensory impairment is poor, autonomic dysfunction is ameliorated to some degree within several months in most patients. In conclusion, an immune-mediated mechanism may be associated with acute autonomic and sensory neuropathy. Small neuronal cells in the autonomic and sensory ganglia may be affected in the initial phase and, subsequently, large neuronal cells in the sensory ganglia are damaged.

**Key Words:** acute autonomic and sensory neuropathy, autonomic neuropathies, Guillain-Barré syndrome, autoimmune autonomic ganglionopathy

## Crow-Fukase (POEMS) 症候群の治療：過去・現在・未来

三澤園子

【要旨】 Crow-Fukase症候群は形質細胞異常を基盤とし、末梢神経障害を中心とする多彩な症状をきたす予後不良の稀少疾患である。骨髄腫治療の応用により、本症候群の治療は進歩し、予後は改善されつつある。一方で、今後解決すべき多くの課題もいまだ残され、さらに新規治療の成績が明らかになるにつれ新しい課題も生まれている。診断基準の改良、自然歴の解明、新規治療の継続的な開発と標準化等であり、さらなる予後の向上のためにこえるべきハードルは多い。しかし、稀少疾患の新規治療開発において、医師・アカデミアが果たす役割は大きく、今後も当施設は本症候群の新規治療の臨床試験等を始めとする試みを継続して行きたいと考えている。

**Key Words:** Crow-Fukase (POEMS) 症候群、自己末梢血幹細胞移植、サリドマイド、医師主導治験

## はじめに

Crow-Fukase症候群は形質細胞異常を基盤として、末梢神経障害・浮腫・肝脾腫・内分泌障害などの多彩な症状を呈する稀少疾患である。本疾患の生命予後は不良であると考えられており、1980年代に行われていたステロイド単独の治療では平均的な生存期間は2-3年とされる<sup>1,2)</sup>。また、進行性の末梢神経障害に四肢麻痺にいたることも少なくなく、機能予後も不良である。Crow-Fukase症候群の新規治療の開発は、同様の形質細胞の腫瘍性疾患である骨髄腫の治療を応用することにより進んできた。骨髄腫治療の進歩は目覚ましく、それとともに本症候群の予後も改善しつつある。しかし、本症候群はわが国における推定患者数が300-400名とされる超稀少疾患であり、臨床像・自然歴については不明の点が多い。また、保険適応を有する治療もなく、診断・治療の標準化に向けて解決すべき課題はいまだ山積されている。本稿では、Crow-Fukase症候群の治療の現状を解説したあとに、さらなる治療成績の向上に向けて今後取り組むべき課題について、当施設の試みを紹介しながら考察する。

## Crow-Fukase症候群の治療の現状

Crow-Fukase症候群の治療ターゲットは、病態の基盤と推測される形質細胞の異常である。そのため、最も広く使用されていると思われるステロイドの効果は限定的で、単独での長期間の疾患コントロールは困難であると予想される。同様の形質細胞の腫瘍性疾患である骨髄腫の治療が、新規治療として本症候群に応用され、機能・生命予後が向上しつつある。

1990年代に多く選択された治療はメルファラン・プレドニン療法である。一定の効果が期待できるが<sup>2)</sup>、骨髄腫治療の変遷とともに選択される機会は減りつつある。現時点で第一選択と考えられている治療は、自己末梢血幹細胞移植を伴う高用量化学療法である<sup>3,4)</sup>。移植療法による神経障害の回復は劇的である。また、大半の症例では数年にわたる寛解を得ることができる。しかし、66歳以上の高齢者や進行例ではリスクが高いため適応にならない。また、移植5年時点での無増悪生存率は75%と報告されている<sup>5)</sup>。移植関連死の可能性も考慮すると、免疫調整薬による治療の進歩とともに、軽症例への移植適応の判断がむずかしくなりつつある。免疫調整薬であるサリドマイド<sup>6)</sup>・レナリドミド<sup>7)</sup>の本症候群に対する有効性も少しずつ蓄積されつつある。サリドマイドの本症候群における効果は全身状態不良例を



図1 Crow-Fukase症候群の治療戦略(文献<sup>9)</sup>より改変引用)

†骨病変が3個以下では放射線治療単独も考慮される。  
\*大量胸腹水、活動性のある感染症、腎不全を有する例では移植の適応とならない。 \*\*免疫調整薬もしくはプロテアソーム阻害薬による移植前治療は考慮の範囲内である。 \*\*\*サリドマイドまたはレナリドミドの選択は患者の年齢・全身状態・合併症・重症度・将来的な治療計画に基づいて行う。

含む9例における治療成績が報告されている<sup>6)</sup>。投与開始1年後の寛解率56%・2年後の生存率100%と良好である<sup>6)</sup>。

以上より、現時点でのCrow-Fukase症候群の治療方針をまとめる(図1)。治療開始時の年齢が66歳以上の場合は免疫調整薬を中心とした治療を考慮する。65歳以下の場合は、移植適応があれば移植を、なければ免疫調整薬を考慮する。移植適応の明確な判断基準は定まっていない。大量胸腹水・活動性感染症・高度腎機能障害は高リスクで、一般的に適応とならない。一方、上述した軽症例への適応に関するコンセンサスはない。当施設では、移植のリスクを考え軽症例への移植適応は慎重に判断するようにしており、現時点では適応を絞る方針である。また免疫調整薬であるサリドマイド・レナリドミドとも、本症候群への適応はないことに注意が必要である。サリドマイドについては、適応を骨髄腫から本症候群へ拡大するための医師主導治験を、当施設が調整事務局となって行っている。良好な結果が得られれば約2年後には適応拡大を達成できる見込みである。

## Crow-Fukase症候群の診療を取り巻く 今後の課題

Crow-Fukase症候群の新規治療が進むとともに、診断・治療にまつわる多くの新しい課題が生まれている。より適切な治療を患者さんに提供するにあたり、解決すべき診断と治療に関する課題についておもに考察する。

表1 Crow-Fukase症候群の診断基準(文献<sup>9)</sup>より引用)

大基準
末梢神経障害
モノクローナルな形質細胞増殖*
VEGF上昇
小基準
骨硬化性病変
キャスルマン病
臓器腫大(肝脾腫またはリンパ節腫脹)
浮腫(浮腫、胸水、腹水)
内分泌障害(副腎、甲状腺、下垂体、性腺、副甲状腺、膵臓)**
皮膚変化(色素沈着、剛毛、多血症、チアノーゼ、血管腫、白色爪)
乳頭浮腫
血小板増多・赤血球増多

(1)Definite: 大基準3項目とも満たしかつ小基準を1項目以上満たす。

(2)Probable: 大基準2項目かつ小基準を1項目以上満たす。

\*M蛋白または骨髄・骨硬化性病変・形質細胞腫の生検による。

\*\*糖尿病、甲状腺機能異常は有病率が高いため、単独では小基準単独の異常では小基準の1項目として採用しない。

## 1. 早期診断

Crow-Fukase症候群の予後は、新規治療の開発とともに向上しつつある。一方で、確定診断前に病状が進行してしまい、新規治療を試みても強い後遺症を残す例、救命できない例も少なからず存在する。つまり、さらなる治療成績の向上は、新規治療の開発のみでは当然ながら達成できず、早期診断が非常に重要な位置を占める。しかし、本症候群の初期は特に診断がつきにくいのも事実である。なぜなら、まず超稀少疾患であり、診療経験のある医師が少ない。さらに、初発症状は多岐にわたり、それぞれは腹水・浮腫・しびれなど非特異的であり、初診診療科も一定しない。症状の組み合わせも多彩で、典型的な症状がある程度そろうまで、鑑別疾患として候補にあがりにくい。神経内科領域では、Crow-Fukase症候群との鑑別がよく問題になるのは慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー(CIDP)である。神経症状で発症するCrow-Fukase症候群の6割は初期にCIDPと診断されていると報告されており<sup>8)</sup>、早期診断の困難さを示すデータである。

Crow-Fukase症候群の早期診断を促進するために考えられるアプローチは現時点では2つある。一つ

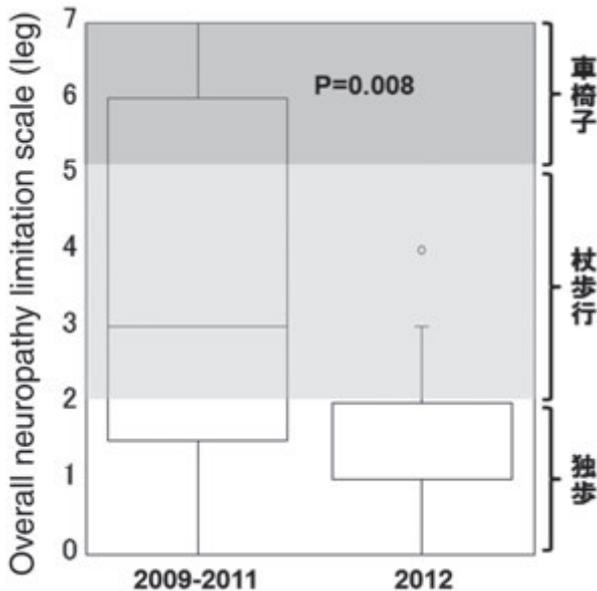


図2 Crow-Fukase症候群の当院初診時の神経学的重症度 (Overall neuropathy limitation scale [leg], n=32)

2009-2011年と比較し、2012年時は初診時の下肢の神経学的重症度が有意に低下している。早期診断の推進に基づく可能性がある。

は診断基準の改良、もう一つは疾患の認知度向上である。本症候群の診断に使用されている基準の一つを示す(表1)<sup>9)</sup>。本基準は本邦で行われている医師主導治験で採用されているものである。しかし、本基準を始め、国際的に用いられている診断基準は複数存在する<sup>10)</sup>。いずれも類似しているが、感度・特異度に関する前向きな検討はない。発症早期には、M蛋白や明確な末梢神経障害を欠く例も少なからず存在し、現行の基準では適切に診断できない可能性がある。また、診断基準の実践的な運用面でも不明確な点がいくつかある。一つは、VEGF値の測定方法である<sup>9)</sup>。VEGF値は血小板内に多く含まれるため、血清での測定値は血漿での測定値よりも大幅に高い。しかし、現時点では血漿または血清のいずれで測定すべきか、それぞれの基準値に関して明確でない。また、モノクローナルな形質細胞増殖の明確な定義についても、結論されていない。実際には、9割以上の症例で血清のM蛋白が免疫固定法まで行えば検出可能である。それ以上の検索をどこまで行うべきか、検査の侵襲性も考慮した指針が必要である。的確な診断を促進するためには、より精度が高く誤解の生じにくい、臨床医が使いやすいと感じる診断基準の作成が求められる。

Crow-Fukase症候群に関する論文出版数の増加、新規治療の開発という国際的な流れがあり、疾患の認知度は向上しつつある。当施設ではその動向とリ

ンクして、全国規模の啓発活動を2010年より継続的に行っている。おもな活動は、企業展をはじめとした学会での啓発活動、インターネットを通じた広報、ホームページを通じた問い合わせ窓口などである。これらの試みにより、以前と比較し最近では、早期診断例が確実に増加しつつある。図2に示すように、当院初診時の日常生活動作レベルは、以前は圧倒的に介助歩行の患者さんが多かったが、最近では独歩可能な患者さんが増加している。今後も継続的な啓発活動を行っていく予定である。

## 2. 自然歴の解明

稀少疾患の治療開発のうえで、「自然歴」の解明は一つのキーワードである。新規治療の有効性の判断には、自然歴が大きくかかわってくる。また、自家移植のようなリスクの高い治療の適応を判断するにあたっては、自然歴は非常に重要である。

2003年に当施設が新規治療を開始した際は、Crow-Fukase症候群のほとんどは数ヶ月で亜急性に近く進行し、症例によっては四肢麻痺・死亡にいたる疾患であるという認識であった<sup>11)</sup>。しかし、早期例の診断率向上に伴い、非常に緩徐な進行様式を呈し、軽症で長期間にわたり留まる症例を少なからず経験するようになった。つまり現状では、本症候群の自然歴にはどのようなバリエーションがあるかがいまだ不明確であり、亜急性進行のリスク因子が存在するかについても未解明である。これらの点をクリアすることが、適切な強度の治療を適切な時期に患者さんに提供すること、新規治療薬の有効性を効率よく検出できる臨床試験をデザインすることに直結する。今後の新規治療の開発、診療指針の作成を進めるうえで、自然歴の解明は解決すべき大きな課題である。

## 3. 新規治療開発の今後

Crow-Fukase症候群の今後の治療戦略を考えるうえで、念頭におくべきは、形質細胞の腫瘍性疾患という性格上、いかなる治療をもってしても、治癒が恐らく困難であることである。移植をはじめとする新規治療の登場により、本症候群の治療目標は、「救命」や「短期的改善」から、10年をこえる「安定維持」にシフトしつつある<sup>9)</sup>。より長期的な視点から、どのように治療計画を組み立てれば、治療の副作用を抑えつつ良好な状態が長期にわたり維持できるかが、特に30-40代発症の若年例においては重要な課

題である。

当施設で、本症候群における自家移植・サリドマイド療法等の新規治療の試みに積極的に取り組むようになり、約10年が経過した。新規治療の中長期的な成績が明らかになるにつれ、移植後再発、サリドマイド療法不応への対応などつぎの段階の課題がみえてきている。並行して、骨髄腫の新規治療薬の開発も目覚ましい。免疫調整薬は、第一世代であるサリドマイドに続いて、レナリドミドが市販され、第三世代のポマリドマイドは治験中である。レナリドミドはサリドマイドと比較し、末梢神経障害の副作用の発現が少ないが、抗がん剤としての性格が強まり骨髄抑制は強い可能性がある。また、別の作用機序の薬剤として、プロテアソーム阻害薬であるボルテゾミブが市販され、第二世代のカーフィルゾミブは治験中である。ボルテゾミブは末梢神経障害のリスクが非常に高い点が問題である。本症候群への使用にあたっては、神経毒性に配慮した投与方法の工夫(投与間隔・投与経路など)などの考慮が少なくとも必要である。プロテアソーム阻害薬の本格的な活用は、神経障害の副作用の少ないとされる第二世代以降になるかもしれない。

今後、当施設では、移植後再発を抑制するための治療戦略、若年輕症例の最適な移植時期、サリドマイド療法の次世代の治療開発等を新規課題として取り組みたいと考えている。また、並行して、続々と開発される骨髄腫の新規薬剤がCrow-Fukase症候群に安全かつ有効に使用できるかについての検討を進める予定である。

#### 4. 稀少疾患における治療の標準化

稀少疾患において新規治療を開発するには、さまざまな困難がある。病態の解明・治療薬の開発・臨床試験の実施と進み、エビデンスの蓄積を経て、治療は標準的となり、多くの患者さんの元へ届く。大部分の稀少疾患では、初期段階である病態解明と治療薬開発において、非常な労力と時間を要する。しかし、Crow-Fukase症候群の新規治療開発は、骨髄腫の治療を応用するという戦略が今までのところ幸い奏功し、新規治療の開発は比較的順調に進んでいる。しかし、臨床試験の実施、エビデンスの構築という面においては、まだ多くの課題がある。

わが国において、新規治療が標準的に行われるようになるには、治療の保険収載が必須条件であり、治療ガイドラインが作成されればさらに促進されると考えられる。しかし、保険収載のためには通常は

治験を実施しなければならず、超稀少疾患においては医師主導で行わざるをえないことが多い。医師主導治験の実施には、製薬企業の協力を得ることが必須であり、さらに大型の研究資金も必要であるなど、こえるべき高いハードルが複数ある。また、個々の医療機関での適応外使用は、エビデンス確立には結び付かない。超稀少疾患での治験成功とエビデンス構築には、多施設の協力が必要不可欠である。多くの施設が協力し合い、理論に基づきデザインされた臨床試験を積み重ねていくことが、一見遠回りにみえても、標準的治療の最も着実な確立の方法である。

#### おわりに

Crow-Fukase症候群の治療の現状と課題について概説した。当施設では、本症候群の新規治療開発に継続的に取り組んでいる。当施設の試みが、本症候群の予後改善につながるだけでなく、稀少疾患の新規治療開発の道筋の一つとなり、ほかの疾患の治療開発へも役立てるよう、今後も努力を続けていきたいと考えている。

#### 文献

- 1) Nakanishi T, Sobue I, Toyokura Y, et al.: The Crow-Fukase syndrome: a study of 102 cases in Japan. *Neurology* 34: 712-720, 1984.
- 2) Kuwabara S, Hattori T, Shimoe Y: Long term melphalan-prednisolone chemotherapy for POEMS syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 63 (3):385-387, 1997.
- 3) Kuwabara S, Misawa S, Kanai K, et al.: Autologous peripheral blood stem cell transplantation for POEMS syndrome. *Neurology* 66:105-107, 2006.
- 4) Kuwabara S, Misawa S, Kanai K, et al.: Neurologic improvement after peripheral blood stem cell transplantation in POEMS syndrome. *Neurology* 71:1691-1695, 2008.
- 5) D'Souza A, Lacy M, Gertz M, et al.: Long-term outcomes after autologous stem cell transplantation for patients with POEMS syndrome (osteosclerotic myeloma): a single-center experience. *Blood* 120:56-62, 2012.
- 6) Kuwabara S, Misawa S, Kanai K, et al.: Thalidomide reduces serum VEGF levels and improves peripheral neuropathy in POEMS syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79:1255-

- 1257, 2008.
- 7) Dispenzieri A, Klein CJ, Mauermann ML: Lenalidomide therapy in a patient with POEMS syndrome. *Blood* 110:1075-1076, 2007.
  - 8) Nasu S, Misawa S, Sekiguchi Y, et al.: Different neurological and physiological profiles in POEMS syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 83:476-479, 2012.
  - 9) Misawa S, Kuwabara S: Polyneuropathy, organomegaly, endocrinopathy, monoclonal gammopathy and skin changes (Crow-Fukase) syndrome: Diagnostic criteria and treatment perspectives. *Clinical and Experimental Neuroimmunology* 2013 in press.
  - 10) Kuwabara S, Dispenzieri A, Arimura K, et al.: Treatment for POEMS (polyneuropathy, organomegaly, endocrinopathy, M-protein, and skin changes) syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* 6: CD006828,2012.

## Treatment for Crow-Fukase (POEMS) syndrome

Sonoko Misawa

Crow-Fukase syndrome is a rare multisystemic disorder associated with plasma cell dyscrasia, which is characterized by polyneuropathy, organomegaly, endocrinopathy, M-protein and skin changes. Application of treatment for multiple myeloma, such as alkylator based therapy or immune modulatory drugs, has substantially improved prognosis of Crow-Fukase syndrome. However, there remain some issues to be solved for standardization and further progress of treatment for Crow-Fukase syndrome. The diagnostic criteria have not been scrutinized yet and should be refined to increase the diagnostic yield. In addition, the natural history is still unclear. The understanding of the natural history is essential to provide proper treatment with patients at appropriate phase of the disease. There have been no drugs approved by pharmaceutical and medical devices agency yet. As for rare diseases, commitment of pharmaceutical companies cannot be hoped in general. Academies have great responsibility for development of treatment for such cases. Our institution will endeavor to further improvement of prognosis of Crow-Fukase syndrome.

**Key Words:** Crow-Fukase (POEMS) syndrome, autologous stem cell transplantation, thalidomide, clinical trial

## 筋疾患に対する抗マイオスタチン抗体療法の開発と応用

砂田芳秀

【要旨】マイオスタチンは骨格筋特異的なTGF- $\beta$ ファミリー分子で、筋幹細胞の増殖や分化ならびに筋蛋白合成を抑制することで、骨格筋量を負に制御することから、筋ジストロフィーを含む筋疾患の治療ターゲットと考えられてきた。マイオスタチンの阻害抗体をジストロフィンが欠損した*mdx*マウスに投与すると、筋肉のジストロフィー変化の改善と筋力の増強がみられたが、残念ながら筋ジストロフィー患者を対象としたヒト化マイオスタチン抗体MYO-029の臨床治験では有意な効果が証明されなかった。他方、マイオスタチンのII型受容体(ActR-IIA/IIB)に対する抗体医薬BimagrumabはFDAにより封入体筋炎のbreakthrough therapyに認定され、米国で第3相試験が開始されている。こうしたマイオスタチンシグナルを標的とした治療薬の臨床応用には安全性ならびにサルコペニアや神経原性筋萎縮などを含めた適応疾患の確定が必要である。

**Key Words:** マイオスタチン、TGF- $\beta$ 、封入体筋炎、筋ジストロフィー

## はじめに

骨格筋は体重の約50%を占める最大の臓器であり、姿勢の保持や身体運動のみならず、関節や内臓の保護、エネルギー代謝、血液循環の補助などさまざまな生理機能を担っている。筋萎縮はその病態から表1のように分類されるが、筋肉が萎縮すると筋力低下・易疲労性・不動性・易転倒性などの運動症状に加えて、呼吸・循環機能の低下やインスリン抵抗性の亢進をきたすため、ADLや生命予後に大きな影響を及ぼすことになる。われわれの骨格筋量は筋肥大シグナルと筋萎縮シグナルのバランスにより規定される。肥大シグナルは成長ホルモンやテストステロン、インスリン様成長因子などであり、萎縮シグナルとしては脱神経、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ ファミリー分子などが知られている。これまでドーピングに使用されてきた筋肉増強剤は筋肥大シグナルに作用するものであったが、TGF- $\beta$ をターゲットとした萎縮シグナル阻害でも顕著な筋量増加作用を期待できることが分かってきて抗体医薬としても注目されている。

TGF- $\beta$ ファミリーとマイオスタチン

TGF- $\beta$ は細胞の増殖・分化を制御するサイトカインで、ほ乳類では40種以上の分子が同定されTGF- $\beta$ ファミリーを構成している。マイオスタチンmyostatinは骨格筋特異的に発現するTGF- $\beta$ ファミリー分子で、1997年にSe-Jin Lee博士らによりdegenerative PCRを用いてクローニングされた<sup>1)</sup>。当初GDF-8と命名された新規分子の機能は分かっていたが、作出されたノックアウトマウスでは骨格筋量が驚くほど増大した<sup>1)</sup>。以前からヨーロッパでは筋肉量が増大した肉牛(Belgian Blue、Piedmontese)や羊(Texel)などの家畜が知られていたが、こうした家畜においてもマイオスタチン遺伝子変異が発見された。さらに、2005年にはドイツでマイオスタチン遺伝子変異をもつ男児も報告された<sup>2)</sup>。この男児は新生児のころから、筋肉がよく発達していて、5歳にして3kgのダンベルを水平挙上できたという。こうした知見の集積により、マイオスタチンは骨格筋量を抑制的に制御していることが明らかにされた。

表1 病態生理からみた筋萎縮の分類

● inactivity-induced: disuse, microgravity
● sarcopenia
● disease-associated
● denervation-induced (neurogenic)
● myopathies
● cachexia: cancer, AIDS, CHF, COPD, CRF, etc
● starvation

### 抗マイオスタチン抗体による 筋ジストロフィー治療

2002年、Bogdanovichらはマイオスタチン中和抗体を*mdx*マウスに腹腔内投与すると、骨格筋量・筋収縮力とも有意に増加し、骨格筋病理像においてもジストロフィー変化に改善がみられたことを報告した<sup>3)</sup>。これを契機に抗マイオスタチン療法が新たな筋ジストロフィー治療法として注目されるようになった。欧米では、Wyeth社が開発したヒト型マイオスタチン阻害抗体MYO-029の臨床治験が行われた<sup>4)</sup>。Becker型筋ジストロフィー、肢帯型筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー患者合計116例を対象としてプラセボと4段階の用量設定で二重盲検第2相試験が行われた。安全性に関しては問題がなく、筋サイズが増加し筋病理所見に改善がみられた患者もいたが、全体としてはエンドポイントである徒手筋力テストや筋MRI検査において有意な改善がみられなかったことから、Wyeth社は開発を中止した。

### マイオスタチンのシグナル経路

マイオスタチンを阻害する方略としては、中和抗体以外にもいろいろな戦略が考えられ、創薬研究が進展している。そこで、まずマイオスタチンのシグナル経路について概説しておく(図1)。マイオスタチンは骨格筋で産生され分泌されるが、多くのTGF- $\beta$ ファミリー分子と同様、50kDaの前駆体タンパクとして合成されたあと、N末端側2/3を占めるプロドメインが切断されてC末端側1/3に相当する26kDaの活性ペプチド二量体が形成される。活性化二量体は細胞膜受容体に結合して、マイオスタチンシグナルが細胞内へと伝達される。一般にTGF- $\beta$ 受容体はタイプI型とタイプII型から成るヘテロ複合体構造をとるが、マイオスタチンの場合II型受容体はActR-IIBあるいはIIAであり、I型受容体はALK4あるいはALK5とされている。活性化型マイオ

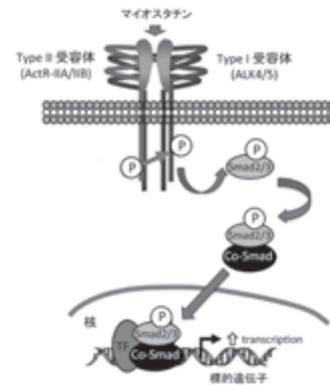


図1 マイオスタチンのシグナル経路

スタチンが結合するとこれら受容体がリン酸化され、これが細胞内エフェクター分子であるSmad2/3をリン酸化し、リン酸化Smad2/3は核内へ移行して、標的遺伝子の転写調節領域に結合する。こうして種々の標的遺伝子の発現が制御される結果、骨格筋形成が抑制される<sup>5)</sup>。

### 新たなマイオスタチン阻害戦略

#### 1) 可溶性デコイ受容体

II型受容体ActR-IIBの細胞内kinase domainを欠失させたドミナントネガティブ型受容体をマウスで過剰発現させると、骨格筋量は有意に増加する<sup>6)</sup>。Acceleron Pharma社がII型受容体分子のリガンド結合部位を有する細胞外ドメインだけからなる可溶性デコイ受容体ACE-031を開発し、DMDを対象とした第2相治験が行われたが、出血の副作用が出現したため中止された。

#### 2) II型受容体抗体 (Bimagrumab)

Novartis社により開発されたマイオスタチンのII型受容体であるActR-IIA/IIBに対する単クローン抗体医薬である。すでにFDAがbreakthrough therapyに指定しており、封入体筋炎、慢性閉塞性肺疾患での筋萎縮、癌悪液質、人工呼吸器装着患者を対象とした第2相試験が実施されており、わが国でも治験が始まろうとしている。

#### 3) 低分子受容体阻害薬

新たな抗がん剤として注目されているTGF- $\beta$ タイプI受容体セリン・スレオニンキナーゼ阻害薬は、マイオスタチンを含む複数のTGF- $\beta$ ファミリー分子による筋分化抑制作用をほぼ完全に阻害する<sup>7)</sup>。われわれはI型受容体の低分子阻害薬Ki26894を10週間にわたって肢帯型筋ジストロフィーモデルマウスに経口投与し、筋量と筋力の有意な増大と筋衛星細胞

数の増加を確認した<sup>7)</sup>。長期投与による目立った副作用はみられなかったことから、臨床応用も可能ではないかと考えられる。

### おわりに

筋萎縮治療としてマイオスタチンを標的とした治療戦略が注目され、II型受容体抗体の臨床応用が現実味を帯びている。筋疾患としては封入体筋炎が治療対象とされているが、今後筋ジストロフィーなどそのほかの筋疾患に対する治療効果を明らかにする必要がある。また、脱神経による筋萎縮やサルコペニアに対する治療効果の検証も検討課題である。他方で、筋量を増加させることでエネルギー代謝を高め、体脂肪量の減少やインスリン耐性の改善などメタボリック症候群の伸展抑制効果も期待できる。いずれにせよ、骨格筋量の制御は健康寿命の鍵を握る重要な問題であり、今後の研究の進展が注目される。

### 文献

- 1) McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ : Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* 387: 83-90, 1997.
- 2) Schuelke M, Wagner KR, Stolz LE, et al.: Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N Engl J Med* 350 : 2682-2688, 2004.
- 3) Bogdanovich S, Krag TO, Barton ER, et al.: Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature* 420 : 418-421, 2002.
- 4) Wagner KR, Fleckenstein JL, Amato AA, et al.: A phase I/II trial of MYO-029 in adult subjects with muscular dystrophy. *Ann Neurol* 63 : 561-571, 2008.
- 5) Kollias HD, McDermott JC : Transforming growth factor-beta and myostatin signaling in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 104 : 579-587, 2008.
- 6) Lee SJ, McPherron AC: Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 : 9306-9311, 2001.
- 7) Ohsawa Y, Okada T, Nishimatsu S, et al.: An inhibitor of transforming growth factor beta type I receptor ameliorates muscle atrophy in a mouse model of caveolin 3-deficient muscular dystrophy *Lab Invest* 92 : 1100-1114, 2012.

## Anti-myostatin antibody therapy for myopathies

Yoshihide Sunada

Myostatin, a member of the muscle-specific transforming growth factor (TGF) - $\beta$  family, negatively regulates skeletal muscle growth. It inhibits muscle stem cell proliferation and differentiation, and attenuates adult muscle fiber protein accretion, resulting in decreased skeletal muscle mass. Thus it has been considered to be a therapeutic target of myopathies including muscular dystrophy. Notably, administration of a blocking antibody against myostatin ameliorated the pathophysiology of dystrophin-deficient *mdx* mice. Unfortunately a clinical trial of an anti-myostatin antibody MYO-029 failed to achieve a significant outcome in patients with muscular dystrophies. However, a newly developed monoclonal antibody Bimagrumab against the type II myostatin receptor, ActR-IIA/IIB, has been granted breakthrough therapy designation for sporadic inclusion body myositis by US Food and Drug Administration. A phase III clinical trial has been started in the USA. Clinical application of the anti-myostatin therapeutics for the treatment of patients with muscle wasting disorders needs further evaluation of safety and specification of the target disease types including sarcopenia and denervation-induced muscular atrophy.

**Key Words:** myostatin, TGF- $\beta$  , inclusion body myositis, muscular dystrophy

## アルツハイマー病に対する免疫療法

玉岡 晃

【要約】 神経内科分野における免疫療法としては、多発性硬化症における抗 $\alpha 4$ インテグリン抗体など、各種の免疫性神経・筋疾患に対する抗体療法の有効性が示されてきている。一方、「蛋白蓄積疾患」の側面を有する神経変性疾患に対しても、免疫系を利用した治療法が開発されつつある。本稿では、代表的な神経変性疾患であるアルツハイマー病の免疫療法について、アミロイド $\beta$ 蛋白に対する能動免疫（ワクチン療法）と受動免疫（抗体療法）を中心に、その開発コンセプトから最新治療実績までを概説する。アルツハイマー病における抗体療法の成果は、ほかの神経変性疾患克服のための治療戦略として応用できる可能性があり、今後の動向が注目されている。

**Key Words** : アルツハイマー病、アミロイド $\beta$ 蛋白、免疫療法、能動免疫、受動免疫

### はじめに

神経内科分野における免疫療法としては、多発性硬化症における抗 $\alpha 4$ インテグリン抗体など、各種の免疫性神経・筋疾患に対する抗体療法の有効性が示されてきている。一方、「蛋白蓄積疾患」の側面を有する神経変性疾患に対しても、抗体療法を含め、免疫系を利用した治療法が開発されつつある。代表的な神経変性疾患であるアルツハイマー病（Alzheimer's disease ; AD）は初老期ないし老年期に認知症をきたす疾患のなかで最も頻度の高いものであるが、その原因は不明であり、根本的治療法も確立されていない。AD脳における最も初期の変化はアミロイド $\beta$ 蛋白（amyloid  $\beta$  protein ;  $A\beta$ ）の沈着であると考えられており、現在これを標的としたさまざまな治療法が考えられている。そうしたものの一つとして、 $A\beta$ に対する免疫療法が開発され、ADのモデル動物であるトランスジェニックマウスにおいてその有用性が証明されてきた。以下、本稿では $A\beta$ のワクチン療法（能動免疫）や抗体療法（受動免疫）を中心に概説する。

### 1. ADと $A\beta$

AD脳のおもな病理学的特徴としては、大脳皮質

や海馬を中心とする神経細胞脱落、細胞外に沈着する老人斑や脳血管アミロイド、細胞内に蓄積する神経原線維変化があげられる。老人斑・脳血管アミロイドの主要構成成分としては $A\beta$ 、神経原線維変化の構成成分としてはタウ蛋白が同定されているが、 $A\beta$ の脳内沈着はADの発症機序においてタウよりも上流に位置し、ADの病因により密接に関連した現象であろうと推測されてきた。この $A\beta$ を中心に据えたAD発症機構に関する仮説がアミロイドカスケード仮説と呼ばれているが、これに基づいた治療法が現在ADの疾患修飾薬（disease-modifying drugs）として開発されつつある。ADの免疫療法（ワクチン療法や抗体療法）はその代表的なものである。本稿では抗 $A\beta$ 抗体療法と、その先駆けとなったワクチン療法を中心に、ADの免疫療法に関して概説する。

### 2. ADのワクチン療法（能動免疫）

1) トランスジェニックマウス（Tg）を用いた試み  
Schenkら<sup>1)</sup>はGamesら<sup>2)</sup>により作成されたPDAPPマウスを用いて、合成 $A\beta$ ペプチドを能動免疫することによる病理変化に及ぼす影響について検討した。 $A\beta$ の分子種としては、より重合しやすく、ADやPDAPPマウス脳に蓄積する主要な分子種

であるA $\beta$ 42が用いられた。6週齢のまだA $\beta$ 沈着のみられない時期に能動免疫を開始した若年群Tgでは、13月齢での免疫組織化学やthioflavin S染色を用いた脳の病理学的検索にて、海馬、皮質ともにA $\beta$ の沈着がほとんど完全に抑制されており、変性神経突起の出現やアストログリアやミクログリアの反応も著明に減少していることが明らかとなった。つぎにA $\beta$ 42能動免疫療法が、すでに出現したA $\beta$ の沈着などにどのような影響を与えるかを検討するために、11ヵ月齢の成熟期のTgに同様な免疫療法を施行した。13ヵ月齢より血清中抗A $\beta$ 抗体の上昇がみられ、15ヵ月齢と18ヵ月齢の病理学的検索では、両者ともに大脳皮質のA $\beta$ 沈着は著明に減少しており（それぞれ対照群の96%、99%以上の減少）、残った老人斑はしばしばマウスIgGで覆われていた。海馬でも瀰慢性のA $\beta$ 沈着は消失し、A $\beta$ を貪食した活性化ミクログリア／単球系の細胞が認められた。また、変性神経突起を伴う老人斑やアストロサイトの反応も15ヵ月齢、18ヵ月齢ともに抑制されていた。本報告はADのTgモデルマウスを用いて、AD病変の出現、進行の抑制を初めて証明したものであるが、A $\beta$ の能動免疫療法の作用機序としては、生じたA $\beta$ 抗体がFc受容体を介して単球／ミクログリア系を活性化することによって、A $\beta$ のクリアランスを促進する可能性が示唆された。

このようなA $\beta$ ワクチン療法は以後異なる複数の施設で追試され、ほぼ同様のワクチン療法で記憶障害も改善されること<sup>35)</sup>や、経口あるいは経鼻粘膜的投与でも脳内A $\beta$ 沈着改善効果があること<sup>6)</sup>が相次いで報告された。

## 2) 臨床試験

上記のモデル動物での前臨床試験の結果を受け、2001年にヒトを対象としたA $\beta$ ワクチン療法（AN-1792ワクチン：合成A $\beta$ 42とアジュバントQS21の筋注ワクチン）の臨床試験が始められたが、6%（18例／298例）に髄膜脳炎患者が発生したため<sup>7)</sup>、2002年第Ⅱ相試験中に中止となった。抗体上昇群は約20%にとどまったが、抗体の脳脊髄液中への移行や、脳内に沈着した不溶性A $\beta$ を特異的に認識する選択性の高い性質が明らかにされた<sup>8)</sup>。また、抗体の産生が認められた25例を4.6年間にわたって経過観察した結果、抗体産生群ではプラセボ群に比較して、DAD、dependence scale、CDR-SOB、Rey Auditory Verbal Learning Scaleでみた認知機能障害の進行が有意に抑制されていた<sup>9)</sup>。

剖検脳において、ワクチン治療によって老人斑の消失、アミロイドアンギオパチーの残存がみられる

こと、神経原線維変化やneuropil threadsの減少は認められないことが確認され<sup>10)</sup>、老人斑消失部位でのA $\beta$ 貪食ミクログリアの存在より、抗体の脳内移行→老人斑に結合→Fc受容体を介するミクログリアによる貪食、という機序が示唆された。ワクチン接種後1年の患者において認知機能改善はみられず<sup>10)</sup>、臨床試験中止後6年間の結果報告においても、新たに剖検された8名の多くは老人斑の著明な減少がみられ、抗A $\beta$ 抗体の抗体価が高いものほど減少している傾向が認められたものの、神経原線維変化は残存しており、認知症の進行や重度のADへの移行は阻止できず、非ワクチン群との有意差は認められなかったことが明らかにされた<sup>11)</sup>。

Serrano-Pozoら<sup>12)</sup>によるその後の検討で、神経突起の長さをその両端の直線距離で割ったものを湾曲度とすると、非ワクチン群において、神経突起の湾曲度は、総老人斑やコア斑と有意な相関がみられたが、ワクチン群の海馬神経突起の湾曲度は非ワクチン群に比して、より直線上で、対照群に近い状態を示した。また、海馬のlate-stage リン酸化タウを反映するPHF-1陽性神経細胞はワクチン群では非ワクチン群に比して有意に減少していた。これらの知見はワクチン群において非ワクチン群より神経突起の変性程度やタウの変化の度合いが抑制されていることを示唆するものと考えられた。

## 3) 今後の課題

以上のAN-1792の結果より、ADの病態を抑制するためには不溶化して沈着した老人斑アミロイドを標的にするのみでは不十分であり、より早期の段階での治療開始が必要であることが示唆された。また、軽微な臨床症状の変化を捉えるような評価法あるいはより安定的に測定可能なsurrogate markerの必要性が強調された。今後開発されるワクチンの条件として、髄膜脳炎などの副作用をきたさないことが第一に求められる。髄膜脳炎はA $\beta$ に反応するTh1型CD4陽性細胞の活性化によるものと考えられており、T細胞活性化能が弱くB細胞活性化能（Th2反応）が強いA $\beta$ 配列を抗原とすることが望まれる。現在Th2反応はA $\beta$ のN末端側で誘起しやすいことがわかっており、より安全なワクチンの開発、治験が進められている（表1）。

## 3. タウに対するワクチン

神経原線維変化の主要構成成分であるタウは、微小管結合蛋白質であり、その安定性に関係していると考えられている。タウの機能はリン酸化により調

節されていると考えられており<sup>13)</sup>、ADでは異常リン酸化されることにより凝集し、毒性を示すと考えられている。タウの遺伝子変異によって引き起こされる認知症として、17番染色体に連鎖したパーキンソンニズムを伴う前頭側頭型認知症 (frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17: FTDP-17) があり、ADと同様のタウ病理が知られている。FTDP-17で知られている変異 (P301L) をもつ、タウ変異マウスモデルに対して、2ヵ所のリン酸化サイトに対応するアミノ酸を含むペプチド (Tau379-408 [P-Ser<sub>396,404</sub>]) を抗原として投与し、免疫した<sup>14)</sup>。このマウス脳では、さまざまな部位でタウ沈着が減少しており、運動機能障害が改善されていた。このマウスから得られた抗体は、P301Lマウス脳のみでなく、AD脳においても異常凝集タウを認識しており、これらの結果はタウを標的とした治療により、ADなどが改善する可能性を示唆するものとして注目された。

#### 4. ADの抗体療法(受動免疫)

##### 1) 前臨床試験

能動免疫において抗体上昇群が約20%と少なかったことと細胞性免疫活性化による髄膜脳炎が生じたことより、さまざまな抗体による受動免疫療法がADモデル動物を用いて検証され、その有用性が確認されてきた。

Bardら<sup>15)</sup>はPDAPPマウスに抗A $\beta$ 抗体を腹腔内投与することにより、A $\beta$ の受動免疫療法の効果を検討した。10ヵ月齢前後のPDAPPマウスにA $\beta$ のモノクローナル抗体やA $\beta$ 1-42に対するマウスポリクローナル抗体の免疫グロブリン画分を腹腔内に毎週注入し、6ヵ月後画像解析によるA $\beta$ の沈着面積の評価とELISAによるA $\beta$ 42の定量を行ったところ、対照群に比して抗体投与群では、老人斑やA $\beta$ 42の有意な低下が認められた。被検マウスの脾細胞を用いた検討ではA $\beta$ に対するT細胞の増殖反応は認められず、おもにA $\beta$ の抗体によってアミロイドが減少したことが示唆され、免疫組織化学にて腹腔内に投与した抗A $\beta$ 抗体が老人斑に付着していることも証明された。これらの知見より、抗A $\beta$ 抗体は老人斑のクリアランスに、T細胞の反応を介することなく直接的に関与している可能性が考えられた。マイクログリアの一次培養細胞とPDAPPマウスやADの脳切片をインキュベートするex vivoのアッセイにて、抗A $\beta$ 抗体の前処置を切片に加えておくと、脳内A $\beta$ の減少とマイクログリア内のA $\beta$ を含んだ食

食小胞が認められることが明らかとなり、ウェスタンブロットにてA $\beta$ の分解が示された。このようなex vivoのアッセイ結果や抗A $\beta$ 抗体の重合A $\beta$ との親和性と、抗A $\beta$ 抗体のin vivoでのA $\beta$ クリアランス効率も示された。ex vivoアッセイではまた、抗A $\beta$ 抗体のF(ab')<sub>2</sub>断片では老人斑には結合してもマイクログリアの貪食が生じないこと、マイクログリアのFc受容体に対する抗体によって抗A $\beta$ 抗体によるマイクログリアのA $\beta$ 貪食が抑制されることも証明された。以上の知見と、抗A $\beta$ 抗体の可溶性A $\beta$ との親和性が脳内A $\beta$ 除去能とは関連しなかったことより、抗A $\beta$ 抗体の作用機序としては、可溶性A $\beta$ との結合による新たな老人斑形成の抑制よりも、重合し沈着したA $\beta$ の認識とクリアランスのほうが重要であり、クリアランスはマイクログリアのFc受容体を介した貪食によって行われるものと考えられた。

Wilcockら<sup>16,17)</sup>は頭蓋内に抗体を注入することにより瀰漫性のアミロイド沈着は1日以内に、マイクログリアの活性化を伴ったコンゴレッド陽性のアミロイドは3日以内に消失し、抗体注入部のアミロイド沈着や抗体の大半が1週間以内には認められなくなることを示した。また、3ヵ月以内にはコンゴレッド陽性アミロイド沈着の90%が消失することも示された<sup>18)</sup>。一方、受動免疫療法により微小出血の発現が報告され<sup>19)</sup>、それが血管アミロイドの沈着増加と相関することが示された<sup>20)</sup>。抗体療法の開始時にすでにアミロイド沈着を有するマウスにおいて受動免疫による微小出血が生じることが明らかにされた<sup>21,22)</sup>。このような副作用を避けるために、抗体の修飾に工夫がなされ、脱グリコシル化によるFc-gamma受容体や補体蛋白などの反応の抑制が行われ、マイクログリアの活性化なしにアミロイドを除けることが示された<sup>23)</sup>。また、脱グリコシル化抗体の全身投与によって血管アミロイドの増加がありながら、微小出血は劇的に減少することが報告された<sup>19)</sup>。また、アミロイドのクリアランスはやや減少するものの、記憶障害も改善することが明らかにされた<sup>24)</sup>。

Hymanら<sup>25)</sup>は多数の高齢者において血漿中の抗A $\beta$ 抗体をELISAによって測定したが、その過半数に低い抗体価が検出され、より高い抗体価が5%以下に認められた。また、その抗体価はAD罹患や血漿A $\beta$ 量とは相関せず、ヒト血漿中の抗A $\beta$ 抗体がADの発症を予防している可能性は否定的であった。したがって、A $\beta$ の抗体療法をヒトに適用する場合、通常認められるよりも高い抗体価を維持する

表1 アルツハイマー病の主要な免疫療法

名称	免疫様式	A $\beta$ エピトープ	製薬会社	臨床試験
AN1792	能動免疫	A $\beta$ 1-42	Elan	第II相 (中止)
ACC001	能動免疫	A $\beta$ N末端	Janssen/Wyeth (Elan)	第II相
CAD106	能動免疫	A $\beta$ N末端	Novartis	第II相
UB311	能動免疫	A $\beta$ N末端	United Biomedical	第I b相
Affitope AD1 and AD2	能動免疫	A $\beta$ 類似ペプチド	GSK/Affiris	第II相
V950	能動免疫	A $\beta$ 構造	Merck	第I相
Bapineuzumab	受動免疫	A $\beta$ N末端	Janssen/Wyeth (Elan)	第III相 (中止)
Solanezumab	受動免疫	A $\beta$ 中央部	Eli Lilly	第III相
Ponezumab	受動免疫	A $\beta$ C末端	Pfizer	第II相 (中止)
GSK933776A	受動免疫	A $\beta$ N末端	GlaxoSmithKline	第I相
Bapineuzumab s.c	受動免疫	A $\beta$ N末端	Janssen/Wyeth (Elan)	第I相 (中止)
Crenezumab/MABT5102A	受動免疫		Genentech	第II相
Gantenerumab/R1450	受動免疫	A $\beta$ N末端 + 中央部	Roche	第I相
BAN2401	受動免疫	A $\beta$ protofibrils	Eisai/BioArctic	第I相
Gammagard	受動免疫	ヒト免疫グロブリン	Baxter	第III相
Octagam	受動免疫	ヒト免疫グロブリン	Octapharma	第II相

必要があり、自己免疫現象の危険性の有無はどうか、Tgマウスでの行動異常の改善をヒトの認知症の軽減に結び付けることができるかどうかなど、今後解決しなければならない課題は多い。

## 2) 臨床試験

現在多くの企業において、さまざまなエピトープの抗体が開発され、臨床試験が進められている。最も開発段階が進んでいるものは、Elan/Wyeth社のBapineuzumab、Eli Lilly社のSolanezumab、Baxter社のGammagardであり、臨床第III相試験が行われた。BapineuzumabはA $\beta$ のN末端(A $\beta$  1-6)にエピトープがあり、老人斑に強く結合し、Fc受容体を介してミクログリアによる貪食を促進し、老人斑を減少させることが示されている。A $\beta$ オリゴマーの除去に関しては不明である。臨床第II相試験では軽度から中等度のAD患者234名に18ヵ月間、Bapineuzumab4容量(0.15,0.5,1.0,2.0mg/kg)を3ヵ月に1回、計6回の静注が行われ、78週後に評価された<sup>26)</sup>。脳脊髄液タウやリン酸化タウの減少がみられ、アミロイドイメージングによる脳内A $\beta$ の減少も認められた<sup>27)</sup>が、容量別での有効性は認められず、抗体投与群の認知機能も徐々に低下していった。一方、ApoE4患者をのぞいた解析では、ADAS-cogやDADにて有意な改善が得られた。しかしながら、血管原性脳浮腫の有害事象が約10%にみられ、特にApoE4患者の高容量群で目立っていた。これらの

結果に基づき、第III相試験ではApoE4の保有者と非保有者において異なる容量で行われたが、認知機能障害の改善や進行予防効果は認められず、中止となった。Solanezumabはm266抗体をヒト型化したもので、A $\beta$ の中央部分(A $\beta$  13-28)にエピトープがあり、血中の可溶性A $\beta$ モノマーにより強く結合し、投与により脳脊髄液や血液中のA $\beta$ 濃度の増加が報告されている<sup>28)</sup>。第III相試験にて認知機能障害の進行が軽度抑制されるも有意差は認められなかった。サブ解析にて軽度AD群での効果が示唆されたため、軽度AD患者を対象に再度治験が行われている。Pfizer社のPonezumabはA $\beta$  40のC末端にエピトープがあり、老人斑アミロイドや血管アミロイドの除去効果がみられる。前臨床試験で脳出血が生じたため、その軽減のためにFc部分が脱グリコシル化された。第III相試験が行われたが、有効性の確認ができず、中止となった。Roche/中外社のGantenerumab R1450はヒトフェージライブラリーから得られた完全ヒト型抗体であり、エピトープはN末端と中央部分にあり、立体構造を認識しているらしい。Baxter社のGammagardとOctapharma社のOctagamはヒト免疫グロブリン製剤であり、自然抗体のなかに含まれるA $\beta$ を除去する抗体を利用するものである。GammagardにはA $\beta$ オリゴマーに対する抗体が含まれており、臨床第II相試験で認知機能の改善効果が確認されている<sup>29)</sup>。第III相試験

では軽度から中等度のAD患者に18ヵ月間の投与で有効性が認められなかったが、サブ解析にてApoE4キャリアの2/3に効果を示唆する結果が得られている。Octagamは5例のAD患者に6ヵ月間毎月投与され、脳脊髄液A $\beta$ の低下、血清A $\beta$ の上昇、認知機能の改善がみられている。Eisai社のBAN2401はArctic変異 (APP E693G) により形成されるA $\beta$  1-42 Arcから調整されたprotofibrilを免疫して作製されたmAb158<sup>30)</sup> をヒト型化したもので、protofibrilを認識するが、A $\beta$ オリゴマーの除去に関しては不明である。現在臨床試験に向けてさまざまな検討が行われている。そのほか、tissue amyloid plaque immune-reactive (TAPIR) 様モノクローナル抗体<sup>31)</sup> や抗A $\beta$ オリゴマー抗体<sup>32)</sup> の開発も進められている (表1)。

2013年より、米国を中心に早期の薬剤介入試験が開始されており、アミロイドイメージングが陽性の健常者 (preclinical AD) を対象としたA4 (Anti-Amyloid Treatment in Asymptomatic AD trial) ではSolanezumabが、家族性ADの遺伝子キャリアで未発症者を対象とするDIAN-TU (Dominantly inherited Alzheimer Network trials unit) ではGantenerumabやSolanezumabが、API (Alzheimer's Prevention Initiative) ではCrenezumabが用いられている。

## 5. 免疫療法の作用機序

脳脊髄液中のIgG濃度は5～50mg/Lであり、血漿中の約0.1%である。また、一般に脳は免疫監視機構から保護されている臓器と考えられてきた。したがって、ADにおける免疫療法の可能性を示唆する知見は従来の予想を覆すものであった。現在、ADの免疫療法の作用機序に関してはいくつかの仮説が提唱されている<sup>33)</sup>。①抗体が抗原をオプソニン化し、マクロファージの貪食や補体の活性化を誘導する機序、②血中の抗体がA $\beta$ と結合することによって血中のフリーなA $\beta$ を減少させ、血液脳関門を隔てたA $\beta$ の平衡関係に変化をきたし、脳内からA $\beta$ を血中に引き出す機序 (peripheral sink仮説)、③抗体がA $\beta$ モノマーの二次構造を変化させ、凝集を阻害する機序、④抗原抗体複合体が新生児のFc受容体の介在により血液脳関門から搬出される機序、などである。これらの機序はお互いに排他的なものではなく、複合的に作用しているものだと考えられる。また、抗体の種類や特性によっても異なる機序が異なる程度に働いている可能性が高い。

## 6. 抗体療法の利点と欠点

抗体療法の利点は、有害事象が生じた際などに投与を中止すれば抗体を体内から除去できることである。また、細胞性免疫の賦活による髄膜脳炎の可能性が低い点もある。能動免疫における低い抗体産生率を克服できる点も大きい。しかしながら、血管原性浮腫や出血の生じる可能性 (それぞれApoE4、アミロイドアングリオパチーが関連すると考えられている)、中和抗体の出現する可能性、繰り返し静脈注射が必要な点、高額であること、などは欠点である。モノクローナル抗体に限られたエピトープで反応することが有害事象の防止という意味では有利に働くこともあるが、ADの病態惹起分子が明確でない段階では、ポリクローナル抗体や安全なワクチン療法のほうが優れている面もあるといえる。

## おわりに

ADの根本的治療法としてのA $\beta$ の免疫療法 (ワクチン療法と抗体療法) を概説した。特に抗体療法では臨床試験の進んだ段階に入っているものもあり、今後の進展次第では、ADの治療薬として使用できることが期待できる。これらの免疫療法が現実のものとなるためには、投与の時期、症状の評価方法、surrogate markerの確立、ADの診断基準の見直しなど乗り越えなければならない課題も多い。また、アルツハイマー病における免疫療法の成果は、「蛋白蓄積疾患」という共通点から、ほかの神経変性疾患克服のための治療戦略として応用できる可能性があり、今後の動向が注目される場所である。

## 文献

- 1) Schenk D, Barbour R, Dunn W, et al.: Immunization with amyloid- $\beta$  attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400: 173-177, 1999.
- 2) Games D, Adams D, Alessandrini R, et al.: Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F  $\beta$ -amyloid precursor protein. *Nature* 373: 523-527, 1995.
- 3) Morgan D, Diamond DM, Gottschall PE, et al.: A  $\beta$  peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature* 408: 982-985, 2000.
- 4) Janus C, Pearson J, McLaurin J, et al.: A  $\beta$  peptide

- immunization reduces behavioral impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature* 408: 979-982, 2000.
- 5) Sigurdsson EM, Scholzove H, Mehta PD, et al.: Immunization with a nontoxic / nonfibrillar amyloid- $\beta$  homologous peptide reduces Alzheimer's disease-associated pathology in transgenic mice. *Am J Pathol* 159: 439-447, 2001.
  - 6) Weiner HL, Lemere CA, Maron R, et al.: Nasal administration of amyloid- $\beta$  peptide decreases cerebral amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 48: 567-579, 2000.
  - 7) Orgogozo JM, Gilman S, Dartigues JF, et al.: Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after A $\beta$  42 immunization. *Neurology* 61:46-54,2003.
  - 8) Gilman S, Koller M, Black RS, et al.: Clinical effects of A $\beta$  immunization (AN1792) in patients with Alzheimer's disease in an interrupted trial. *Neurology* 64:1553-1562, 2005
  - 9) Vellas B, Black R, Thal LJ, et al.: Long-term follow-up of patients immunized with AN1792: reduced functional decline in antibody responders. *Curr Alzheimer Res* 6:144-151, 2009.
  - 10) Nicoll JA, Wilkinson D, Holmes C, et al.: Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report. *Nat Med* 9:448-452,2003.
  - 11) Holmes C, Boche D, Wilkinson D, et al.: Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. *Lancet* 372:216-223,2008.
  - 12) Serrano-Pozo A, William CM, Ferrer I, et al.: Beneficial effect of human anti-amyloid- $\beta$  active immunization on neurite morphology and tau pathology. *Brain* 133:1312-1327, 2010.
  - 13) Johnson GV, Stoothoff WH: Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *J Cell Sci* 117:5721-5729, 2004.
  - 14) Asuni AA, Boutajangout A, Quartermain D, et al.: Immunotherapy targeting pathological tau conformers in a tangle mouse model reduces brain pathology with associated functional improvements. *J Neurosci* 27:9115-9129, 2007.
  - 15) Bard F, Cannon C, Barbour R, et al.: Peripherally administrated antibodies against amyloid  $\beta$  -peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nature Med* 6: 916-919, 2000.
  - 16) Wilcock DM, Munireddy SK, Rosenthal A, et al.: Microglial activation facilitates A $\beta$  plaque removal following intracranial anti-A $\beta$  antibody administration. *Neurobiol Dis* 15:11-20,2004.
  - 17) Wilcock DM, DiCarlo G, Henderson D, et al.: Intracranially administered anti-A $\beta$  antibodies reduce  $\beta$  - amyloid deposition by mechanisms both independent of and associated with microglial activation. *J Neurosci* 23:3745-3751,2003.
  - 18) Wilcock DM, Rojiani A, Rosenthal A, et al.: Passive amyloid immunotherapy clears amyloid and transiently activates microglia in a transgenic mouse model of amyloid deposition. *J Neurosci* 24:6144-6151,2004.
  - 19) Pfeifer M, Boncristiano S, Bondolfi S, et al.: Cerebral hemorrhage after passive anti-A $\beta$  immunotherapy. *Science* 298:1379,2002.
  - 20) Wilcock DM, Rojiani A, Rosenthal A, et al.: Passive immunotherapy against A $\beta$  in aged APP-transgenic mice reverses cognitive deficits and depletes parenchymal amyloid deposits in spite of increased vascular amyloid and microhemorrhage. *J Neuroinflammation* 1: 24,2004.
  - 21) Racke MM, Boone LI, Hepburn DL, et al.: Exacerbation of cerebral amyloid angiopathy-associated microhemorrhage in amyloid precursor protein transgenic mice by immunotherapy is dependent on antibody recognition of deposited forms of amyloid  $\beta$ . *J Neurosci* 25:629-636,2005.
  - 22) Schroeter S, Khan K, Barbour R, et al.: Immunotherapy reduces vascular amyloid- $\beta$  in PDAPP mice. *J Neurosci* 28:6787-6793,2008.
  - 23) Carty NC, Wilcock DM, Rosenthal A, et al.: Intracranial administration of deglycosylated C-terminal-specific anti-A $\beta$  antibody efficiently clears amyloid plaques without activating microglia in amyloid-depositing transgenic mice. *J Neuroinflammation* 10:3-11,2006.
  - 24) Wilcock DM, Alamed J, Gottschal PE, et al.: Deglycosylated anti-amyloid- $\beta$  antibodies eliminate cognitive deficits and reduce parenchymal amyloid with minimal vascular consequences in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *J Neurosci* 26:5340-5346,2006.
  - 25) Hyman BL, Smith C, Buldyrev I, et al.:

- Autoantibodies to amyloid- $\beta$  and Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 49: 808-810, 2001.
- 26) Salloway S, Sperling R, Gilman S, et al: A phase 2 multiple ascending dose trial of bapineuzumab in mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology* 73:2061-2070,2009.
- 27) Rinne JO, Brooks DJ, Rossor MN, et al: 11C-PiB PET assessment of change in fibrillar amyloid- $\beta$  load in patients with Alzheimer's disease treated with bapineuzumab: a phase 2, double-blind, placebo-controlled, ascending-dose study. *Lancet Neurology* 9:363-372, 2010.
- 28) Siemers E: Biochemical biomarkers as endpoints in clinical trials: Applications in Phase 1, 2 and 3 studies. *Alzheimer's Dementia* 5 (Suppl 1) :95,2009.
- 29) Relkin NR, Szabo P, Adamiak B, et al: 18-Month study of intravenous immunoglobulin for treatment of mild Alzheimer disease. *Neurobiol Aging* 30:1728-1736, 2009.
- 30) Englund H, Sehlin D, Johansson AS, et al: Sensitive ELISA detection of amyloid- $\beta$  protofibrils in biological samples. *J Neurochem* 103:334-345,2007.
- 31) Wang J, Hara H, Makifuchi T, et al: Development and characterization of a TAPIR-like mouse monoclonal antibody to amyloid- $\beta$ . *J Alzheimers Dis* 14:161-173,2008.
- 32) Matsubara E, Takamura A, Okamoto Y, et al: Disease modifying Therapies for Alzheimer's disease targeting A  $\beta$  oligomers: Implications for therapeutic mechanisms. *Biomed Res Int* 2013;2013:984041. doi: 10.1155/2013/984041. Epub 2013 Aug 26.
- 33) Morgan D: Immunotherapy for Alzheimer's disease. *J Intern Med* 269:54-63,2011.

## Immunotherapy for Alzheimer's disease

Akira Tamaoka

Neuropathological characteristics of Alzheimer's disease (AD) brain include senile plaques, neurofibrillary tangles and neuronal cell loss extensively recognized in brain cortices. Biochemical studies revealed that senile plaques and neurofibrillary tangles are composed mainly of amyloid  $\beta$  protein and highly phosphorylated tau protein, one of microtubules-associated proteins, respectively.  $A\beta$  deposition in senile plaques was earlier considered to begin the pathological cascade of Alzheimer's disease (AD), suggesting that the aggregation of  $A\beta$  into insoluble  $A\beta$  fibrils plays an important role in its neurotoxicity ('amyloid cascade hypothesis'). However, currently, AD is believed to begin with synaptic dysfunction caused by soluble  $A\beta$  oligomers, playing a more important role in the etiology of AD than insoluble  $A\beta$  fibrils ('oligomer hypothesis'). Therefore, the development of numerous disease-modifying treatments for AD based on recent advances in the understanding of AD includes immunotherapy against tau or  $A\beta$ .

Immunization with tau peptides or anti-tau antibodies could remove the tau aggregates and improve the cognitive function in preclinical study, which provides a novel strategy of AD therapy. Several types of  $A\beta$  peptide immunotherapy for AD are under investigation, for example, direct immunization with synthetic intact  $A\beta$  42, active immunization involving the administration of synthetic fragments of  $A\beta$  peptide and passive administration with monoclonal or polyclonal antibodies directed against  $A\beta$  peptide. Preclinical studies showed that immunization against  $A\beta$  peptide can provide protection and reversal of the pathology of AD in animal models. In clinical studies, so far, immunotherapy approaches resulted in clearance of amyloid plaques in patients with AD, whereas this clearance did not show significant cognitive effect for the moment.

Since AN-1792 vaccine induced autoimmune encephalitis, several pharmaceutical companies are now concentrated in developing other immunotherapies in AD. Although passive immunization can avoid autoimmune encephalitis, it is expensive and it is not suitable for prevention. Thus, safe vaccines by active immunization would be preferable in such points. It is reported that vaccines inducing Th2 type immune responses would be promising. On the other hand, in order to avoid  $A\beta$ -induced autoimmune encephalitis, several monoclonal and polyclonal antibodies are in clinical trials. These are bapineuzumab, solanezumab, gantenerumab, BAN2401, gammaguard, octagam, etc. Several adverse events have been described like vasogenic edema and microhemorrhages with bapineuzumab.

Since each vaccine or antibody has a different anti-amyloid activities, it is unknown which immunotherapy is effective for AD, and we must wait for the result of clinical trials.

**Key Words** : Alzheimer's disease, amyloid  $\beta$  protein, immunotherapy, active immunization, passive immunization

## 筋萎縮性側索硬化症に対する抗体医療研究の現状

漆谷 真

**【要旨】** 神経変性疾患の多くは蛋白質の構造異常すなわちミスフォールディングによって発症すると考えられている。ミスフォールド蛋白質はそれ自体が細胞内外でさまざまな有害パスウェイを誘発するが、加えてシード効果による細胞内凝集体の誘導やプリオン様蛋白質伝播が神経変性の進行の分子基盤である可能性が示唆され、特定の構造のみと結合しうる抗体は非常に有効な治療手段である。致死性の進行性四肢麻痺を呈する筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis; ALS) においても家族性ALSにおけるsuperoxide dismutase 1 (SOD1) や、孤発性TDP-43など、病原蛋白質が判明しており抗体療法による治療が注目されている。

**Key Words:** 筋萎縮性側索硬化症、ミスフォールディング、superoxide dismutase 1、抗体

### はじめに

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は体性運動ニューロンの系統変性を臨床病理学的特徴とする、比較的均一性の高い神経変性疾患である。近年の家族性ALSの原因として多くの遺伝子突然変異が同定され、変異遺伝子産物はアミノ酸置換や欠失などにより異常構造をとるものが多い。さらに興味深いことに、TDP-43、SOD1、Optineurin、VCPやubiquilin2のように孤発性ALSの病巣において家族性ALSの遺伝子異常に基づく蛋白質が異常蓄積していることから、蛋白質構造異常は家族性と孤発性ALS両者における共通病態の一つと考えられている<sup>1)</sup>。

### 運動ニューロン死の非細胞自律性

一方、家族性ALSにおいて最も頻度の高い変異SOD1を導入したALSモデルマウスの研究から、運動ニューロンやグリア細胞等の単一細胞でミスフォールド蛋白質を発現させても運動ニューロン変性にいたらないことが判明し、少なくとも変異SOD1において運動ニューロン変性は非細胞自律性であることが明らかとなった。細胞間隙に存在するさまざまな候補物質が探索されたが、われわれは原因蛋白質である変異SOD1自体が神経分泌蛋白質クロモグラニンと結合して細胞外分泌され、ミクログ

リアの活性化と運動ニューロン死を起こすことを報告し、原因蛋白質の細胞外放出がALS病態の非細胞自律性の基盤となる可能性を指摘した<sup>2)</sup>。さらに近年、病態関連蛋白質のプリオン蛋白質様細胞間伝播を示唆する研究結果が世界中から報告され、神経変性疾患の病巣の拡大の背景機序として注目されており、変異SOD1においても培養細胞実験においては細胞間伝播が生じることが示されている。このように細胞外の疾患原因蛋白質は治療標的として注目されており、とりわけ異常構造を特異的に標的とする抗体を利用する免疫療法は非常に有望な治療戦略である。

### 変異SOD1に対する免疫療法

筆者らは2007年にG93A型変異SOD1トランスジェニックマウスに対する組換え変異SOD1蛋白質を用いたワクチン療法と、同蛋白質に対するポリクローナル抗体の脳室内投与が発症を遅延させ罹病期間を有意に延長させることを報告した<sup>3)</sup>。その後変異SOD1特異認識mAb D3H5の脳室内投与や<sup>4)</sup>、SOD1の二量体接合界面配列に対するペプチド (SEDI) を用いたワクチン療法や<sup>5)</sup>、さまざまな新規のmAbを用いた他動免疫療法の有効性が学術誌・学会報告され、臨床治験に向けた動きが進みつつある。ここで重要なのは、抗体の治療効果の有無を規定するの

はエピトープであるということである。SEDI抗体はカルボキシル末端をエピトープとし、また近年報告された29-35番のペプチドは単独でミクログリアを活性化し、変性の進んだ運動ニューロンのSOD1を認識する<sup>6)</sup>。

### プリオン様蛋白質伝播仮説

プリオン蛋白質は $\beta$ シート構造をとるとシード効果が増強し、細胞外に放出されたあと隣接細胞に再び取り込まれる。近年 $\alpha$ シヌクレインやタウ蛋白質がプリオン蛋白質同様のシード効果と伝播性を示し、病巣拡大の分子メカニズムとなっていることが動物モデル報告された。変異SOD1においては2012年、TDP-43では2013年培養細胞を用いた実験によって報告された。蛋白質が細胞外に放出される機序は不明であるが、細胞内で細胞質蛋白質が膜構造に取り込まれ、さらに大型膜構造内に取り込まれMultivesicular bodyを形成し、それが細胞膜付近に異動、外膜が細胞膜と癒合して内部の膜構造であるexosomeが放出される。そのほか膜構造を介さずに裸の状態で蛋白質が放出される場合もある。以上より細胞間の蛋白質伝播を阻止できれば疾患の病巣拡大を防げる可能性がある<sup>7,8)</sup>。

### Intrabodyによる細胞内ミスフォールドSOD1の除去治療

さらに近年、ヒトイムノグロブリン (Ig) mRNA由来のファージディスプレイや、モノクローナル抗体 (mAb) 産生ハイブリドーマのIgG mRNAを用いて構築した短鎖・長鎖可変領域 (scFv) をベクターに組み込むことにより、細胞内抗体 (intrabody, nanobody) として細胞内の異常構造を標的することが可能である。過去にパーキンソン病、ハンチントン病の細胞モデル、in vitroモデルで報告され、近年SOD1に対するintrabodyの有効性も報告されており、われわれはミスフォールドSOD1や異所性局在をしたTDP-43を特異的に認識するモノクローナル抗体の作出に成功しintrabodyを用いた細胞内抗体療法開発を進めている。

### まとめ

神経変性疾患が異常蛋白質病であることが認知されて久しいが、当初の診断的意義から最近では治療標的と認識されつつあり、特定の構造異常をとった疾

患関連蛋白質を特異的に結合しうる抗体療法は非常に有望な治療手段である。治療抗体は適切なエピトープをデザインすることが重要であり、病態に関連する分子内配列の解析が重要である。ALSにおいては変異SOD1に対する分子内標的、免疫療法の前臨床試験のデータも蓄積しつつあり、一日も早い臨床応用が望まれる。

### 文献

- 1) 漆谷真: ALSにおけるワクチン・抗体療法の開発 (辻省次、祖父江元 編) アクチュアル脳・神経疾患の臨床『すべてがわかる筋萎縮性側索硬化症・運動ニューロン疾患』. 中山書店, 東京, 2013, 275-281.
- 2) Urushitani M, Sik A, Sakurai T, et al.: Chromogranin-mediated secretion of mutant superoxide dismutase proteins linked to amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 1:108-118, 2006.
- 3) Urushitani M, Ezzi SA, Julien JP: Therapeutic effects of immunization with mutant superoxide dismutase in mice models of ALS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 2495-2500, 2007.
- 4) Liu HN, Tjostheim S, Dasilva K, et al.: Targeting of monomer/misfolded SOD1 as a therapeutic strategy for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 32:8791-8799, 2012.
- 5) Gros-Louis F, Soucy G, Larivière R, et al.: Intracerebroventricular infusion of monoclonal antibody or its derived Fab fragment against misfolded forms of SOD1 mutant delays mortality in a mouse model of ALS. *J Neurochem* 113, 1188-1199, 2010.
- 6) Sábado J, Casanovas A, Hernández S, et al.: Immunodetection of disease-associated conformers of mutant Cu/Zn superoxide dismutase 1 selectively expressed in degenerating neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 72:646-661, 2013.
- 7) Holmes BB, Diamond MI: Cellular mechanisms of protein aggregate propagation. *Curr Opin Neurol* 25:721-726, 2012.
- 8) Grad LI, Guest WC, Yanai A, et al.: Intermolecular transmission of superoxide dismutase 1 misfolding in living cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:16398-16403, 2011.

## Current advance of antibody therapy for amyotrophic lateral sclerosis

Makoto Urushitani

Accumulating evidence suggests that many neurodegenerative diseases were caused by the conformational abnormality of the causal proteins. Although misfolded proteins induce diverse aberrant pathways leading to neurodegeneration inside cells, recent evidence has proposed a new behavior, in which these proteins are secreted from cells and incorporated into adjacent cells, which may underlie the regional spreading in neurodegeneration. In amyotrophic lateral sclerosis, mutant superoxide dismutase 1 (SOD1) and TAR DNA-binding proteins 43kDa (TDP-43) have been documented to behave like prion proteins. Antibody is a promising tool to target only misfolded species of ALS-liked proteins in both extracellular and intracellular spaces. In particular, monoclonal antibody can yield the short chain of fragment of variance (scFv) for intrabody, as well as the use for extracellular species. Although the increasing number of publications regarding novel monoclonal antibodies against misfolded SOD1 and their application of scFv or humanization, the molecular basis how the antibodies target the misfolded SOD1 requires the further investigation. For instance, previous papers suggest that the antigen epitopes in SOD1 proteins affect the therapeutic outcomes of the immunization. In the light of emerging evidence of the seeding and spreading features of mutant SOD1 or TDP-43, increasing attentions have been paid to the antibody medicine targeting both intracellular and extracellular causal proteins in ALS.

**Key Words:** amyotrophic lateral sclerosis, protein misfolding, superoxide dismutase 1, antibody

## 16S rRNA 遺伝子クローンライブラリー解析法の臨床応用

福田和正、谷口初美

**【要旨】** 1970年代に16S rRNA 遺伝子の塩基配列による系統的な生物種分類法が提唱されてから、培養に依存しない方法を用いた細菌の検出や機能解析研究が発展してきた。われわれは、新たな病原体の発見や、病態と細菌叢の相関に関する詳細な知見を得るために、さまざまな臨床検体を対象とした16S rRNA 遺伝子クローンライブラリー法を用いた網羅的細菌叢解析を行っている。本法を起炎菌の検出が困難な症例や治療困難な症例に用いることで、通常の細菌検査で見逃されている嫌気性菌や、常在菌による混合感染、抗原検査で網羅しきれない病原菌の存在等、従来の検査法だけでは対応し切れない臨床検体における細菌（叢）の動態を明らかにした。

**Key Words:** 16S rRNA 遺伝子、クローンライブラリー法、細菌叢解析、臨床検体

### はじめに

さまざまな抗菌薬の開発により細菌感染症の多くは抗菌薬で治療可能と考えられてきたが、薬剤耐性菌等による薬剤無効例や、菌交代症のように治療行為が逆効果になるような治療困難例が顕在化している。また、医療技術の進歩により、極度に免疫抵抗力が低下した状態で生存可能な症例が増えるなかで、従来感染症起炎菌として認識されていなかった常在性、弱毒性の細菌による日和見感染、嫌気性菌感染、通性菌と嫌気性菌との混合感染などが増加している。このような症例の場合、仮に培養法で検出されたとしても常在菌か起炎菌かの区別は困難であり、起炎菌の正確な推測がむずかしい症例は今後も増加することが予想される。1970年代に16S rRNA 遺伝子の塩基配列による系統的な生物種分類法が提唱<sup>1)</sup>されてから、従来の培養による細菌検出法に加え、培養に依存しない方法を用いた細菌の検出や機能解析研究が発展してきた<sup>2,3)</sup>。特にPCRやDNA シークエンサーの発達と普及は、微生物研究においても革新的進捗をもたらし、培養方法の確立が困難な細菌の検出や、複雑な細菌叢そのものも網羅的に解析することが可能になってきた<sup>4,5)</sup>。われわれは、新たな病原体の発見や、病態と細菌叢の相関に関する詳細な知見を得るために、さまざまな臨床検体を

対象とした全菌数計測および16S rRNA 遺伝子クローンライブラリー法を用いた網羅的細菌叢解析を行っている<sup>6-15)</sup>。エチジウムブロミド (EtBr) 蛍光染色法により検体中の細菌数を正確に把握し、16S rRNA 遺伝子のクローニング後のサンガー法による高精度シーケンシングに基づく属種レベルでの解析は、検体に含まれる細菌数、菌種およびその存在割合を定量的に明らかにすることが可能である。本手法は、臨床検体を対象とした細菌叢解析に適した手法の一つと考えられる。

### 目的

産業医科大学の呼吸器内科、産婦人科、眼科等でさまざまな臨床検体に対し、培養法や抗原検索等の通常行われる細菌検査項目に加え、16S rRNA 遺伝子クローンライブラリー法を用いた網羅的細菌叢解析を行っている。細菌叢解析結果から得られた情報は、効果的な治療に役立つとともに、従来法では得られない臨床検体における細菌叢の実態について新しい知見を提供している。本稿では、それらの研究で得られた情報のいくつかを示し、従来法との違いや、網羅的細菌叢解析結果が示す臨床的な意義や利点について考察する。

## 対象・方法

### 対象

生体試料の採取、および使用に関しては、産業医科大学・倫理委員会での承認を経たあと、倫理指針に基づき執り行った。被験者には文書、口頭にて研究の説明を行い、十分に理解したことを確認したうえで文書を用いて同意を取得した。

呼吸器検体；産業医科大学・呼吸器内科および関連病院で肺炎と診断された患者の気管支洗浄液 (BALF)。産婦人科検体；産業医科大学・産婦人科で細菌性膣症と診断された患者からスワブ採取した膣分泌物。眼科検体；産業医科大学・眼科および関連施設で細菌性結膜炎と診断された患者および細菌性結膜炎ではない患者からスワブ採取した眼脂および結膜擦過物 (各臨床検体の臨床情報、および採取した検体からの試料液の調製法については引用文献 6.11.13) を参照)。

### 方法

われわれが用いている細菌叢解析手法はエチジウムブロミド (EtBr) による蛍光染色法を用いた全菌数計測、および16S rRNA遺伝子を対象としたクローンライブラリー法の2つの行程より成り立つ(図1)。

EtBr蛍光染色法による全菌数計測；

各検体から調製した試料液100  $\mu$  l を900  $\mu$  l のEtBr溶液 (100  $\mu$  g/ml in 0.1M phosphate buffer pH 8.5, 5% NaCl, 0.5mM sodium EDTA) で10分間、室温で染色処理した。染色後、0.2  $\mu$  m pore-filter (Millipore, Bedford, MA, USA) 上に菌体を濾過収集し、超純水3 mlで洗浄した。フィルターをスライドガラス上に置き、イメルジョンオイルを滴下後、カバーガラスで封入した。Olympus BX50顕微鏡 (Olympus Optical, Tokyo, Japan) で細菌数を計測し、試料液1mlあたりの細菌数を計測した。下記のDNA抽出処理のあと、残存細菌数を同様の方法で計測し、DNA抽出に伴う菌体破壊率 (%) を算出した。

$[100 - (\text{抽出後の細菌数}/\text{抽出前の細菌数}) \times 100]$

DNAの抽出精製；

DNAの抽出は、臨床検体ごとにさまざまな方法を試行して最も高い菌体破壊率を示した抽出方法を選択して行っている。おもに用いているSDSとガラスビーズを用いた抽出法を示す。試料液900  $\mu$  l に30%SDS溶液100  $\mu$  l および、ガラスビーズ (0.3 g) を加え、Micro Smash MS-100 (Tomy Seiko Co., Tokyo Japan) で4,500rpm 5分間の菌体破碎処理を

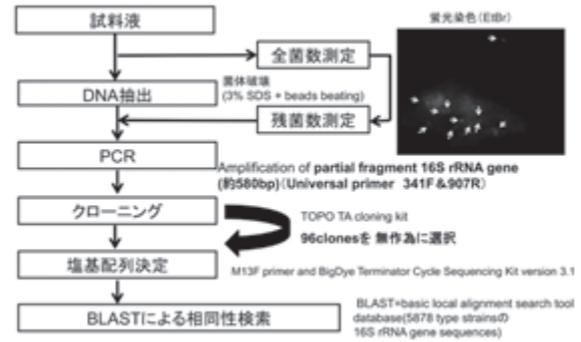


図1 クローンライブラリー法の概要

行った。菌体破碎処理後、等量のフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール (25:24:1) (PCI) で2回処理した。PCI処理後の上清をAmicon Ultra-0.5 Filter Devices (Millipore社) を用いて濃縮精製し、TEバッファー 30  $\mu$  l に置換した。

クローンライブラリーの作成および塩基配列解析；

抽出したDNAを鋳型に16S rDNA部分断片 (550bp) を、細菌用ユニバーサルプライマー (E341F 5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3', E907R 5'-CCGTC AATTCMTTTRAGTTT-3'), Amplitaq Gold LD DNA polymerase (Applied Biosystems), GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いてPCRを行った。反応条件はpreheating (96°C for 5min) 後、96°C で30秒、53°C で30秒、72°C で1分を30 cycles行い、続けて72°C で7分間の処理を行った。PCR産物をTOPO TA Cloning kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いてクローニングした。それぞれのライブラリーについて、96個のコロニーを任意に選択し、挿入された遺伝子断片をM13Forwardプライマー、BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 (Applied Biosystems) および3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を決定した。

得られた高精度塩基配列について、基準種の16S rRNA遺伝子に対して同源性検索を行い、最も同源性の高かったものを近似種とし、細菌分類階層別に集計した。

## 結果

### 呼吸器検体への応用例

呼吸器感染症は肺炎をはじめ、上気道 (咽喉頭炎、鼻炎、副鼻腔炎など)、下気道 (気管支炎、肺炎、肺化膿症)、胸膜感染症 (感染性胸膜炎、膿胸) と



図2 クローンライブラリー法による解析結果（嫌気性常在菌による肺炎）

各クローンの塩基配列の相同性から推定される菌種を各階層別に集計することで、検体に含まれる菌種と割合がわかる。クローンライブラリー解析の結果、*Leptotrichia*属が優占していることが明らかになった。(文献<sup>6)</sup>より一部改変)

多岐にわたる。起炎菌の検索には、経験的な推測に基づいて培養検査等が用いられるが、肺炎や細菌性胸膜炎・膿胸等の約半数近くの症例で起炎菌未同定のまま経験的治療が施されている。病巣に存在する菌（菌群）の動態を正確に把握する目的で、治療困難例の吸引痰、気管支洗浄液、胸水などを用い、細菌叢解析を行っている。

嫌気性常在菌による肺炎症例；

生来健康な70代男性、発熱、咳嗽、呼吸困難で入院。BALF（気管支洗浄液）のグラム染色にて多数のグラム陰性大桿菌、少数のグラム陽性および陰性球菌が認められたが、培養では腸球菌のみ検出。BALFの細菌叢解析から、*Leptotrichia*属が最優占菌（48%）であることが明らかになった<sup>6)</sup>。ほかにも *Veillonella*属、*Prevotella*属など嫌気性菌が約30%を占め、染色像ともよく一致したので *Leptotrichia*属を中心とした嫌気性常在菌による混合感染と判断した（図2）。治療薬を嫌気性菌対応に変更し治癒。

血清型8のレジオネラ肺炎症例；

60代男性、骨髄異形成症候群定期受診の際、発熱、強い呼吸困難を認め、急性呼吸不全の診断で同日入院。同日、人工呼吸器管理となった。塗抹染色、培養、尿中抗原、血清学診断等を行ったが、明らかな起炎菌は検出されなかった。BALFの細菌叢解析から、*Legionella pneumophila* が55%を占めた。この結果を基にニューキノロン抗菌薬治療を行い救命に成功した<sup>7)</sup>。その後、レジオネラ選択培地を用いた

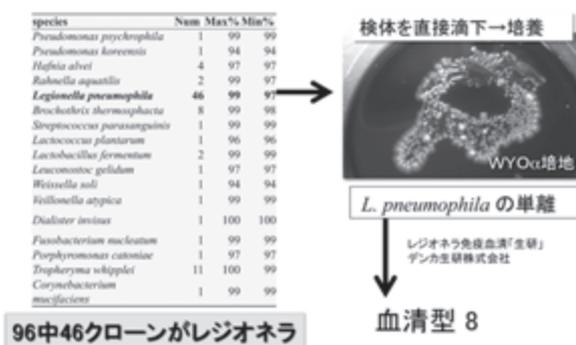


図3 呼吸器検体の解析例（尿中抗原検査陰性のレジオネラ肺炎）

気管支洗浄液（BALF）のクローンライブラリー解析の結果、*Legionella pneumophila*が優占していることが明らかになった。この結果を基にレジオネラを培養法で検出した。培養で得られた菌は血清型8の*L.pneumophila*であった。(文献<sup>7)</sup>より一部改変)

培養の結果、*L. pneumophila*が検出された。この菌の血清型は8であり、臨床現場で用いられる尿中レジオネラ抗原検査（栄研化学）では検出できない血清型であることが判明した（図3）。

提示した症例以外にも、市中肺炎（community-acquired pneumonia）の起炎菌解析に本法を応用し<sup>9)</sup>、従来法では起炎菌が特定できなかった症例の大部分が嫌気性常在菌や、口腔内細菌を原因とする症例であることなどを明らかにしている（図4）。現在も継続的に研究レベルでの呼吸器疾患と細菌叢の相関解析を進めている。

産婦人科検体への応用

細菌性膣症は、非特異性膣炎と呼ばれ、病原体を特定できない膣炎であった<sup>16)</sup>。その後、培養法による膣内細菌叢解析により、嫌気性菌を中心とした細菌感染症であることが明らかになった。膣に常在する *Lactobacillus*属は膣内環境の正常度合いの指標としてLac grade法<sup>17)</sup> やNugent score法<sup>18)</sup> の対象菌種として用いられてきた。Lac grade法で正常群（6検体）、中間群（11検体）、および細菌性膣症群（BV群）（14検体）に分類した31検体を対象とし、従来法および本クローンライブラリー法を用いた細菌叢解析を行った。その結果、培養法では平均で正常群；2.7、中間群；2.4、およびBV群3.0菌種が検出されたが、クローンライブラリー法では各群平均で1.2、5.5、および8.9菌種が検出され、培養法による解析よりも多様な細菌種を検出することが可能であっ

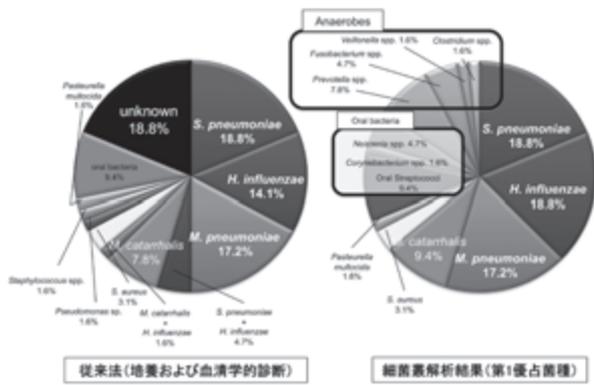


図4 市中肺炎症例の起炎菌検索（従来法とクローンライブラリー法の比較）

市中肺炎患者のBALF検体（総計64検体）を用い、培養法および血清学的診断に基づく起炎菌推定結果とクローンライブラリー法で得られた解析結果（第一優占菌種）を比較した。従来法では18.8%の検体において起炎菌の推定ができなかったが、クローンライブラリー法では、全例で解析結果が得られ、既知の原因菌に加え、嫌気性菌16.9%、口腔細菌15.7%が検出された。（文献<sup>9</sup>より一部改変）

また、クローンライブラリー法では、*Lactobacillus*属のなかでも*L. crispatus*は健常女性の膣にのみ優占菌種として検出されたが、中間群および細菌性膣症群には、*L. iners*や*L. gasseri*が検出された。このことから、*Lactobacillus*属の検出だけでは膣内環境評価の正確な指標になりえないことが示唆された。また、さらに、培養検出が困難な*Atopobium*属、*Veilonella*属等の嫌気性菌の膣細菌叢における相対的な存在割合を明らかにすることができた<sup>10,11</sup>。本結果は、細菌性膣症の診断基準に影響を及ぼすのみならず、細菌性膣症の原因や疾患の成立過程の解明に貢献できると考えられる。

#### 眼科検体への応用

細菌性結膜炎は一般的かつ予後良好な疾患で低年齢層と高齢層に多い。起炎菌の同定には従来、臨床所見、眼脂・結膜擦過物の塗抹検査、眼脂・結膜擦過物の培養検査が用いられている。しかし、細菌性結膜炎と正常結膜囊の検体における細菌の検出率は同程度であり、しかも、検出される菌種が類似していることから、従来の検査で真の起炎菌を同定することは困難である<sup>19</sup>。この状況下で、広域抗菌スペクトルを有する点眼抗菌薬が頻用され、眼科領域の感染性疾患において、薬剤耐性菌の増加が問題となっている<sup>20</sup>。細菌性結膜炎の起炎菌を精査するため、本クローンライブラリー法を用いて細菌性結膜

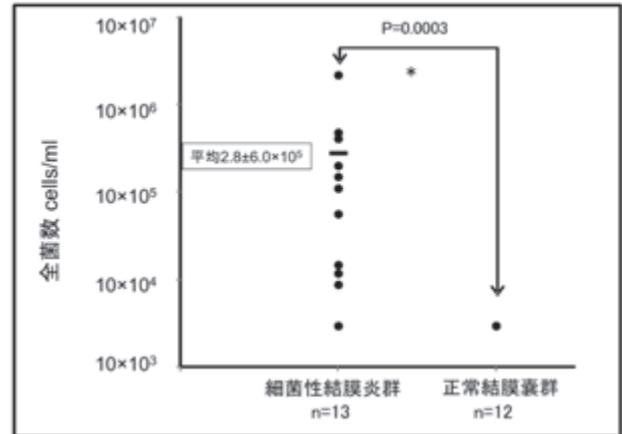


図5 細菌性結膜炎と正常結膜嚢の全菌数の比較

細菌性結膜炎群と正常結膜嚢群のエチジウムブロミド (EtBr) 蛍光染色法による全菌数計測結果を比較した。細菌性結膜炎群の菌数は正常結膜嚢群より有為に多いことが明らかになった。P値はMann-Whitney's U testで求めた。（文献<sup>13</sup>より一部改変）

炎と正常結膜嚢の細菌叢について解析を行った<sup>13</sup>。菌数計測の結果、細菌性結膜炎群（n=13）では平均 $2.8 \times 10^5$  cells/mlの菌が検出されたが、正常結膜嚢群（n=12）ではすべて検出限界以下（ $\leq 3.0 \times 10^3$  cells/ml）の菌数であった（図5）。また、ユニバーサルプライマーを用いたPCRでは細菌性結膜炎（13例中10例）でのみ増幅が認められ、正常結膜嚢群すべてにおいてPCR増幅産物は検出できなかった。この結果から細菌性結膜炎と正常結膜嚢では有為に菌数が異なることが明らかになった。一方、培養法では正常結膜嚢からも細菌が検出され（12例中5例）、そのうち4例で*Corynebacterium macginleyi*が検出された。*C. macginleyi*は眼の常在細菌として知られており、なおかつ細菌性結膜炎の起炎菌としても報告されている<sup>20</sup>。クローンライブラリー法による細菌叢解析でも細菌性結膜炎群から*Haemophilus*属や*Staphylococcus*属等の細菌性結膜炎の起炎菌に加え、*C. macginleyi*が10例中5例で検出された。また、細菌叢解析結果に基づく検出菌種の多様性から、細菌性結膜炎の約半数は混合感染であることが明らかになった<sup>6</sup>。以上の結果から、細菌性結膜炎における常在菌と起炎菌の識別に菌数計測結果と細菌叢解析の組み合わせは有用であると考えられた。

#### 考察

本法の利点として、培養法やほかの網羅的解析と比して短時間（約2日間）で結果が得られること、培養困難な菌種でも検出可能であること、ある菌種

が全体に占める割合を定量的に知ることができること等があげられる。呼吸器検体の*Leptotrichia*属を中心とした嫌気性常在菌による混合感染例<sup>6)</sup>のような嫌気性菌群の混合感染の場合、嫌気培養で検体に含まれるすべての菌種を検出することはもとより、得られた結果の解釈は非常に困難であると予想される。優占する起炎菌種以外に、多数の菌が同時に生息している場合の解釈において、細菌叢における各菌種の相対的な割合は主たる起炎菌の推測にきわめて有用である。このことは嫌気性菌主体の細菌叢が一般的である膣関連疾患の解析においても明らかであった<sup>10,11)</sup>。一方で、死菌でも検出されること、起炎菌が推定できても薬剤感受性試験ができないことなどが欠点としてあげられる。死菌が検出されることに関しては、死菌とVNC (viable but nonculturable) 状態のために培養不能になっている菌の区別が困難である。しかし、抗菌薬がすでに投与され、本来ならば培養法で容易に検出されるはずの菌が検出されず、クローンライブラリー法で検出された場合は、患者情報を含めた総合的な医師の判断で投薬を続け、治療に成功した症例もあった。つまり、死菌であったとしても、治療前もしくは治療中に検体に存在した証拠として、起炎菌の推定やその後の治療方針に役立つ情報であることに疑いの余地はない。また、眼のような元来菌数が少ない部位の検体の解析において、蛍光染色法による菌数計測結果は細菌感染症か否か、若しくは起炎菌と常在菌の判断にきわめて有用であることも明らかになった<sup>13)</sup>。

本法は起炎菌の予測を必要としないため、臨床経験に依存することなく有用な情報を提供できる検査手法といえる。しかし、遺伝子解析は、感染症や従来の微生物同定法を知らなくても、それらしい結果が出るものでもある。病態のなかで起こっている事実を反映した結果を手に行っているかどうかは、手法の精度検証と評価能力に依存する。PCRに用いるプライマーの種類によっては増幅バイアスが生じること(増幅バイアスはおもに、プライマー配列に特定の細菌種に対してミスマッチがある場合に顕著である)、また、試料中の細菌数が少ない場合、水や試薬に混入した微量の細菌由来DNAを検出してしまう可能性があることなどを十分理解したうえで使用する必用が有る。起炎菌の検出・同定においては、臨床医との密な情報交換や従来行われてきた細菌検査手法等(塗抹染色や培養等)の結果を踏まえて判断することが最も重要である。レジオネラ肺炎症例<sup>7)</sup>の場合、細菌叢解析結果を基にレジオネラをターゲ

ットとした培養で血清型8の*L. pneumophila*を単離できたことで尿中抗原検査レジオネラ陰性であった理由が明らかになった(尿中抗原検査では血清型1のみ陽性になる)。培養法にも遺伝子工学的手法では網羅できない利点があり、双方を組み合わせた検査が今後ともに有用であることも確かである。

クローンライブラリー法を用いた臨床検体の解析を行うなかで、感染症の起炎菌の検索において、従来の検査法、病原菌同定の考え方だけでは対応し切れない複雑な感染巣の実態があることが明らかとなった。本法で得られた知見は、起炎菌を正確に把握し、適切な治療に供することのみならず、解析例の蓄積により、慢性、難治性疾患等の原因解明および新規治療法の考案にも貢献できると考えられる。

## 文献

- 1) Woese CR, Fox GE : Phylogentic structure of prokaryotic domainprimary kingdoms. Proc Natl Acad Sci USA 74 : 5088-5090, 1977.
- 2) Pace NR, Stahl DA, Lane DJ, et al.: Analyzing natural microbial populations by rRNA sequences. ASM News 51:4-12, 1985.
- 3) Ashelford KE, Chuzhanova NA, Fry JC, et al.: At least 1 in 20 16S rRNA sequence records currently held in public repositories is estimated to contain substantial anomalies. Appl Environ Microbiol 71:7724-7736, 2005.
- 4) Zoetendal EG, Collier CT, Koike S, et al.: Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: J Nutr 134:465-472, 2004.
- 5) Mardis ER : The impact of next-generation sequencing technology on genetics. Trends Genet 24: 133-141, 2008.
- 6) Kawanami T, Fukuda K, Yatera K, et al.: A case of severe pneumonia with *Leptotrichia sp.* detected predominantly in BALF using 16S rRNA gene sequencing analysis: J Clin Microbiol 47: 496-498. 2009.
- 7) Kawanami T, Yatera K, Fukuda K, et al.: Diagnosis of fulminant pneumonia caused by *Legionella pneumophila* serogroup 8 with the sequence analysis of 16S rRNA gene. Tohoku J Exp Med 225: 65-69, 2011.
- 8) Kawanami T, Fukuda K, Yatera K, et al.: A Higher Significance of Anaerobes (The Clone Library Analysis of Bacterial Pleurisy). CHEST

- 139 (3) :600-608, 2011.
- 9) Yamasaki K, Kawanami T, Yatera K, et al.: Significance of anaerobes and oral bacteria in community-acquired pneumonia. *PLoS ONE* 8: e63103, 2013.
- 10) 吉村和晃、諸富伸夫、福田和正、ほか：細菌性膿症の新知見、化学療法の領域、化学療法研究会、第26巻11号、医学ジャーナル社、大阪、2011、pp43-49.
- 11) Yoshimura K, Morotomi N, Fukuda K, et al.: Intravaginal microbial flora by the 16S rRNA gene sequencing. *Am J Obstet Gynecol* 205: 235.e1-9, 2011.
- 12) Shiraishi T, Fukuda K, Morotomi N, et al.: Influence of menstruation on microbiota of healthy Japanese women's labia minora analyzed using the clone library method based on the 16S rRNA gene. *Jpn J Infect Dis* 64:76-80, 2011.
- 13) Aoki R, Fukuda K, Ogawa M, et al.: Identification of causative pathogens in eyes with bacterial conjunctivitis by bacterial cell count and microbiota analysis. *Ophthalmology* 120: 668-676, 2013.
- 14) Morotomi N, Fukuda K, Nakano M, et al.: Evaluation of intestinal microbiotas of healthy Japanese adults and effect of antibiotics using the 16S rRNA gene based clone library method. *Biol Pharm Bull* 34 (7) : 1011-1020, 2011.
- 15) Akiyama T, Miyamoto H, Fukuda K, et al.: Development of a novel PCR method to comprehensively analyze salivary bacterial flora and its application to patients with odontogenic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 109: 669-676, 2010.
- 16) Holmes KK, Spiegel C, Amsel AR, et al.: Nonspecific vaginosis. *Scand J Infect Dis Suppl* 26: 110-114, 1981.
- 17) Donders G, Vereecken A, Dekeersmaecker A, et al.: Wet mount microscopy reflects functional vaginal lactobacillary flora better than Gram stain. *J Clin Microbiol* 53: 308-313, 2000.
- 18) Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL: Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *J Clin Microbiol* 29: 297-301, 1991.
- 19) Perkins RE, Kundsinn RB, Pratt MV, et al.: Bacteriology of normal and infected conjunctiva. *J Clin Microbiol* 1: 147-149, 1975.
- 20) Eguchi H, Kuwahara T, Miyamoto T, et al.: High-level fluoroquinolone resistance in ophthalmic clinical isolates belonging to the species *Corynebacterium macginleyi*. *J Clin Microbiol* 46: 527-532, 2008.

## Clinical studies using a clone library analysis based on 16S rRNA gene sequence

Kazumasa Fukuda, Hatsumi Taniguchi

Culture-independent methods to detect microorganisms have been developed in parallel with traditional culture based methods ever since the classification of living organisms with the analysis of small rRNA gene sequences were advocated about 3 decades ago. Notably, the development and the prevalence of PCR and DNA sequencing technologies brought the researcher splendid innovation for microbial study. The technology significantly contributes also to the research of microorganisms that cannot be detected by culture-methods. In order to attain detailed information regarding the correlation of symptoms and the microbiota, we analyzed bacterial communities using the 16S rRNA gene clone library method for various clinical specimens from respiratory diseases, vaginal diseases, and eye diseases. The number of bacterial cells and the bacterial composition in the samples are quantitatively evaluated by this culture-independent method. Based on the results obtained from the various clinical studies, we attempted to uncover the clinical importance of applying the clone library method to clinical samples. In the studies of bacterial pneumonia specimens, the clinical significance of the anaerobe, which is difficult to detect with routine culture-methods, were displayed. We also diagnosed a case of fulminant pneumonia, caused by *Legionella pneumophila serogroup 8*, which was undetectable by a urinary antigen test. In addition, it was strongly suggested that anaerobes and oral bacteria play more important roles in community-acquired pneumonia than previously believed. In a study of bacterial vaginosis specimens, we clarified the significance of the relative ratio of *Lactobacillus* spp., *Atopobium vaginae*, and anaerobes in the bacterial community of vaginosis. Moreover, in bacterial conjunctivitis, it was revealed that indigenous bacteria are often causative-agents. It was also suggested that the number of bacteria and the constitution ratio in the microbiota are important for the diagnosis of bacterial conjunctivitis. Our results, obtained in the process of the microbiota analyses against various types of clinical specimens, revealed that there were many clinical cases with high heterogeneous infections, which are difficult to uncover only by conventional methods. Conventional methods, such as culture methods and detection of urinary antigens, still play an important role in diagnosis and treatment of bacterial infectious diseases. However, it is strongly suggested that the clone library method be used in combination with conventional methods not only as a useful tool for more accurate diagnosis but also as a way to discover more appropriate treatment.

**Key Words:** 16S rRNA gene, clone library method, microbiome analysis, clinical specimen

## IRAK4欠損症

高田 英俊

【要旨】 Interleukin-1 receptor-associated kinase-4 (IRAK4) 欠損症は、グラム陽性菌に対する易感染性が注目されていたが、近年では緑膿菌などのグラム陰性菌にも易感染性を呈することが明らかになっている。乳幼児期に、肺炎球菌による化膿性髄膜炎などのinvasive bacterial infectionで死亡することも多いが、早期診断ができれば、感染予防が可能である。国内症例では、臍帯脱落遅延を呈することが多いことも明らかになってきており、診断の参考になると考えられる。

**Key Words:** Toll様レセプター、原発性免疫不全症候群、自然免疫不全症

### はじめに

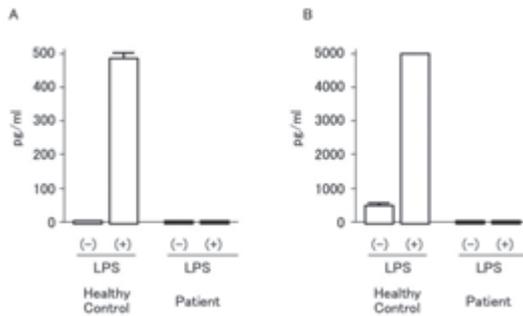
原発性免疫不全症候群は、遺伝的な要因によって、自然免疫 (innate immunity) や獲得免疫 (acquired immunity) などの生体防御機構のいずれかが障害された疾患群である。300種類程度の疾患が報告されるようになった。Toll-like receptor (TLR) などの自然免疫に関与する分子機構の異常が、生体防御機構にどのような影響を与えるのか次第に明らかになり、原発性免疫不全症候群の1カテゴリーとして分類されるようになった。2014年のIUIS (International Union of Immunological Societies) の分類によると、自然免疫不全症として11疾患が分類され、それらの責任遺伝子として22遺伝子が同定されている<sup>1)</sup>。

自然免疫は、好中球、マクロファージ、樹状細胞、NK細胞等によって担われる早期の生体防御機構であり、病原体に特異的な分子パターンを認識するレセプター (pattern recognition receptor: PRR) によってこれらの細胞内にシグナルが伝達される。Toll-like receptor (TLR) は、PRRの代表的存在であり、自然免疫のなかで重要な位置を占めている。TLRからのシグナル伝達経路はTLRの種類によって異なり、MyD88依存的経路とTRIF依存的経路の2つがある。MyD88依存的経路では、TLRがリガンドを認識すると、MyD88のTIRドメインがTLRに会合する。その際、MyD88の6量体に対して、

IRAK4の4分子がMyD88のdeath domainに結合し、さらにこれにIRAK1またはIRAK2が4分子結合することによって、いわゆるMyddosomeといわれるシグナル複合体が形成され、シグナルが伝達される。IRAK4とMyD88のいずれの欠損においても、このシグナル経路の障害をきたすことになる。IRAK4やMyD88は、IL-1やIL-18のシグナル伝達にも関与している。

Interleukin-1 receptor-associated kinase-4 (IRAK4) は、Wescheら<sup>2)</sup> が2002年にIRAKファミリー分子として新たに同定した分子である。同年、鈴木ら<sup>3)</sup> はIRAK4欠損マウスの表現型を報告し、種々のToll-like receptorからのシグナル伝達やIL-1 receptorからのシグナル伝達が著しく障害されることを報告した。この結果をもとに、ヒトにおけるIRAK4欠損症が初めて報告され、グラム陽性球菌、特に肺炎球菌に対する易感染性がみられること、肺炎球菌による化膿性髄膜炎で死亡する例が少なくなること、加齢に伴って易感染性が軽減していくこと、各種のTLR ligandやIL-1に対する反応性が欠損することなどが示された<sup>4)</sup>。2008年に、同じくTLRからのシグナル伝達に関与するMyD88欠損症が報告された。いずれも常染色体劣性遺伝形式をとり、臨床像もほとんど同じであることが明らかになってきた<sup>5)</sup>。その後、国内外のIRAK4欠損症の報告数が増えるにつれ<sup>6)</sup>、その臨床像が詳細に明らかになっている。

国内外の31家系48人のIRAK4欠損症とMyD88欠

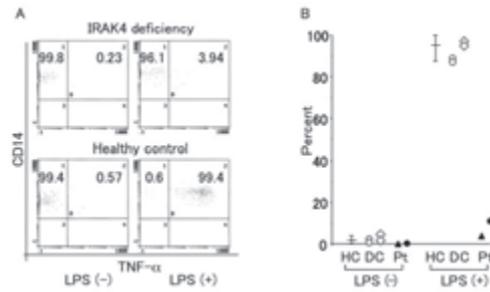


**図1** LPS刺激後の末梢血単核球のサイトカイン産生能  
末梢血単核球をLPS (0.1  $\mu$ g/ml) 存在下に24時間培養し、培養上清におけるTNF- $\alpha$  (A)、IL-6 (B) 濃度をELISA法で測定した。IRAK4欠損症患者ではLPS刺激によるサイトカイン産生が認められない。

損症の臨床像の解析結果<sup>7)</sup>によると、IRAK4欠損症患者における感染症の種類は、髄膜炎、敗血症、関節炎、骨髄炎など、Invasive bacterial infection (本来無菌状態である臓器や組織への感染症)が多く、乳幼児期に発症するこれらの重症感染症が予後を左右する。起炎菌はこれまで報告されていたように肺炎球菌やブドウ球菌が多いが、緑膿菌や連鎖球菌、それ以外のグラム陰性菌も起炎菌になることは注目すべき点である。化膿性髄膜炎などの重症感染症が急速に進行して死亡した患者の経過からIRAK4欠損症やMyD88欠損症が初めて疑われることもある。IRAK4欠損症やMyD88欠損症患者では、細菌感染症の初期には、白血球数やCRPの上昇が乏しい場合があるので注意が必要である。免疫能の一般的検査では、特異的な異常を示さない。血清免疫グロブリン値、好中球機能などは正常であるとされている。国内の症例、国外の症例とも約50%の患者が重症感染症で乳幼児期に死亡している。感染症発症早期から適切な治療をしても改善がみられないまま進行し死亡している例があるのも事実である。次第に易感染性がなくなっていくことがこの疾患の特徴であり、14歳以降は感染予防がなくても重症感染症はみられないと報告されている。

### IRAK4欠損症の迅速スクリーニング法

IRAK4欠損症と診断された場合、予防的抗生剤内服、肺炎球菌ワクチンの接種による感染症予防を行うことにより、重症感染症を予防することが可能である。乳幼児期の重症感染症の発症を回避できれば、次第に易感染性が軽減していくので、この疾患では、早期診断がきわめて重要であるといえる。IRAK4欠損症の確定診断は遺伝子診断であるが、



**図2** IRAK4欠損症の迅速診断法

末梢血全血をLPS (1  $\mu$ g/ml) 存在下に4時間培養し、単球 (CD14陽性) 内TNF- $\alpha$ 産生能を検討した。

A: 具体的に、IRAK4欠損症患者1名 (上段)、健常者1名 (下段) の結果を示したものの。

B: 結果のまとめ。HC: 健常者、DC: 疾患コントロール (高IgE症候群)、Pt: IRAK4欠損症患者。健常者や疾患コントロールではLPS刺激後、90%以上の単球でTNF- $\alpha$ 産生が認められるが、IRAK4欠損症患者ではTNF- $\alpha$ 産生がほとんど認められない。

より迅速に診断できる方法の確立が必要であるといえる。

IRAK4欠損症患者末梢血単核球を、Lipopolysaccharide (LPS) 存在下に24時間培養すると、健常者では培養上清中にTNF- $\alpha$ やIL-6の産生がみられるが、IRAK4欠損症患者では、LPSのレセプターとなるTLR4からのシグナル伝達が障害されるために、これらのサイトカイン産生が認められなかった (図1)。これらの結果をもとに、われわれは、IRAK4欠損症の迅速診断法を開発した。末梢血全血にLPSを加え、37°で4時間刺激し、単球内TNF- $\alpha$ 産生能をフローサイトメータで測定すると、健常者ではほとんどの単球にTNF- $\alpha$ 産生が確認されたが、IRAK4欠損症患者では認められなかった (図2)<sup>6)</sup>。

### IRAK4欠損症の国内症例の特徴

この迅速診断法などを活用して、invasive bacterial infectionを起こした多くの乳幼児についてIRAK4欠損の有無を検討してきた。その結果、これまでに国内で、5家系8名の患者を同定した (表1)。8名中4名が乳幼児期に死亡しており、乳幼児期の重症感染症の予防の重要性は明らかである。家系1は、第1子が肺炎球菌性髄膜炎で死亡したことから、第2子、第3子について解析を行い、IRAK4であることが確認されたため、感染予防により生存している。われわれは、IRAK4欠損症患者が臍帯脱落遅延を示すことをすでに報告しているが、この8

表 1 国内の IRAK4 欠損症患者の臨床像のまとめ

家系	患者	臨床像	転機	臍帯脱落(生後)
1 (同胞 3 人)	1.	肺炎球菌による化膿性髄膜炎 2 回	死亡 (2 歳)	39 日
	2.	感染予防中	生存	37 日
	3.	感染予防中	生存	20 日
2 (同胞 2 人)	4.	肺炎球菌による化膿性髄膜炎 2 回	生存	26 日
3 (同胞 2 人)	5.	黄色ブドウ球菌による皮下膿瘍 肺炎球菌による化膿性髄膜炎	死亡 (11 ヶ月)	14 日
4 (同胞 4 人)	6.	緑膿菌による肝膿瘍・腹腔内膿瘍 肺炎球菌による化膿性髄膜炎	死亡 (3 歳)	31 日
	7.	緑膿菌による壊死性筋膜炎敗血症	死亡 (9 ヶ月)	21 日
5 (同胞なし)	8.	緑膿菌、腸球菌による臍炎 黄色ブドウ球菌による皮下膿瘍 B 群溶連菌による化膿性髄膜炎 肺炎球菌による化膿性髄膜炎	生存	21 日

名の患者のなかでも多くの患者で臍帯脱落遅延がみられる。臍帯脱落時期は個人差が大きく、白血球粘着不全症などの原発性免疫不全症候群を疑う際には、生後21日以降に臍帯脱落がみられた場合、異常であると考えべきとされているが、健康新生児のほとんどが一週間以内に臍帯脱落が起こることを考慮すれば、IRAK4欠損症患者では明らかに臍帯脱落が遅延すると考えてよいだろう。

なお、これまでMyD88欠損症患者は国内ではまだ同定されていない。

### まとめ

IRAK4欠損症は、次第に易感染性がなくなっていくことがこの疾患の特徴であり、14歳以降は感染予防がなくても重症感染症はみられないと報告されている。他方、IRAK4欠損症患者のなかには、乳幼児期に突然invasive bacterial infectionを発症し、感染症発症早期から適切な治療をしても改善がみられないまま進行し死亡している例があるのも事実である。その場合は、死亡後にIRAK4欠損症が疑われ、遺伝子検査で確定されるということになり、このような患者をどのように今後早期に診断していくかが重要な課題である。臍帯脱落遅延は新生児期にIRAK4欠損症を疑う重要なサインであろう。

### 文献

- 1) Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, et al.: Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the international union of immunological societies expert committee for primary immunodeficiency. *Frontiers in immunology* 5:162, 2014.
- 2) Li S, Strelow A, Fontana EJ, Wesche H: IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:5567-5572, 2002.
- 3) Suzuki N, Suzuki S, Millar DG, et al.: A critical role for the innate immune signaling molecule IRAK-4 in T cell activation. *Science* 311:1927-1932, 2006.
- 4) Picard C, Puel A, Bonnet M, et al.: Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency. *Science* 299:2076-2079, 2003.
- 5) von Bernuth H, Picard C, Jin Z, et al.: Pyogenic bacterial infections in humans with MyD88 deficiency. *Science* 321:691-696, 2008.
- 6) Takada H, Yoshikawa H, Imaizumi M, et al.: Delayed separation of the umbilical cord in two siblings with Interleukin-1 receptor-associated kinase 4 deficiency: rapid screening by flow cytometer. *The Journal of pediatrics* 148:546-548, 2006.
- 7) Picard C, von Bernuth H, Ghandil P, et al.: Clinical features and outcome of patients with IRAK-4 and MyD88 deficiency. *Medicine* 89:403-254, 2010.

## IRAK4 deficiency

Hidetoshi Takada

Human autosomal recessive IRAK-4 deficiency leads to impaired TLR responses in leucocytes and were recently identified as a cause of invasive bacterial infections in childhood. We established a fast screening method for IRAK-4 deficiency by flow cytometric analysis of intracellular TNF- $\alpha$  production of monocytes in response to lipopolysaccharide. Delayed separation of umbilical cord may be an important clinical sign of IRAK4 deficiency in Japan.

**Key Words:** Toll-like receptor, primary immunodeficiency, defect of innate immunity

## TLR3遺伝子のLRRドメインに変異を認めた インフルエンザ脳症の考察

日高文郎

**【要旨】** インフルエンザ脳症は発熱後数時間から数日以内に急速な神経障害をきたす。そのメカニズムはいまだ解明されていないが、高サイトカイン血症がかかわっていると考えられている。

われわれは本疾患が発熱後急激に発症すること、日本を含めた東アジアに多いことからなんらかの遺伝的背景があるものと考え、自然免疫系の異常を疑い検討を行ったところ10例中1例にTLR3遺伝子のミスセンス変異 (F303S) を認めた。この変異によりTLR3の機能異常をきたし、侵入したインフルエンザウイルスの一過性の増殖を認めたと推測した。急速に増殖したウイルスに対する二次的反応により急激な高サイトカイン血症をきたし脳症発症にいたるのではないかと考えた。

**Key Words** : 自然免疫、インフルエンザ脳症、ミスセンス変異、Toll様受容体、RNAウイルス

### はじめに

インフルエンザは飛沫感染により伝播する罹患率の高い感染症である。流行の規模やピークの時期はその年によって違うが、毎年11月ごろから流行が始まり4～5月にかけて減少していく<sup>1)</sup>。発熱、頭痛、関節痛や全身倦怠感などの全身症状に加え、呼吸器症状や消化器症状を伴うこともある。多くは約1週間で回復するが、ときにさまざまな合併症を認めることがある<sup>2,3)</sup>。インフルエンザ脳症はインフルエンザ合併症のなかで最も重篤である。5歳以下の乳幼児に多く、年間100～数百例発症していると推定される<sup>4)</sup>。発熱後数時間から数日以内に急速な神経障害をきたす。近年、治療法の確立により死亡率は8～9%に減少した<sup>5)</sup>。しかし後遺症を残す頻度は約25%と変化なく、依然として予後不良な疾患である。そのメカニズムはいまだ解明されていないが、高サイトカイン血症がかかわっていると考えられている<sup>6,8)</sup>。

Toll様受容体 (Toll-like receptor; TLR) は自然免疫系において重要な役割を演じている。細菌、ウイルスなどの病原体の特徴的な構造パターンを認識し感染防御に働く<sup>9)</sup>。細胞外領域には病原体の認識にかかわるロイシンリッチリピート (Leucine-rich repeat; LRR) が存在する<sup>10)</sup>。TLR2はグラム陽性菌

由来のペプチドグリカン、TLR4はグラム陰性菌由来のリポポリサッカライド、TLR3は二本鎖RNAやインフルエンザウイルスを認識する<sup>11)</sup> というようにTLRの種類によって特異的に認識する。

われわれはインフルエンザ脳症が発熱後1～2日で急激に発症すること、日本を含めた東アジアに多いこと<sup>12,14)</sup> からなんらかの遺伝的背景があるものと考え、特に早期免疫反応に重要な自然免疫系の異常を疑い以下の検討を行った。

### 方法

インフルエンザウイルスは8分節からなるマイナス鎖のRNAウイルスで宿主細胞のエンドソームにあるTLR3、7、8、9や細胞内RNA受容体であるRIG-I、MDA5などで認識されると考えられている。われわれは経験したインフルエンザ脳症10例についてインフルエンザウイルスの認識にかかわると思われるTLR3、TLR7、TLR8およびRIG-I遺伝子の解析を行った。機能解析実験には、TLRが発現していないが必要なシグナル伝達系をもつHEK293細胞を使用し、野生型と変異体TLR3を発現させてルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。

表1 入院時現症および検査成績

<b>&lt;身体所見&gt;</b>	
意識レベル	JCS III-200~300 体温 39.7°C
脈拍	160回/分 SpO2 61%
胸部	呼吸音清、腹部 平坦、軟 瞳孔 対光反射迅速(両側)
<b>&lt;検査成績&gt;</b>	
<b>&lt;CBC&gt;</b> WBC 4200 / $\mu$ l, Hb 10.2 g/dl, Ht 31.0%, Plt 17.7x10 <sup>4</sup> / $\mu$ l	
<b>&lt;Blood Chemistry&gt;</b> TP 6.04 g/dl, T-Bil 0.4 mg/dl, AST 29 IU/L, ALT 14 IU/L, LDH 243 IU/L, BUN 10.8 mg/dl, Cre 0.4 mg/dl, CK 93 IU/L, Na 128 mEq/L, K 3.3 mEq/L, Cl 99 mEq/L, NH <sub>3</sub> 52 mg/dl, CRP 2.2 mg/dl	
<b>&lt;Coagulation&gt;</b> AT-III 90%, PLG 68%, FIB 206 mg/dl, DD 1.76 mg/ml, PTsec 14.2, PT% 61.0	
<b>&lt;BGA&gt;</b> vein O <sub>2</sub> 5L/min. pH 7.232, pCO <sub>2</sub> 48.6 mmHg, pO <sub>2</sub> 128.2 mmHg, HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> 19.7 mmol/L, BE -7.5 mmol/L	

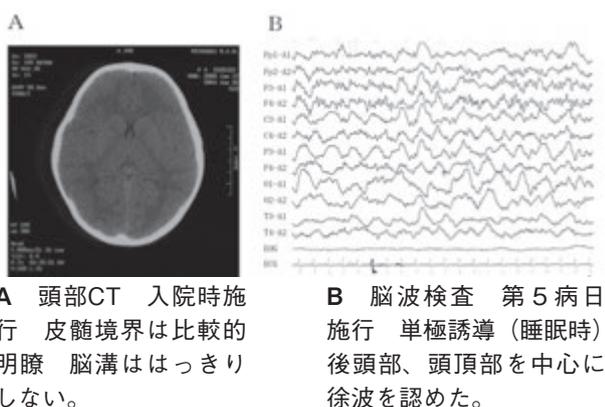


図1 頭部CTと脳波検査

## 症例

4歳女児

主訴：発熱、ケイレン重積。

妊娠・分娩歴：在胎39週0日、出生児体重 3,520g、帝王切開で出生。

既往歴：先天性甲状腺機能低下症。

現病歴：前夜より発熱（39度台）あり宮崎大学小児科外来受診した。同科受診時体温39.7度、意識清明、迅速テストにてインフルエンザA陽性よりインフルエンザと診断し抗ウイルス剤を処方された。数時間後、嘔吐、全身性強直間代性ケイレン（上肢間代、下肢強直、眼球上転不安定）、全身チアノーゼ、呼吸不整が出現したため同院再診した。抗ケイレン剤投与でケイレンは頓挫したが呼吸抑制が持続した。アンビューマスクを使用しながら酸素投与を行ったが30分以上呼吸抑制が続いたため頭部CTを施行したところ、脳浮腫を疑わせる所見を認めた。この時点ではインフルエンザ脳症疑いとして入院、ICU管

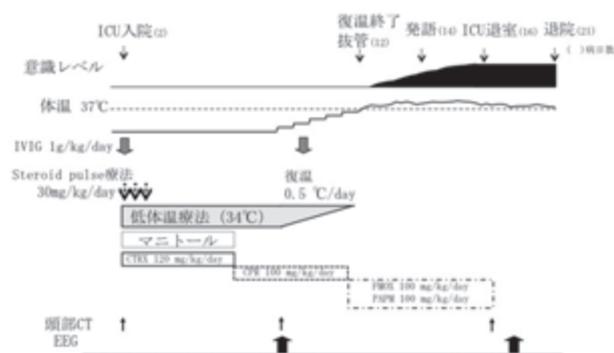


図2 入院後経過

理となった。

入院時現症および検査成績（表1）：意識障害あり（JCS 200以上）、体温39.7度、脈拍160回/分、SpO<sub>2</sub> 61%、瞳孔の対光反射は両側ともに迅速であった。白血球数4200/ $\mu$ lであったが、CRP 2.2mg/dlと軽度上昇していた。BUN、Cre、CK、アンモニアの上昇を認めなかったが、Na 128 mEq/Lと低下していた。Dダイマー上昇、PT軽度延長を認めた。入院時頭部CT（図1A）では皮髄境界は比較的明瞭だが脳溝ははっきりせず、脳浮腫を示唆する所見を認めた。

入院後経過（図2）：インフルエンザ脳症の治療指針<sup>5)</sup>に従い、低体温療法、ステロイドパルス療法、ガンマグロブリン大量療法（IVIg）を行った。脳浮腫に対しマンニトール投与、またこの時点では化膿性髄膜炎を完全に否定できなかったためCTR<sub>X</sub>を投与した。第5病日、頭部CTで脳浮腫の改善傾向を

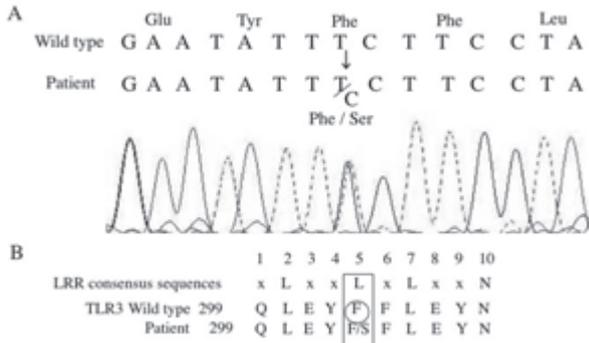


図3 TLR3遺伝子解析

- A TLR3遺伝子解析 LRRドメインにミスセンス変異を認めた。
- B 303番目のフェニルアラニン (○印) はTLRファミリーで保存されたアミノ酸である。

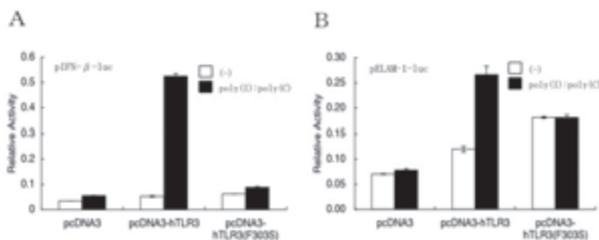


図4 ルシフェラーゼレポーターアッセイ (1)

- A IFNβ活性 B NFκB活性
- IFNβ、NFκBともにpoly (I : C) の刺激に対し野生型TLR3では反応があったが、変異体では反応なかった。

認めた。脳波検査では頭頂部、後頭部を中心に徐波を認めた (図1B)。低体温療法中電解質異常、血圧、血糖の変動あったが、CK、AST、ALTの上昇なかった。同日より復温を開始した。CRP上昇を認めたため、抗生剤をCPRに変更した。第7病日にAST 97 IU/L、ALT 81 IU/Lと上昇ありIVIG施行した。第12病日復温終了、抜管した。第13病日に呼び掛けに対し反応を認めた。第14病日に単語のみであったが発語を認め、意識状態の改善を認めた。第16病日、ICUより退室となった。頭部CTでは脳萎縮を疑う所見を認めたが、以後、歩行等の運動機能はほぼ完全に回復した。第18病日、脳波検査では、前回と比較し改善傾向を認めたが、後頭部の基礎波が年齢にくらべると徐波傾向にあった。その後、発語のテンポは遅い状態が続いたが、徐々に改善傾向を認め第21病日退院にいたった。退院後、同科外来にてフォローされた。退院直後は落ち着きのなさがり多動傾向を認めたが、約1年間後改善傾向を認めた。

退院後施行した脳波検査で徐波を認めず異常所見が改善、また頭部MRIで脳萎縮を認めなかった。第77病日に施行した脳血流シンチでは右前頭葉、側頭

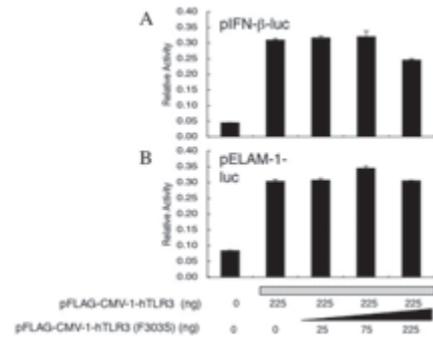


図5 ルシフェラーゼレポーターアッセイ (2)

- A IFNβ活性 B NFκB活性
- 野生型TLR3の発現量を一定にして変異体の発現量を変化したところ、両者とも活性に変化はなかった。

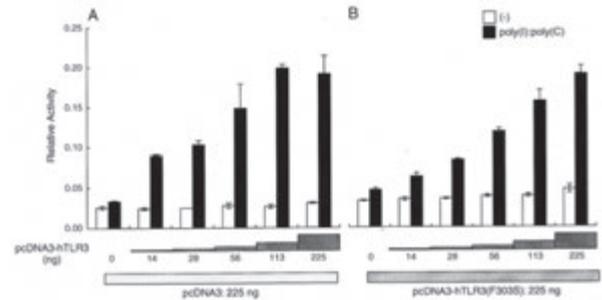


図6 ルシフェラーゼレポーターアッセイ (3)

- A 野生型TLR3の発現量を段階的に増やしたところ発現量の増加とともにIFNβの活性も上昇した。
- B 一定量の変異体TLR3とともに野生型の発現量を段階的に増加したところ、変異体を発現させてないとき (A) にくらべ活性が低かった。

葉、後頭葉に血流の低下を認めたが、第303病日では改善傾向を認めた。しかし、現在も若干左右差を認めている。

## 結果

インフルエンザ脳症10例のうち前述した1例においてTLR3遺伝子のLRRドメインにミスセンス変異を確認した (図3A)。TLR7、8、RIG-I遺伝子に変異を認めなかった。HEK293細胞を用いてTLR3の機能発現解析を行ったところ、poly (I : C) の刺激に対しIFNβとNFκBともに野生型では反応があったが変異体では反応なかった (図4)。野生型の発現量を一定に変異体の発現量を変化したところIFNβ、NF-κBともに活性に変化はなかった (図5)。つぎに野生型の発現量を段階的に増やしたところ、発現量増加とともにIFNβ活性も上昇した (図6A)。また一定量の変異体とともに野生型の発現量を段階的に増加したところ、変異体を発現させてな

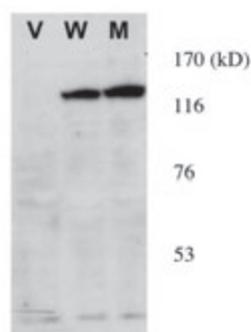


図7 ウェスタンブロット

野生型、変異体ともにTLR3タンパクの発現量に大きな変化はなかった。

いときより活性が低かった(図6B)。ウェスタンブロットでは、野生型、変異体ともにタンパクの発現量に大きな変化はなかった(図7)。

## 考察

インフルエンザ脳症の病態はいまだ解明されていない。脳組織や末梢血にはウイルスゲノムは発見できず、炎症細胞の浸潤も乏しく脳炎というより脳症であると考えられている<sup>6,7)</sup>。本疾患の臨床像は多彩であり、いくつかの病態があると思われるが、その一つがサイトカインストームを主体とするものである<sup>8)</sup>。インフルエンザウイルスが気道上皮細胞に感染すると高サイトカイン血症をきたし、血管内皮細胞障害により脳浮腫や急性壊死性脳症を発症、またミトコンドリア障害からアポトーシス、多臓器不全を起こすと考えられている。末梢血細胞の活性化によって血球貪食をきたす場合もあると考えられている。しかし、すべてのインフルエンザ患者が高サイトカイン血症をきたすわけではない。したがって、われわれはインフルエンザ脳症発症には個体差があると考え、さらに欧米より日本を含む東アジアに多いこと<sup>12-14)</sup>から人種的背景も要因の一つではないかと考えた。本疾患では発熱からの発症が1日以内と短いことから、感染初期にかかわる免疫機構について注目し、自然免疫系がインフルエンザ脳症と関連性があるのではないかと考えた。

自然免疫系ではTLRファミリーが中心的役割を演じる。ウイルス粒子タンパクを細胞外に発現したTLR2やTLR4で検出する。エンドソーム内にはTLR3、TLR7/8、TLR9が発現し、それぞれウイルス由来の二本鎖RNA、一本鎖RNA、DNAを検出する。また、細胞内でウイルスが複製された際に生じる二本鎖RNAをRIG-IやMDA5が検出する。これら

のレセプターからの刺激で抗ウイルス活性を生じると考えられている<sup>9)</sup>。

インフルエンザ脳症患者10例について、RNAウイルス認識機構にかかわる分子に異常をきたしているのではないかと考え、TLR3、TLR7、TLR8、RIG-I遺伝子すべての解析を行った。

その結果、症例提示した患者においてTLR3の遺伝子変異を認めた(図3A)<sup>15)</sup>。TLR3 908番目のヌクレオチド、チミンがシトシンとのヘテロになった変異であり、303番目のフェニルアラニンがセリンに置換されるものであった。

TLRファミリーは細胞外にLRR、細胞内にTIRドメインをもつのを特徴とし、LRRがパターン認識にかかわる部位と考えられている。TLR3の303番目のフェニルアラニンは23あるLRRのうち11番目のLRRに存在し、TLRファミリーにおいて保存されたアミノ酸である(図3B)<sup>16)</sup>。疎水性アミノ酸フェニルアラニンから親水性アミノ酸であるセリンへの置換によりLRR構造が変化し、ウイルスの認識が障害されている可能性があると考えた。

そこで、見つかった変異の機能解析実験を行った。TLRは発現してないが必要なシグナル伝達系をもつHEK293細胞を用いて、野生型と変異体TLR3を発現させてルシフェラーゼレポーターアッセイで解析した。野生型を発現させ poly (I : C) で刺激するとIFN $\beta$ 活性を認めたが変異体では反応なく、NF $\kappa$ Bについても同様の結果を得た(図4)。したがって、変異体TLR3 (F303S) は機能不全と考えた。つぎに変異体にドミナントネガティブ効果を確認するため、野生型の発現量を一定に変異体の発現量を変化したところIFN $\beta$ 、NF- $\kappa$ Bともに活性に変化はなかった(図5)。よってドミナントネガティブ効果は認められなかった。ただし、野生型と変異体の発現量が1対1ではやや減少しているような印象があった。そこで野生型の発現量を段階的に増やしてみたところ、発現量増加とともにIFN $\beta$ の活性も上昇し、TLR3は容量依存性ありと考えた(図6A)。つぎに変異体がどのように作用しているかをみるため、一定量の変異体とともに、野生型の発現量を段階的に増加した。その結果、変異体が発現したほうが発現してないときより活性が低く(図6B)、変異体は野生型のもつ dose effectに対し抑制的に働くと考えられた。ウェスタンブロットでは野生型と変異体の発現量に大きな変化なかった(図7)。以上の結果から、TLR3は容量依存的な機能があり、機能不全である変異体TLR3 (F303S) が同時に発現すると、野生型の機能をある程度抑制する可能性が

あると考えた。

TLR3の発現はこれまで、樹状細胞や脾臓、肝臓などで報告されているが、ヒト肺上皮細胞でも発現の報告がある<sup>11)</sup>。poly (I:C) やインフルエンザAウイルスの刺激でその発現が増強し、種々のサイトカイン産生にかかわっていると報告されている。本症例ではミスセンス変異 (F303S) により疎水性アミノ酸から親水性アミノ酸へ置換されるためLRRの構造を変化させ、またTLRファミリーにおいてLRR内で保存されているアミノ酸が変化することから機能異常をきたすと考えた。機能発現解析の結果、この変異は機能喪失変異であることが確認されたため、変異体TLR3によりウイルスの認識が障害され感染初期のインターフェロン産生の抑制をきたし、侵入したインフルエンザウイルスの一過性の増殖を認めたと推測した。急速に増殖したウイルスに対しほかのTLRやRIG-Iなどのレセプターによる二次的反応により急激な高サイトカイン血症をきたし脳症発症にいたるのではないかと考えた。

近年、TLR3 ノックアウト (Knock out; KO) マウスを用いた実験が報告されている。TLR3は感染したウイルスの排除に貢献していると考えられているが、ウイルスの種類によってはTLR3が宿主に対し不利に働くという報告もある<sup>17,18)</sup>。インフルエンザAウイルスをTLR3 KOマウスに感染させると野生型よりもインフルエンザ症状が弱まったという報告がある<sup>19)</sup>。また、サイトカインなどの炎症性メディエーターが減少し肺でのウイルス産生が増加しているにもかかわらず、TLR3 KOマウスは野生型より生存率が高いという報告がある<sup>20)</sup>。これらの矛盾はTLR3の防御機能を圧倒するウイルスの投与量、通常とは異なる感染経路、実験に用いた細胞の種類などにより生じたと考えられている<sup>17,19)</sup>。ヒトとマウスでは種が違うためKOマウスの実験結果をそのままヒトに当てはめることはむずかしいが、ヒトではTLR3の遺伝子異常と疾患との関連が示唆されている。今回報告したインフルエンザ脳症<sup>15)</sup>のほかに、ヘルペス脳炎を生じたTLR3欠損患者の報告がある<sup>21)</sup>。両者ともTLR3のLRR内での遺伝子異常であるが、感染ウイルスの種類 (RNAウイルスとDNAウイルス)、ウイルスの侵入部位 (呼吸器系と中枢神経系)、病態 (脳症と脳炎)、変異の種類 (ミスセンスとナンセンス) など異なり、TLR3の機能を考えるうえで大変興味深い。TLR3を介する免疫が小児期中枢神経系での単純ヘルペスウイルスへの防御に必要であるという報告がある<sup>22)</sup>。また、ヒトインフルエンザAウイルス感染においてTLRファミリー

が感染初期のウイルス抑制に重要な役割を演じているという報告がある<sup>23)</sup>。したがって、ヒトではTLR3がウイルス感染防御に対し不可欠であることを示唆していると考ええる。ウイルス感染におけるTLR3の役割はいまだ議論の余地があり、今後さらなる検証が望まれる。

## 結論

これまで、自然免疫にかかわる遺伝子異常が報告されている<sup>21,24)</sup>。小児期には獲得免疫系が十分に発達していないことから、病原体の初感染時、自然免疫系を使って対処していると考えられている。したがって、もし自然免疫機構に異常があれば感染症の重症化をきたす恐れがあると考えられる。われわれが経験した症例のように、自然免疫機構を担うTLR3遺伝子変異がインフルエンザ脳症の原因の一つになりうることを示唆していると考えている。今後、症例を重ねさらに検討していきたい。

## 文献

- 1) 森伸生、岡部信彦：最近のインフルエンザの流行状況 (日本、世界). 小児内科 35: 1641-1645, 2003.
- 2) Peltola V, Ziegler T, Ruuskanen O: Influenza A and B virus infections in children. Clin Infect Dis 36: 299-305, 2003.
- 3) 三田村敬子：インフルエンザの臨床像と対応、小児科診療 66: 2138-2144, 2003.
- 4) 森島恒雄：インフルエンザ脳症の全国調査. 小児内科 35: 1667-1671, 2003.
- 5) 厚生労働省インフルエンザ脳症研究班. インフルエンザ脳症ガイドライン【改訂版】、2009.
- 6) Nunoi H, Mercado MR, Mizukami T, et al.: Apoptosis under hypercytokinemia is a possible pathogenesis in influenza-associated encephalopathy. Pediatr Int 47: 175-179, 2005.
- 7) 水口雅：インフルエンザ脳症、ウイルス感染による急性脳症. 小児科診療 71: 2181-2189, 2008.
- 8) 長岡義晴、森島恒雄：新型インフルエンザと急性脳症. 小児科 51: 1641-1647, 2010.
- 9) 植松智、審良静男：TLRファミリーとウイルス感染. ウイルス 54: 145-152, 2004.
- 10) Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr: A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. Nature 388: 394-397, 1997.

- 11) Guillot L, Goffic RL, Bloch S, et al.: Involvement of Toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus. *J Biol Chem* 280: 5571-5580, 2005.
- 12) Oseasohn R, Adelson L, Kaji M: Clinicopathologic study of thirty-three cases of Asia influenza. *N Engl J Med* 260: 509-518, 1959.
- 13) Yoshikawa H, Yamazaki S, Watanabe T, et al.: Study of influenza-associated encephalitis/encephalopathy in children during the 1997 to 2001 influenza seasons. *J Child Neurol* 16: 885-890, 2001.
- 14) Okabe N, Yamashita K, Taniguchi K, et al.: Influenza surveillance system of Japan and acute encephalitis and encephalopathy in the influenza season. *Pediatr Int* 42: 187-191, 2001.
- 15) Hidaka F, Matsuo S, Muta T, et al.: A missense mutation of the Toll-like receptor 3 gene in a patient with influenza-associated encephalopathy. *Clin Immunol* 119: 188-194, 2006.
- 16) Bell JK, Mullen GE, Leifer CA, et al.: Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trend Immunol* 24: 528-533, 2003.
- 17) Vercammen E, Staal J, Beyaert R: Sensing of viral infection and activation of innate immunity by Toll-like receptor 3. *Clin Microbiol Rev* 21: 13-25, 2008.
- 18) Zhang SY, Herman M, Ciancanelli MJ, et al.: TLR3 immunity to infection in mice and humans. *Curr Opin Immunol* 25: 19-33, 2013.
- 19) Majde JA, Kapas L, Bohnet SG, et al.: Attenuation of the influenza virus sickness behavior in mice deficient in Toll-like receptor 3. *Brain Behav Immun* 24: 306-315, 2010.
- 20) Goffic RL, Balloy V, Lagranderie M, et al.: Detrimental contribution of the Toll-like receptor (TLR) 3 to influenza A virus-induced acute pneumonia. *PLoS Pathog* 2: e53 526-534, 2006.
- 21) Zhang SY, Jouanguy E, Ugolini S, et al.: TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis. *Science* 317: 1522-1527, 2007.
- 22) Guo Y, Audry M, Ciancanelli M, et al.: Herpes simplex virus encephalitis in a patient with complete TLR3 deficiency: TLR3 is otherwise redundant in protective immunity. *J Exp Med* 208: 2083-2098, 2011.
- 23) Lee N, Wong CK, Hui DS, et al.: Role of human Toll-like receptors in naturally occurring influenza A infections. *Influenza Other Respir Viruses* 5: 666-675, 2013.
- 24) Casrouge A, Zhang SY, Eidenschenk C, et al.: Herpes simplex virus encephalitis in human UNC-93B deficiency. *Science* 314: 308-312, 2006.

## A mutation in the LRR domain of the Toll-like receptor 3 gene in a patient with influenza-associated encephalopathy

Fumio Hidaka

Influenza-associated encephalopathy develops within the first few days after infection. Apoptosis of tissue under hypercytokinemia could account for this disease, although the etiology is still unknown. Accordingly we suspected that innate, but not acquired immunity could be associated with influenza-associated encephalopathy. In this study of ten patients with influenza-associated encephalopathy, we analyzed TLR family proteins which might recognize single-stranded RNA virus and the retinoic acid inducible gene I, and found a missense mutation of the TLR3 gene in one patient. We considered that heterozygous expression of the mutant and wild-type TLR3 might have a dose-dependent effect comparing to the full expression of the wild-type TLR3. Consequently, a reduced response by heterozygous TLR3 might allow transient excess proliferations of invading influenza viruses, and secondary responses through other pathways are likely to enhance higher cytokine production. Our results imply that a mutation of the TLR3 gene could be one of the factors responsible for influenza-associated encephalopathy.

**Key Words** : innate immunity, influenza-associated encephalopathy, missense mutation, Toll-like receptor, RNA virus

## 急性脳症と遺伝的多型・変異

水口 雅

【要旨】 私たちは急性脳症の症候群別の遺伝子解析を、日本小児神経学会の支援を受けた多施設共同研究として進めている。2009年以降の4年間で全国から200例以上の検体を集積した。候補遺伝子アプローチにより、急性壊死性脳症、けいれん重積型（二相性）脳症、難治頻回部分発作重積型急性脳炎の発症の危険因子となる複数の遺伝子多型ないし変異を同定できた。

**Keywords:** 急性壊死性脳症、二相性けいれんと遅発性拡散低下を呈する急性脳症（けいれん重積型急性脳症）、難治頻回部分発作重積型急性脳炎、遺伝学

## はじめに

感染症による発熱を契機として発症し、急激な経過で広範囲の脳浮腫と高度の意識障害をきたす病態を、急性脳症と総称する。急性脳症には複数の症候群（表1）が含まれるが、そのうち急性壊死性脳症（acute necrotizing encephalopathy、以下ANE）<sup>1)</sup> や二相性けいれんと遅発性拡散低下を呈する急性脳症（acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduce diffusion、以下AESD、別名けいれん重積型）<sup>2,3)</sup>、可逆性脳梁膨大部病変を有する軽症脳炎・脳症（clinically mild encephalitis/encephalopathy with reversible splenial lesion、以下MERS）<sup>4)</sup>、難治頻回部分発作重積型急性脳炎（acute encephalitis with refractory, repetitive partial seizures、以下AERRPS）<sup>5)</sup> など多くは、日本の研究者が記載・樹立した疾患概念である。

日本では急性脳症の罹病率が欧米に比して高く、臨床医・研究者の関心も強い。このため急性脳症の研究においては日本が世界をリードしてきた。過去四半世紀、臨床経過と頭部画像・神経病理所見に基づく症候群の分類に始まって、診断基準の策定、疫学調査やバイオマーカー測定による病態解析、治療法の提唱・評価など、研究は着実に広がり、深まってきた。しかしまれな疾患であり（日本での推定患者数は、急性脳症全体で年400～700人）<sup>6)</sup>、患者間で病態・重症度が異なることなど、研究の進歩を

阻害する要因も多い。症候群分類は2007年までにはほぼ達成され、各症候群の病理・病態も少しずつ解明された<sup>7)</sup>。しかし病因、特に遺伝的要因についてはごく限られた知見しかない。また治療法もインフルエンザガイドライン<sup>8)</sup>などに記載されたものの、症候群別に個別化されてはいない。また治療成績もANEの致死率が28%、AESDで神経学的後遺症の率が66%などと依然として不良である<sup>6,9)</sup>。こういった事態を打破しブレークスルーに達するための有力な戦略として、最新の遺伝学的手法を導入して急性脳症の遺伝的背景の全容を解明し、病因・病態の理解を深めるという道筋が考えられる。

急性脳症の遺伝的背景に関する最新の知見については、すでに1年前の学術集会（第17回日本神経感染症学会学術集会）において解説し、総説論文として刊行した<sup>10)</sup>。本稿では私たちが急性脳症の遺伝学的研究をどのような目的と方法で進めており、現在どこまで来たか、今後どのような方向を目指すのかについてお示ししたい。

## 急性脳症と遺伝

急性脳症の罹病率に関する世界的な統計はないが、従来の報告をみると、大きな人種差があることがほぼ確実である。たとえばANEは日本、台湾、韓国などから、AESDは日本からの報告が圧倒的であるなど、多くの症候群は東アジア人に多発してい

表 1 急性脳症のおもな症候群

症候群	主な病態 (推定) <sup>7)</sup>	罹病率 (1 年あたり) <sup>6)</sup>	致死率 <sup>6,9)</sup>	神経学的後遺症の率 <sup>6,9)</sup>
古典的Reye症候群	ミトコンドリア代謝異常	数人	中	中
急性壊死性脳症 (ANE)	サイトカインの嵐、多臓器不全	15 ~ 30人	高 (28%)	高 (56%)
Hemorrhagic shock and encephalopathy 症候群	サイトカインの嵐、DIC	10 ~ 15人	高	高
二相性けいれんと遅発性拡散低下を呈する急性脳症 (AESD、けいれん重積型)	てんかん重積状態、興奮毒性	100 ~ 200人	低 (1%)	高 (66%)
可逆性脳梁膨大部病変を有する軽症脳炎・脳症 (MERS)	ミエリン内浮腫?	50 ~ 100人	低 (0%)	低 (7%)
難治頻回部分発作重積型急性脳炎 (AERRPS)	てんかん? 炎症?	5 ~ 10人	低	高

表 2 日本小児神経学会の支援する共同研究 (急性脳症)

課題名	急性脳症の分子遺伝学的病態解析	急性脳症の包括的遺伝子解析
番号	09-02	11-02
期間	2009年5月~2011年8月	2011年8月~
対象	ANE, AESD	すべての急性脳症 (MERS, AERRPS を含む)
方法	候補遺伝子解析	候補遺伝子解析、ゲノムワイド解析
倫理審査 (東京大学)	No. 2116 (2008年7月)	No. 3504 (2011年7月)

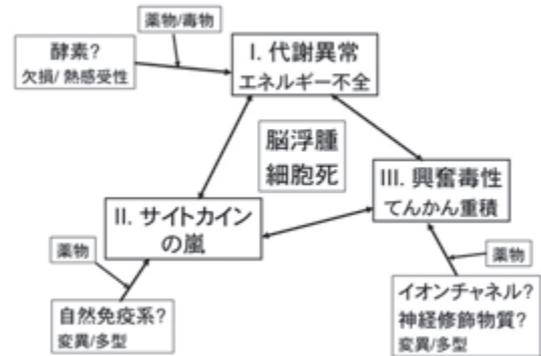


図 1 急性脳症の病態と候補遺伝子文献<sup>10)</sup> の図を再掲。

る。ところが急性脳症の先行感染は、インフルエンザ、突発性発疹、ロタウイルス胃腸炎など、世界中に分布するありふれたものである<sup>7)</sup>。したがって感染を契機に急性脳症を発症しやすい遺伝的素因の存在が推測される。

急性脳症の症例の大多数は孤発例である。遺伝性再発性ANE (欧米人にみられるANEの重型で、ANE1と称される。常染色体性優性遺伝)<sup>11)</sup> という例外をのぞくと、Mendel遺伝を示さない。また感染症に加え、薬物 (サリチル酸、非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs)、テオフィリンなど) や毒物 (カビ毒など) も関与する。したがって多因子遺伝 (複

雑疾患) と推定される。

### 研究の目的

急性脳症の症候群別に遺伝子解析を行って、発症しやすい遺伝的素因を見出す。つぎに、遺伝子と感染症と薬物・毒物を起点とする病態の流れ図を描く。最終的に、病態に即した、根本的で有効性の高い治療法を開発する。

### 研究の方法

日本各地の施設から送付された急性脳症の症例の

表3 おもな候補遺伝子

カテゴリー	遺伝子名	タンパク	症候群
酵素	<i>CPT2</i>	Carnitine transpalmitoyl transferase II	AESD, ANE
サイトカイン・自然免疫	<i>IL1B</i>	IL-1 $\beta$	AESD
	<i>IL1RN</i>	IL-1 receptor antagonist	AERRPS, AESD
	<i>IL6</i>	IL-6	ANE
	[HLA型]		ANE
神経興奮	<i>SCN1A</i>	Sodium channel, voltage-gated, type I, $\alpha$ subunit	AESD, ANE, AERRPS
	<i>SCN2A</i>	Sodium channel, voltage-gated, type II, $\alpha$ subunit	AERRPS
	<i>ADORA2A</i>	Adenosine A2A receptor	AESD
その他	<i>RANBP2</i>	Ran binding protein 2	ANE1

末梢血を材料として、ゲノムDNAを抽出し、遺伝子解析を行っている。検体数が少数のうちはSanger法による候補遺伝子解析を行うが、多数（遺伝子変異では数例以上、遺伝子多型では数百例以上）集まった段階でゲノムワイド解析（変異ではエクソーム解析、多型ではSNP解析）に移行する予定である。検体と同時に送られた臨床情報は、連結可能匿名化して保管している。

2009年に日本小児神経学会の支援する共同研究（表2）として認定され、以来、全国規模の多施設共同研究を続けている。

候補遺伝子の選定にあたっては、急性脳症の推定病態（図1）に基づき、酵素（特にミトコンドリア酵素）、自然免疫の因子（サイトカインなど）、イオンチャンネルや神経調節因子を選んで、それらの変異や多型について検討している<sup>10)</sup>（表3）。

### これまでの成果と今後の展望

2013年秋までに総数210検体が集積された。症候群別の内訳は、ANE 35例、AESD 133例、AERRPS 7例、MERS 13例、その他・分類不能の急性脳症19例である。AESDについては検体が順調に集まっているが、MERSについては不足している。

以下、3つの重要な症候群に関する成果と今後の展望を概説する。

#### 1) ANE

臨床的には全身臓器の障害を伴う重篤な脳症で、頭部CT・MRIで認められる両側視床病変が特徴的である。地域的には日本、台湾、韓国に多い。年齢的には0～3歳児に多い。先行感染はインフルエンザが多い。増悪因子としてNSAIDsが知られている。

本質的には全身の疾患であり、重症例は多臓器不全にいたる。高度の高サイトカイン血症がある<sup>7)</sup>。致死率が28%と高い<sup>6,9)</sup>。

遺伝子解析の結果、日本人ANE症例には*RANBP2*遺伝子（Ran binding protein 2、ANE1の原因遺伝子）<sup>11)</sup>の変異はまったくない。ANE発症の危険因子として、炎症性サイトカインをコードする*IL6*、*IL10*遺伝子のプロモータ領域の多型、およびHLA-DQB1、DRB1型が関連するというpreliminaryな結果を得た。これらについて現在、確認ないし機能解析を行っている。さらに非定型的ANEの1例で*SCN1A*遺伝子変異を見出した<sup>12)</sup>。

ANEの病態の中心は、炎症反応の過剰と考えられている。本研究においても、発症にHLA型や炎症性サイトカイン多型が関与することが示唆された。また主役は免疫であるが、脇役として代謝も関与している可能性がある。ANEの脳病変がミトコンドリア病に似ていること、*RANBP2*がミトコンドリアの機能・局在に関与すること<sup>13)</sup>などがその根拠である。本研究では現在、*RANBP2*と結合するCox11等の因子について、遺伝子多型・変異を検討中である。

#### 2) AESD

臨床的には二相性の臨床経過、大脳皮質病変を特徴とする症候群で、臓器障害はあっても軽度である。地域的には日本人に、年齢的には0～1歳児に多い。先行感染は突発性発疹が多い。増悪因子としてテオフィリンが知られている。発症直後（0～2病日）は熱性痙攣と区別できない。中等度の高サイトカイン血症がある<sup>7)</sup>。治療として脳低温療法に期待が集まっているものの、現時点で有効な方法が乏しい。

死亡 (1%) は少ないが、後遺症 (66%) が多い<sup>6,9)</sup>。

遺伝的背景として、ミトコンドリア酵素CPT2 (carnitine palmitoyltransferase II) の熱感受性多型<sup>14)</sup>、および神経調節因子ADORA2A (adenosine A<sub>2A</sub> receptor) の発現が亢進する多型<sup>15)</sup> を、これまでの研究で明らかにした。また少数例でSCN1A遺伝子変異を見い出した<sup>12)</sup>。同遺伝子の変異によるAESD症例は、他施設からも報告されている<sup>16,17)</sup>。このほか、炎症性サイトカインをコードするIL1B遺伝子のプロモータ領域の多型が関与する可能性を見つけ、現在、確認ないし機能解析を行っている。

AESDには代謝 (ミトコンドリア)、神経 (アデノシンを介する情報伝達)、免疫 (脳内のIL-1β作用) の3つの側面があることが、本研究により示唆された。今後は治療への応用に向かう方針である。代謝の面ではカルニチン、神経の面ではアデノシンA<sub>2A</sub>受容体拮抗薬 (istradefylline)、免疫の面ではIL-1受容体アンタゴニスト (anakinra) を応用できる可能性が期待される。

### 3) AERRPS

病名のとおり、難治で頻回の部分発作を特徴とする、まれな症候群である。日本にも欧米にもあるが、欧米ではFIRESという別の病名を冠することが多い。年齢的には学童期に多い。脳炎からてんかんへ直接、移行する経過を辿る。ときに髄液炎症所見がある。重い後遺症を残しやすい<sup>5)</sup>。

遺伝的背景として、神経細胞のナトリウムチャネルをコードするSCN1A、SCN2A遺伝子の変異がおのおの1例で見い出されている<sup>18,19)</sup>。またIL-1受容体アンタゴニストをコードするIL1RN遺伝子多型が関与している可能性を見出し、現在、確認ないし機能解析を行っている。

このように臨床的にも遺伝的にもAERRPSがてんかん (神経) と脳炎 (免疫) の両面をもつことがわかってきている。今後の研究では、両者がどう結びつくのかを解明する必要がある。

## おわりに

本稿では急性脳症の遺伝子解析に関する多施設共同研究の経緯と成果、今後の展望について述べた。

本研究は現在進行中であり、急性脳症の症例 (既往例を含む) を経験された施設においては、患者・家族の同意を得て、ぜひ参加していただきたい。研究の趣旨、患者・保護者への説明と同意の文書、病歴記入用紙、検体の採取・送付方法は、著者の研究

室である東京大学発達医科学講座のWebサイト <http://www.development.m.u-tokyo.ac.jp/> に置いてあるので、ダウンロードして使っていただきたい。

## 謝辞

研究に参加・協力いただいた患者・家族の皆様、主治医、共同研究者に感謝いたします。本研究は日本小児神経学会共同研究支援委員会の支援、日本学術振興会科学研究費基盤研究 (20390293, 24390258) および厚生労働科学研究費難治性疾患克服研究 (H22-難治-一般-49, H23-難治-一般-78, H25-難治-一般-9) による助成を受けた。

## 文献

- 1) Mizuguchi M, Abe J, Mikkaichi K, et al.: Acute necrotising encephalopathy of childhood: a new syndrome presenting with multifocal, symmetric brain lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 58: 555-561, 1995.
- 2) 塩見正司: インフルエンザ脳症—臨床病型分類の試み—。 *小児科臨床* 53: 1739-1746, 2000.
- 3) Takanashi J, Oba H, Barkovich AJ, et al.: Diffusion MRI abnormalities after prolonged febrile seizures with encephalopathy. *Neurology* 66: 1304-1309, 2006.
- 4) Tada H, Takanashi J, Barkovich AJ, et al.: Clinically mild encephalitis/ encephalopathy with a reversible splenial lesion. *Neurology* 63:1854-1858, 2004.
- 5) Sakuma H: Acute encephalitis with refractory, repetitive partial seizures. *Brain Dev* 31: 510-514, 2009.
- 6) 水口雅: 重症・難治性急性脳症の病因解明と診療確立に向けた研究. 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 平成22年度総括・分担研究報告書. 東京, 2011, pp3-10.
- 7) Mizuguchi M, Yamanouchi H, Ichiyama T, et al.: Acute encephalopathy associated with influenza and other viral infections. *Acta Neurol Scand* 115: 45-56, 2007.
- 8) 森島恒雄、岡部信彦、中村祐輔、ほか: インフルエンザ脳症ガイドライン【改訂版】. *小児科臨床* 62: 2483-2528, 2009.
- 9) Hoshino A, Saitoh M, Oka A, et al.: Epidemiology of acute encephalopathy in Japan, with emphasis

- on the association of viruses and syndromes. *Brain Dev* 34: 337-343, 2012.
- 10) 水口雅: 急性脳症 — 発症の遺伝的背景. *Neuroinfection* 18:54-60, 2013.
  - 11) Neilson DE, Adams MD, Orr CM, et al.: Infection-triggered familial or recurrent cases of acute necrotizing encephalopathy caused by mutations in a component of the nuclear pore, RANBP2. *Am J Hum Genet* 84: 44-51, 2009.
  - 12) Saitoh M, Shinohara M, Hoshino H, et al.: Mutations of the *SCN1A* gene in acute encephalopathy. *Epilepsia* 53: 558-564, 2012.
  - 13) Cho KI, Cai Y, Yi H, et al.: Association of the kinesin-binding domain of RanBP2 to KIF5B and KIF5C determines mitochondria localization and function. *Traffic* 8: 1722-1735, 2007.
  - 14) Shinohara M, Saitoh M, Takanashi JI, et al.: Carnitine palmitoyl transferase II polymorphism is associated with multiple syndromes of acute encephalopathy with various infectious diseases. *Brain Dev* 33: 512-517, 2011.
  - 15) Shinohara M, Saitoh M, Nishizawa D, et al.: *ADORA2A* polymorphism predisposes children to encephalopathy with febrile status epilepticus. *Neurology* 80: 1571-1576, 2013.
  - 16) Sakakibara T, Nakagawa E, Saito Y, et al.: Hemiconvulsion-hemiplegia syndrome in a patient with severe myoclonic epilepsy in infancy. *Epilepsia* 50: 2158-2162, 2009.
  - 17) Takayanagi M, Haginoya K, Umehara N, et al.: Acute encephalopathy with a truncation mutation in the *SCN1A* gene: a case report. *Epilepsia* 51: 1886-1888, 2010.
  - 18) Kobayashi K, Ouchida M, Okumura A, et al.: Genetic seizure susceptibility underlying acute encephalopathies in childhood. *Epilepsy Res* 91: 143-152, 2010.
  - 19) Kobayashi K, Ohzono H, Shinohara M, et al.: Acute encephalopathy with a novel point mutation in the *SCN2A* gene. *Epilepsy Res* 102: 109-112, 2012.

# Gene polymorphisms and mutations causing acute encephalopathy

Masashi Mizuguchi

Genetic analysis of each syndrome of acute encephalopathy is in progress, as a multi-institutional, collaborative study supported by the Japanese Society of Child Neurology. Since the year 2009, more than 200 specimens have been collected from all over Japan. Multiple polymorphisms and mutations were identified as the predisposing factor of acute necrotizing encephalopathy, acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion, and acute encephalitis with refractory, repetitive partial seizures.

**Key Words:** acute necrotizing encephalopathy, acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion, acute encephalitis with refractory, repetitive partial seizures, genetics

## 抗体不全症と中枢神経感染症

金兼弘和

【要旨】 原発性免疫不全症はさまざまなものがあるが、そのうち抗体不全症が約半数と最も多い。抗体不全症のおもな症状は上下気道の細菌性呼吸器感染症であるが、ときに化膿性髄膜炎を初発症状とすることがある。免疫グロブリン定期補充後は重症感染症が認められることはないが、まれにエンテロウイルスによる中枢神経感染症が認められることがある。わが国のX連鎖無ガンマグロブリン血症（XLA）において20例近くのウイルス性と思われる中枢神経感染症が報告されている。総じて血清IgGトラフ値が300mg/dL以下と低値であった。したがってウイルス性中枢神経感染症の予防のためには血清IgGトラフ値をできるだけ高値に保つことが重要と考えられる。

**Key Words** : 抗体不全症、中枢神経感染症、X連鎖無ガンマグロブリン血症、IgG、免疫グロブリン定期補充療法

### はじめに

原発性免疫不全症は200種類以上知られているが、1) 複合免疫不全症、2) 免疫不全症を伴うよく定義された症候群、3) 主として抗体不全症、4) 免疫調節障害、5) 食細胞の数、機能、あるいはその両方の先天性障害、6) 自然免疫不全症、7) 自己炎症性疾患、8) 補体不全症に分類される<sup>1)</sup>。患者数では抗体不全症が約半数と最も頻度が高く、おもなものはX連鎖無ガンマグロブリン血症（XLA）と分類不能型免疫不全症であり、基本的治療法は免疫グロブリン定期補充療法である。抗体、特にIgGは細菌をオプソニン化して好中球が貪食しやすいようにすることと補体を介する免疫溶菌のほかには遊離ウイルスの中和作用を有しているため、抗体欠乏の結果として、化膿菌感染ならびにグラム陰性菌感染の重症化に加えてエンテロウイルス感染症の重症化をきたす。本稿では抗体不全症の主たる病型であるXLAを取り上げ、XLAにおける中枢神経感染症の特徴について概説する。

### X連鎖無ガンマグロブリン血症

XLAとは1952年にアメリカの小児科医Brutonに

よって初めて報告された抗体不全症である<sup>2)</sup>。男児に発症し、母親からの移行抗体が消失する生後4ヵ月ごろから感染症に罹患しやすくなる。生体のリンパ組織である扁桃腺やリンパ節は痕跡程度にしか認められない。検査所見では血清免疫グロブリンが著減（IgG<200 mg/dL, IgAおよびIgM 感度以下）し、末梢血B細胞欠損（<2%）を伴う。細胞性免疫能は正常である。兄弟、母方男性に家族歴があれば臨床診断可能であるが、わが国では少子化を反映してか、家族歴を有するのは1/3程度である<sup>3)</sup>。1993年に原因遺伝子*Bruton tyrosine kinase*（*BTK*）が同定され<sup>4)</sup>、*BTK*遺伝子解析によって確定診断が可能となった。しかし全例で*BTK*遺伝子変異が同定されるわけではなく、*BTK*遺伝子変異がなく、*BTK*蛋白を欠損する例も存在する<sup>6)</sup>。恐らくは非翻訳領域の変異によるものと思われる。*BTK*蛋白はB細胞のみならず単球にも存在する。XLA患者では末梢血B細胞は欠損しているが、単球は健常人と同程度に存在する。そこで抗*BTK*モノクローナル抗体を利用して単球における*BTK*蛋白をフローサイトメトリーで調べることによってXLAの診断が可能となった<sup>7)</sup>。私たちは全国の諸施設より末梢血B細胞欠損を伴った低ガンマグロブリン血症の男子106例（91家系）を対象として、フローサイトメト

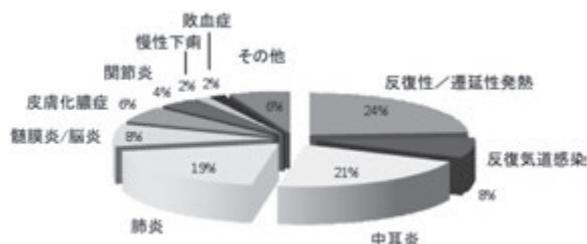


図1 わが国のXLAにおける初発症状  
XLA患者129例における初発症状を示す。文献<sup>8)</sup>より引用、一部改変。

表1 髄膜炎・脳炎の原因

病原体	患者数 (%)
肺炎球菌	5 (20)
エコーウイルス	4 (16)
コクサッキーウイルス	2 (8)
ポリオウイルス	3 (12)
アデノウイルス	1 (4)
インフルエンザ菌b型	1 (4)
原因不明・記載なし	9 (36)

文献<sup>9)</sup>より引用

表2 わが国のXLAにおける非細菌性中枢神経感染

症例	報告年	診断名	年齢	ウイルス	血清IgG	報告者
1	1984	亜急性硬化性全脳炎	6	麻疹ウイルス	326 mg/dL	小西 <sup>10)</sup>
2	1985	麻疹再活性化脳炎	16	麻疹ウイルス		瀬尾 <sup>11)</sup>
3	1986	慢性髄膜炎	22	パルボウイルス		篠原 <sup>12)</sup>
4	1988	脳炎	7	エコー 11ウイルス		小林 <sup>13)</sup>
5	1989	亜急性脳炎	2	不明	<20 mg/dL	富沢 <sup>14)</sup>
6	1993	慢性進行性脳症	11	不明	150 mg/dL	小坂 <sup>15)</sup>
7	1995	慢性髄膜炎	25	エンテロウイルス	205 mg/dL	上原 <sup>16)</sup>
8	1995	進行性多巣性白質脳症	21	不明		Ouchi <sup>17)</sup>
9	1996	慢性進行性脳症	8	不明	321 mg/dL	加藤 <sup>18)</sup>
10	1998	慢性進行性脳症	?	不明		大野 <sup>19)</sup>
11	1998	慢性髄膜炎	10	エンテロウイルス	260 mg/dL	小澤 <sup>20)</sup>
12	2002	慢性脊髄炎	13	コクサッキー B1ウイルス	<40 mg/dL	Katamura <sup>21)</sup>
13	2003	進行性多巣性白質脳症	37	JCウイルス	検出感度以下	Teramoto <sup>22)</sup>
14	2004	進行性脳症	5	不明		浅野 <sup>23)</sup>
15	2004	髄膜炎	21	エンテロウイルス	217 mg/dL	三須 <sup>24)</sup>
16	2005	慢性髄膜炎	17	エンテロウイルス	272 mg/dL	Shiroma <sup>25)</sup>

リーによるスクリーニングを行ったところ、93例(88%)、78家系(86%)でBTK蛋白発現が低下していた<sup>3)</sup>。当教室ではフローサイトメトリーと遺伝子解析を組み合わせるわが国で200例以上のXLAを診断している。

### XLAと中枢神経感染症

抗体不全症のおもな症状は上下気道の細菌性呼吸器感染症であるが、ときに中枢神経感染症を発症することがある。わが国におけるXLA129例における初発症状を調べたところ、反復性・遷延性発熱24%、反復気道感染8%、中耳炎21%、肺炎19%と上下気道感染が72%と2/3以上を占めていた<sup>8)</sup>(図1)。しかし髄膜炎・脳炎も8%で認められ、初発症状として

中枢神経感染症はまれなものではない。XLAの初発症状を発現年齢別にみると1歳未満(49例)では髄膜炎・脳炎は認められなかったが、1~4歳(50例)では8%、4~7歳では17%、7歳以上(12例)では33%と高年齢で発症した症例ほど中枢神経感染症を初発症状とすることが多い傾向が認められた。Winkelsteinら<sup>9)</sup>はアメリカにおける201例のXLAのうち25例の髄膜炎・脳炎を報告している(表1)。肺炎球菌が5例(20%)で認められ、エコーウイルスが4例(16%)、コクサッキーウイルスが2例(8%)、ポリオウイルスが3例(12%)とエンテロウイルス感染症が9例(36%)で認められた。わが国のXLAにおける非細菌性脳炎症例を文献検索したところ、1984~2005年の20年間に16例の報告があった(表2)<sup>10-25)</sup>。発症時期は思春期~成人に限らず、幼児例も

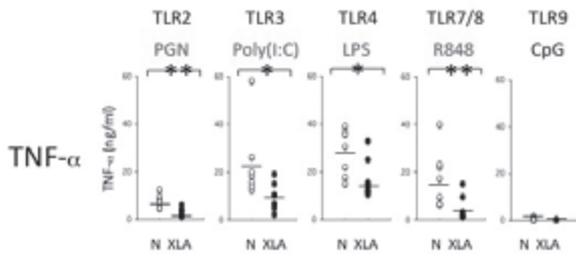


図2 TLRリガンド刺激による樹状細胞からのTNF- $\alpha$ 産生

\*ならびに\*\*は正常コントロールとくらべてそれぞれ5%未満、1%未満の有意差があることを示す。文献<sup>27)</sup>より引用、一部改変。

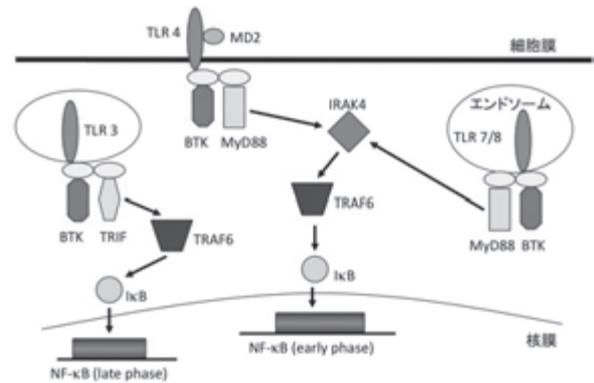


図3 TLRシグナルにおけるBTKの役割 (仮説)

BTKはMyD88やTRIFと会合し、TLRからのシグナルを下流に伝える働きをしている。

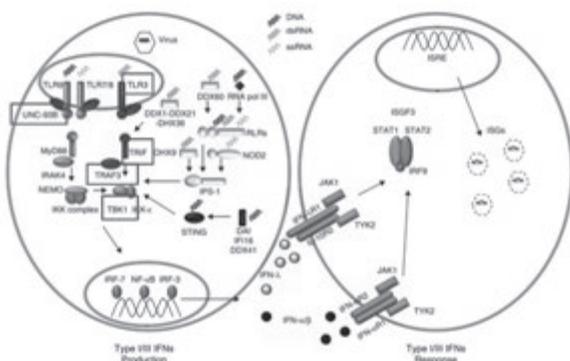


図4 ウイルスを認識するTLRとそのシグナル伝達  
単純ヘルペス脳炎の原因遺伝子を□で囲む。文献<sup>28)</sup>より引用、一部改変。

少なからず認められた。原因が特定できたのは10例(63%)であり、うちエンテロウイルス属が6例と最多であったが、麻疹が2例、パルボが1例、JCウイルスが1例であった。Winkelsteinら<sup>9)</sup>の報告と同様にエンテロウイルスが最も多いが、すべてがエンテロウイルスというわけではない。発症例はIgGトラフ値が300mg/dL以下のものが多く、免疫グロブリン補充療法が十分でなかったと考えられる。

### BTKとToll様レセプター

血清IgGトラフ値が十分であってもウイルス性中枢神経感染症を発症することがあるので、細胞融解増殖型ウイルスの抗体による増殖阻止以外のメカニズムが働いている可能性がある。XLAの原因遺伝子であるBTKはB細胞のみならず単球や樹状細胞に発現している。樹状細胞はToll様レセプター(TLR)を介する自然免疫系に重要な働きをしている。近年BTKがリポポリサッカライド刺激によって誘導されるTNF- $\alpha$ 産生、すなわちTLR4のシグナ

ル伝達に関連するとの報告がなされた<sup>25)</sup>。そこで私たちはXLA患者の単球由来樹状細胞におけるTLRシグナル伝達を調べた<sup>26)</sup>。XLA患者と健常人において樹状細胞における種々のTLRの発現は同様であった。樹状細胞の分化をTLRリガンド刺激後のCD83の発現で調べたところ、XLA患者ではTLR2, TLR4, TLR7/8リガンド刺激による樹状細胞の成熟が健常人にくらべて低下していた。さらにTLR2, TLR3, TLR4, TLR7/8リガンド刺激によるTNF- $\alpha$ 産生はXLA患者で健常人にくらべて有意に低下していた(図2)。ただしIL-6やIL-12p70の産生は同程度であった。したがって、XLA患者における細菌ならびに一部のウイルス感染の重症化には樹状細胞におけるTLRシグナル異常が関与している可能性が考えられる。TLRシグナルにおけるBTKの役割についての仮説を図示する(図3)。BTKはMyD88やTRIFと会合し、TLRからのシグナルを下流に伝える働きをしている。BTKを欠損するXLA患者ではこれらのTLRシグナルの異常によってNF- $\kappa$ Bを介するサイトカイン産生の低下が認められるのであろう。

### おわりに

わが国のXLAで非細菌性中枢神経感染症を発症した症例は、総じて血清IgGトラフ値が300mg/dL以下と低値であった。したがって中枢神経感染症の予防のためには血清IgGトラフ値をできるだけ高値(700あるいは900mg/dL)保つことが大切である。本稿ではXLAと中枢神経感染症について概説したが、免疫不全症のうちには中枢神経感染症(単純ヘルペス脳炎)を主たる症状とするUNC-93B、

TLR3、TRIF、TRAF3、TBK1欠損症がある<sup>27)</sup>。そのほかにも中枢神経感染症を合併する免疫不全症は少なからず存在し、今後もさらなる研究が望まれるところである。

## 文献

- 1) Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, et al.: Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the international union of immunological societies expert committee for primary immunodeficiency. *Front Immunol* 2:54, 2011.
- 2) Bruton OC: Agammaglobulinemia. *Pediatrics* 9:722-728, 1952.
- 3) Kanegane H, Futatani T, Wang Y, et al.: Clinical and mutational characteristics of X-linked agammaglobulinemia and its carrier identified by flow cytometric assessment combined with genetic analysis. *J Allergy Clin Immunol* 108:1012-1020, 2001.
- 4) Vetrie D, Vorechovsky I, Sideras P, et al.: The gene involved in X-linked agammaglobulinaemia is a member of the src family of protein-tyrosine kinases. *Nature* 361:226-233, 1993.
- 5) Tsukada S, Saffran DC, Rawlings DJ, et al.: Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia. *Cell* 72:279-290, 1993.
- 6) Gaspar HB, Lester T, Levinsky RJ, et al.: Bruton's tyrosine kinase expression and activity in X-linked agammaglobulinaemia (XLA) : the use of protein analysis as a diagnostic indicator of XLA. *Clin Exp Immunol* 111:334-338, 1998.
- 7) Futatani T, Miyawaki T, Tsukada S, et al.: Deficient expression of Bruton's tyrosine kinase in monocytes from X-linked agammaglobulinemia as evaluated by a flow cytometric analysis and its clinical application to carrier detection. *Blood* 91:595-602, 1998.
- 8) 種市尋宙、金兼弘和、二谷武、ほか：わが国におけるX連鎖無 $\gamma$ グロブリン血症の臨床診断に関する検討。日児誌 108:1118-1122, 2004.
- 9) Winkelstein JA, Marino MC, Lederman HM, et al.: X-linked agammaglobulinemia: report on a United States registry of 201 patients. *Medicine (Baltimore)* 85:193-202, 2006.
- 10) 小西加甫子、上棚直人、松田明：無ガンマグロブリン血症に併発した亜急性硬化性全脳炎。日児誌 88:1257-1262, 1984.
- 11) 瀬尾裕志：無ガンマグロブリン血症で特異な経過をたどった麻疹脳炎の一例（会議録）。日児誌 89:1217, 1985.
- 12) 篠原幸人、ほか：慢性髄膜脳炎症状を主徴とし、髄液よりパルボウイルス様因子が検出された無ガンマ・グロブリン血症の1例（会議録）。臨床神経学 26:313, 1986.
- 13) 小林邦彦、ほか：Bruton型無 $\gamma$ -グロブリン血症に併発したEcho 11virus脳炎 高抗体価 $\gamma$ -グロブリン髄腔内投与による治療（会議録）。日児誌 92:1429-1430, 1988.
- 14) 富沢一浩、大鹿栄樹、田口裕一、ほか：亜急性脳炎で死亡した無 $\gamma$ -グロブリン血症の1例。日児誌 93:2787-2793, 1989.
- 15) 小坂仁、木村清次、根津敦夫、ほか：先天性無ガンマグロブリン血症に合併した慢性進行性脳症の1例。臨床神経学 34:696-701, 1994.
- 16) 上原さおり、ほか：先天性無ガンマグロブリン血症に合併した慢性進行性脳症の1例（会議録）。脳と発達 26Suppl:187, 1994.
- 17) Ouchi M, et al.: 多臓器へのT細胞浸潤をもつX連鎖 $\gamma$ グロブリン欠乏血症の一例 CD4+T細胞リンパ球欠乏とPML様CTスキャン所見（英語）（会議録）。Brain & Development 17:442, 1995.
- 18) 加藤郁子、ほか：無ガンマグロブリン血症に合併した慢性進行性脳症の1例（会議録）。日児誌 100:553, 1996.
- 19) 大野貴子、ほか： $\gamma$ -グロブリン脳室内投与が有効であった、先天性無 $\gamma$ -グロブリン血症に併発した慢性進行性脳炎の1例（会議録）。臨床神経学 38:179, 1998.
- 20) 小澤鉄太郎、小野寺理、飯塚統、ほか：Bruton型無ガンマグロブリン血症に合併した慢性エンテロウイルス髄膜炎と水頭症の1例。脳と神経 50:191-196, 1998.
- 21) Katamura K, Hattori H, Kunishima T, et al.: Non-progressive viral myelitis in X-linked agammaglobulinemia. *Brain Dev* 24:109-111, 2002.
- 22) Teramoto T, Kaneko H, Funato M, et al.: Progressive multifocal leukoencephalopathy in a patient with X-linked agammaglobulinemia. *Scand J Infect Dis* 35:909-1010, 2003.
- 23) 浅野隆彦、寺本貫英、近藤直実、ほか：Bruton型無 $\gamma$ グロブリン血症患者に合併したPMLの1例

- (会議録)。日本放射線学会雑誌 64:598,2004.
- 24) 三須健郎、志賀裕正、佐藤峰成、ほか：新規抗ウイルス薬プレコナリルが奏効した無ガンマグロブリン血症を伴った難治性エンテロウイルス髄膜脳炎の一例（会議録）。NEUROINFECTION 9:87, 2004.
- 25) Shiroma N, Omi T, Hasegawa H, et al.: A case of X-linked agammaglobulinemia with progressive encephalitis. *Pediatr Neurol* 31:371-373, 2004.
- 26) Horwood NJ, Mahon T, McDaid JP, et al.: Bruton's tyrosine kinase is required for lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production. *J Exp Med* 197:1603-1611, 2003.
- 27) Taneichi H, Kanegane H, Sira MM, et al.: Toll-like receptor signaling is impaired in dendritic cells from patients with X-linked agammaglobulinemia. *Clin Immunol* 126:148-154, 2008.
- 28) Sancho-Shimizu V, Perez de Diego R, Jouanguy E, et al.: Inborn errors of anti-viral interferon immunity in humans. *Curr Opin Virol* 1:487-496, 2011.

## 症 例 報 告

乳幼児期に発症した化膿性脊椎炎に続発した髄膜炎の臨床的検討  
～炎症マーカーの変動評価～Pyogenic meningitis secondary to spondylitis in infants :  
Evaluation of changes in inflammatory markers

森地 振一郎、山中 岳、柏木保代、河島尚志

Shinichiro Morichi, Gaku Yamanaka,  
Yasuyo Kashiwagi, Hisashi Kawashima東京医科大学医学部小児科学分野  
Department of Pediatrics, Tokyo Medical University

【要旨】乳幼児期に発症した化膿性脊椎炎に続発した髄膜炎の自験例に対して炎症マーカーを指標に経過を追ったので報告する。症例1は1歳4か月の女児。症例2は11か月の女児。2例とも主訴は発熱および歩行障害。病変部は、症例1：L5、S1椎体およびL5/S1椎間板、症例2：L4、L5椎体およびL4/L5椎間板であった。化膿性脊椎炎の過去の報告と比較すると、本邦における基礎疾患のない発症例では最年少（症例2）であった。画像および炎症マーカーである白血球数・C反応性蛋白（CRP）・赤血球沈降速度・interleukin-6を用いて早期に診断にいたり、その後の治療評価に炎症マーカーが有用であった。幼児期における歩行障害の原因のうち、脊椎感染の頻度はまれであるが鑑別にあげる必要がある。

**Key Words:** 乳幼児、化膿性脊椎炎、MRI、炎症マーカー、interleukin-6

We presented the clinical courses of 2 female infants (age: 1 year and 4 months [case 1], and 11 months [case 2]) who were diagnosed with pyogenic meningitis secondary to spondylitis based on inflammatory markers values and MRI findings. Both patients had fever and dysbasia. The affected sites were: the L5 and S1 vertebral body and L5/S1 intervertebral disc in case 1, and the L4 and L5 vertebral body and L4/L5 intervertebral disc in case 2. When referring to previous studies of pyogenic spondylitis in Japan, case 2 was the youngest patient with this disease among those without underlying illnesses. The high values of inflammatory markers (white blood cell, C-reactive protein [CRP], erythrocyte sedimentation rate [ESR], and interleukin-6) based on the clinical symptoms and signs in our patients is indicated the diagnosis with pyogenic spondylitis and the following MRI findings could be confirmed at early stage of that illness. These markers were also useful for an evaluation of a later treatment. Among the causes of dysbasia in infants, spinal infection rarely occurs, but it is necessary to differentiate pyogenic spondylitis from such infection.

**Key Words:** infants, pyogenic spondylitis, MRI, inflammatory marker, interleukin-6

## はじめに

化膿性脊椎炎のなかでも小児期の発症例はまれである。小児の脊椎感染症は症状が多彩で特徴的な検査所見に乏しいため早期診断が困難であるが、低年齢発症ではその傾向が顕著である<sup>1,2)</sup>。しかし進行すると敗血症や脊椎不安定・脊髄障害などの神経学的後遺症をきたす可能性もあるため、早期の治療開始が重要である<sup>3)</sup>。今回、化膿性脊椎炎に続発した髄膜炎のまれな乳幼児2例を経験したので、文献的考察を踏まえて報告する。

## 症例呈示

### 症例1：

1歳4月の女児。主訴は発熱、歩行障害。家族歴・既往歴は特記事項なし。現病歴は入院4週間前より感冒症状と発熱を認め、2週間前につかまり立ちをしなくなったため精査入院となった。入院時現症：体温38.4℃、血圧85/41mmHg、脈拍122bpm。股関節：明らかな異常所見なし、可動域制限なし。視診上は明らかな外表奇形を認めず、また腱反射の病的反射も認めなかった。両下肢を他動的に動かすと啼泣あり。入院時検査所見は、血液検査では炎症マーカーである白血球数：6800/ $\mu$ L、赤血球沈降速度（erythrocyte sedimentation rate；ESR）：58mm/2時間、C反応性蛋白（C-reactive protein；CRP）：13.1mg/dL、血清interleukin-6（IL-6）：26 pg/mL（正常<9.6 pg/mL）が上昇していた。髄液検査（第1病日）は蛋白：163mg/dL、細胞数：330/ $\mu$ L、糖：61mg/dLであり、髄液IL-6：64 pg/mLが上昇していた。血液・尿・髄液培養は陰性であった。先天性免疫不全症を示唆する生化学的所見は認めなかった。入院時の咽頭ぬぐい液でA群 $\beta$ 溶血連鎖球菌抗原が陽性であったため、抗菌療法（ABPC/SBT：200mg/kg/day）を開始した。第2病日に施行した脊椎MRIにてL5およびS1椎体はT1強調像で軽度低信号、T2強調像で軽度高信号（**図1**）、脂肪抑制T2強調像で軽度高信号を呈しており、椎体椎間板炎に続発する髄膜炎と診断した。以降はABPC/SBTを300mg/kg/dayに増量して加療継続した。徐々に歩行可能となり、第26病日に各種炎症マーカーが正常値を示したため内服（AMPC：30 mg/kg/day）に変更し、計8週間で抗菌療法を終了とした（**図2**）。現在、3歳の時点で明らかな神経学的後遺症は認めない。



**図1** MRI所見（T2強調画像）

症例1（第2病日）：L5、S1椎体およびL5/S1椎間板に軽度高信号を認める。

症例2（第3病日）：L4、L5椎体およびL4/L5椎間板に高信号を認める。

### 症例2：

11か月の女児。主訴は発熱、歩行障害。既往歴・出生歴・発達歴では、母親が精神発達遅滞であるため、姉とともに児童福祉施設入所中である。現病歴は4週間前より感冒症状および発熱が出現し、2週間前より不機嫌およびつたい歩きが不能となり、座位保持ができなくなったため近医を受診した。同院にて右股関節炎が疑われ、当院に精査加療目的で入院となった。入院時現症：体温38.0℃、血圧124/F mmHg、脈拍128bpm。股関節に可動域の制限なく、発赤・腫脹・熱感は認めなかった。腱反射の病的反射は認めなかったが、他動的に右股関節を動かすと嫌がる仕草をした。入院時検査所見は、血液検査では白血球数：15000/ $\mu$ L、ESR：81.0mm/2時間、CRP：2.8mg/dL、血清IL-6：21 pg/mLと炎症マーカーが上昇していた。髄液検査（第1病日）は蛋白：785mg/dL、細胞数：1500/ $\mu$ L、糖：75mg/dLであり、髄液IL-6：81.9 pg/mLが上昇していた。血液・尿・髄液培養は陰性であった。先天性免疫不全症を示唆する生化学的所見は認めなかった。血液・髄液所見から細菌性髄膜炎も鑑別にあげ、第1病日よりABPC/SBT（200mg/kg/day）にて加療開始した。第3病日に施行した脊椎MRIではL4およびL5椎体はT1強調像で低信号、T2強調像で高信号（**図1**）、脂肪抑制T2強調像でも高信号を呈しており、膿瘍を伴う椎体椎間板炎に続発する髄膜炎と診断した。入院後経過は、第6病日には座位・寝返りが可能となり、第15病日はつかまり立ちが可能となった。しかし画像上は第14病日の腰椎MRI施行で高信号所見が持続

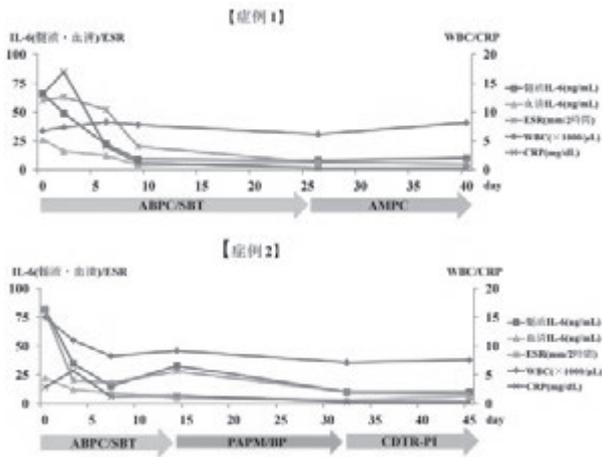


図2 臨床経過

矢印は各種抗菌薬の投与期間を示す。

略語：IL-6:interleukin-6、ESR: erythrocyte sedimentation rate、WBC: white blood cell、CRP: C-reactive protein

しており、炎症マーカー（特に髄液IL-6、ESR）が上昇傾向を示したためABPC/SBTからPAMP/BP (80mg/kg/day)へ薬剤変更した。第32病日に各種炎症マーカーも正常値を示していたため内服 (CDTR-PI: 10mg/kg/day)に変更し、計8週間で抗菌療法を終了とした (図2)。現在、9歳の時点で明らかな神経学的後遺症は認めない。

## 考察

小児の化膿性脊椎炎の初発症状は腰痛・背部痛・頸部痛などの局所の疼痛が75%、発熱が40.6%と高い頻度で認めるが<sup>1)</sup>、ほかに歩行困難・起立不能、姿勢異常、下肢痛・しびれ、股関節痛、腹痛、臀部痛、血尿など多岐にわたる<sup>4,10)</sup>。特徴的な所見に乏しく、特に自験例のように乳幼児期の発症例では早期診断が困難なことが多い。性差は明らかになく、好発部位は腰椎 (罹患高位はL4-5が44.3%と最多)であり、椎体に加えて近接する椎間板、脊椎管内の硬膜外腔、傍椎体の軟部組織にも連続した感染病変を形成する<sup>1,2,4)</sup>。自験例では症例1がL5-S1、症例2がL4-5であり、好発部位に合致していた。発症型 (Kulowski分類)の頻度は、成人領域では亜急性の発症経過が49%と多いが<sup>11)</sup>、小児領域では急性経過が72%と最多である<sup>1)</sup>。自験例2例は臨床経過より亜急性発症型と考えられた。

病態の発生機序は、脊椎および周辺組織に起炎菌が血行性に散布され、感染病巣が直接または間接的に波及することで生じる<sup>12-15)</sup>。脊椎への感染経路は静脈系、動脈系のいずれの経路も介しうる。静脈系

の経路では、骨盤内感染巣からBatson静脈叢を經由し腰椎に播種されるために腰椎病変が多い。また動脈系は脊椎に分布する動脈は発症年齢で異なり、15歳以下では終動脈は椎体終板を穿通し椎間腔へ進入するため、初期病巣を椎間板に形成することが多い<sup>12)</sup>。

本邦における小児期発症の報告は散見されるが、画像診断の進歩とともに報告数は増加している。飯田ら<sup>5)</sup>によると1990年以降で64例 (日齢45～15歳、性別：男児34例、女児30例)の報告がある。発症年齢は11-15歳の学童期後半が約70%を占めていた。1歳台までに発症した報告例は4例であり、うち基礎疾患を有する例 (日齢45、早産児にてNICU入院中に発症)を除くと3例のみであった。基礎疾患を有さない乳幼児例では、自験例 (症例2)が最年少発症であった。また今回2例とも先行する感冒症状のエピソードがあり、前述の解剖学的経路を介して脊椎感染を合併したと推測される。過去の報告では症状が出現してから診断まで最長で3か月を要した症例もあるが、自験例も乳幼児であったため発熱精査を進めたうえで診断にいたった。起炎菌はグラム陽性菌が60～70%で、黄色ブドウ球菌が50%を占めるが、起炎菌の検出率は50%以下と低く最終診断にいたりにくい<sup>4,9,10)</sup>。国内での報告例ではMSSA (Methicillin-Susceptible Staphylococcus aureus)とサルモネラが9割以上を占める。自験例でも先行感染は認めていたが (症例1:咽頭ぬぐい液よりA群 $\beta$ 溶血連鎖球菌抗原陽性)、血液培養が陰性であり、最終的に起炎菌は同定されなかった。単純X線は自験例2例とも症状出現から1か月以内であったので、病変の描出が理論上は可能だが、画像診断は困難であった。化膿性脊椎炎の早期診断にはMRIが有用であり、罹患椎体がT1強調画像で低信号、T2強調画像で高信号を呈する。成人例ではMRIは発症2週間以内で大部分の症例が描出され<sup>16-18)</sup>、感度93～96%、特異度92～97%と報告されているが<sup>17,18)</sup>、小児領域でも診断への有用な手段と思われる。

今回、化膿性脊椎炎の診断および治療評価の指標として4種類の炎症マーカー (白血球数、CRP、ESR、IL-6)を参考にした (図2)。過去の報告に多い白血球数、CRP、ESRとくらべて、炎症性サイトカインの代表であるIL-6はより早期に上昇しており、画像所見と合わせて診断にいたり、すみやかに治療へ移行することができた。また症例2で画像上、異常信号が持続した時期 (第14病日前後)に炎症マーカー (特に髄液IL-6とESR)の推移が病勢と一致していたことから、診断だけでなく治療効果の指標

としても有用と考えられた。

### 結論

乳幼児期の亜急性化膿性脊椎炎に続発した髄膜炎の2例を経験した。幼児の不明熱および歩行障害の原因に、まれであるが脊椎感染を鑑別にあげる必要がある。早期診断にはMRIが有用であり、またIL-6やESR等の炎症マーカーを診断の手がかりとし、その経時的変化を追うことで治療効果の指標とすることができた。

### 文献

- 1) Patricia M, Robert M, Helder H: Spinal infections in children: a review. *Int. Orthop* 36:387-395, 2012.
- 2) J Chandrasenan, Z Klezl, R Bommireddy, et al: Spondylodicitis in children. *J Bone Joint Surg* 93-B:1122-1125, 2011.
- 3) Saisu T, Kawashima A, Kamegaya M, et al: Humeral shortening and inferior subluxation as sequelae of septic arthritis of the shoulder in neonates and infants. *J Bone Joint Surg* 89-A:1784-1793, 2007.
- 4) 高橋真由, 寺田光次郎, 森井麻祐子, ほか: 腸腰筋膿瘍を伴った化膿性脊椎炎の1歳男児例. *臨床小児医学* 57: 63-66, 2009.
- 5) 飯田泰明, 高橋寛: 小児の感染性脊椎炎. *整形・災害外科* 55: 27-35, 2012.
- 6) 星野顕宏, 佐藤祐子, 松橋一彦, ほか: 小児脊椎感染症の2例. *日本小児放射線学会雑誌* 27: 71-76, 2011.
- 7) 相原利男, 保田勉, 五十嵐秀俊: 乳児化膿性脊椎炎の1例. *整形外科* 58: 415-418, 2007.
- 8) 両角正義, 出口正男: 保存療法にて軽快した9歳の化膿性脊椎炎の1例. *中部整形外科災害外科学会雑誌* 52: 1379-1380, 2009.
- 9) 星野顕宏, 佐藤祐子, 松橋一彦, ほか: 小児脊椎感染症の2例. *日本小児放射線学会雑誌* 27: 71-76, 2011.
- 10) 國重美紀, 伊藤希美, 宇加江進, ほか: 腰痛, 発熱を主訴に当初腎盂炎を疑われた化膿性脊椎炎の1例. *臨床小児医学* 52: 119-122, 2004.
- 11) 山下彰久, 白澤建藏, 林哲生: 化膿性脊椎炎のコントロール. *整形外科* 62: 307-311, 2011.
- 12) 赤木繁夫: 化膿性脊椎炎, 最新整形外科学大系第12巻, 東京, 2006, pp339-348.
- 13) 土屋一洋: 脊椎炎と椎間板炎, 脊椎・脊髄のMRI, 南江堂, 東京, 2003, pp139-142.
- 14) An HS, Seldomridge JA: Spinal infections: diagnostic tests and imaging studies. *Clin Orthop Relat Res* 444:27-33, 2006.
- 15) 千葉一裕, 松本守雄, 戸山芳昭, ほか: 脊椎・脊髄, 整形外科専門医になるための診療スタンダード1, 羊土社, 東京, 2008, pp18-53, pp89-114.
- 16) Wang Q, Babyn P, Branson H, et al: Utility of MRI in the follow-up of pyogenic spinal infection in children. *Pediatr. Radiol* 40:118-130, 2010.
- 17) Cottle L, Rierdan T: Infectious spondylodiscitis. *J Infect* 56:401-412, 2008.
- 18) Varma R, Lander P, Assaf A: Imaging of pyogenic infectious spondylodiscitis. *Radiol Clin North Am* 39: 203-213, 2001.

## 学会の現況

(2014年7月31日現在)

顧問 (4名)	井形 昭弘	加地 正郎	倉田 毅	萬年 徹			
特別功労会員 (10名)	糸山 泰人 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 (25名)	渥美 哲至 内野 誠 岡部 信彦 小鹿 幸生 岸田 修二	栗原 照幸 栗山 勝 黒岩 義之 黒田 康夫 清水 輝夫	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 悌司 湯浅 龍彦 若山 吉弘		
理 事 長	水澤 英洋						
理 事 (10名)	池田 修一 大原 義朗	亀井 聡 辻 省次	中川 正法 布井 博幸	原 寿郎 細矢 光亮	水澤 英洋 山田 正仁		
監 事 (2名)	楠原 浩一	西條 政幸					
評 議 員 (150名)	相原 正男 綾部 光芳 荒木 俊彦 荒木 信夫 有村 公良 飯田 慶治 飯塚 高浩 池田 昭夫 池田 修一 石川 欽也 石川 晴美 石崎 義人 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 植田 晃広 上野 聡 尾内 一信 大石 実 太田 宏平 大原 義朗 小川 克彦 影山 恭史 梶 龍兒	形岡 博史 亀井 聡 河島 尚志 河村 満 神田 隆 岸田 日帯 木村 成志 吉良 潤一 吉良 龍太郎 楠 進 楠原 浩一 久保田 龍二 倉根 一郎 栗田 正 黒田 宙 小島 重幸 西條 政幸 齊藤 峰輝 佐々木 秀直 佐多 徹太郎 佐藤 克也 塩田 宏嗣 塩見 正司 宍戸-原 由紀子 嶋崎 晴雄 自見 隆弘 下濱 俊 東海林 幹夫 調 漸 新藤 和雅	杉浦 嘉泰 鈴木 重明 鈴木 則宏 鈴木 裕 鈴木 ゆめ 砂田 芳秀 瀬川 文徳 祖父江 元 平良 直人 高嶋 博 高梨 潤一 高橋 輝行 高橋 幸利 高橋 良輔 高橋 若生 瀧山 嘉久 田中 恵子 田中 正美 谷脇 考恭 玉岡 晃 田村 正人 千葉 進 辻 省次 坪井 義夫 出口 一志 土井 宏 道勇 学 富樫 慎治 長尾 雅裕 中川 正法	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 中村 龍文 長山 成美 滑川 道人 成田 光生 西澤 正豊 布井 博幸 野倉 一也 野村 恭一 野村 恵子 浜口 毅 濱野 忠則 原 寿郎 平井 利明 平田 幸一 平山 幹生 藤田 浩司 藤田 信也 藤田 之彦 藤原 一男 淵上 達夫 法化 陽一 細矢 光亮 前垣 義弘	松井 尚子 松井 真 松本 昌泰 三浦 義治 三木 健司 水口 雅 水澤 英洋 武藤 多津郎 村井 弘之 村上 龍文 村田 顕也 村山 繁雄 望月 秀樹 森内 浩幸 森田 昭彦 矢部 一郎 山田 正仁 山中 岳 山野 嘉久 山内 秀雄 山本 知孝 雪竹 基弘 横田 隆徳 吉井 文均 吉川 哲史 吉川 秀人 芳川 浩男 吉田 誠克 吉田 眞理 米田 誠		
逝 去 会 員 (1名)	中野 今治 (2014/7/16逝去)						
賛 助 会 員	グラクソ・スミスクライン株式会社						
総 会 員 数	562名 (一般会員 : 371名)						
事 務 局	株式会社 春恒社						

(五十音順)

# 日本神経感染症学会 会則

第1条 本会は日本神経感染症学会（Japanese Society for Neuroinfectious Diseases）と称する。

第2条 本会は神経感染症に関わる基礎的及び臨床的研究と教育の発展を図り、併せてその成果を社会へ還元することを目的とする。

第3条 本会の目的を達成するために次の事業を行う。

- (1) 年次集会「日本神経感染症学会 総会・学術集会」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、教育および啓発活動

第4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あって、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5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、年次集会「総会・学術集会」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、評議員の中より2名の監事を任命する。  
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6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) 年次集会「日本神経感染症学会 総会・学術集会」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・教育などの事業
  - (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7条 本会の事務局は、評議員会の指定するところにおく。

- 第8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。

附則1 本会の事務局は、当分の間、株式会社春恒社におく。

附則2 本会則は2006（平成18）年4月1日から実施する。

附則3 本会の会費は年額以下のごとく定める。

**【会費】**

一般会員	—————	¥7,000-
評議員	—————	¥9,000-
理事	—————	¥10,000-
賛助会員	—————	¥50,000- (一口) ※一口以上

[2005（平成17）年10月20日 一部変更]

[2010（平成22）年10月 7日 一部変更]

[2012（平成24）年10月19日 一部変更]

# 『NEUROINFECTION』 投稿規程

[2012年12月改訂]

[2013年 5月改訂]

[2013年 9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、英文の論文も受け付ける。
- 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、カラー写真を希望と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

但し、学術集会の会長講演・特別講演・教育講演・シンポジウム等の総説掲載については、英文抄録は不要とする。

## 3. 執筆要項

- 1) 原稿送付先

〒169-0072 東京都新宿区大久保 2-4-12 新宿ラムダックスビル 9F  
 株式会社春恒社 学会事業部(内)  
 日本神経感染症学会 事務局 編集委員長 宛  
 電話：03-5291-6231 FAX：03-5291-2176

- 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CD-R、USBメモリーとする。  
 （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 [様式1] 投稿承諾書、必要な場合は [様式2] 患者同意書、および利益相反に関する [様式3] 自己申告書 (COI) 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、症例という項目を掲げてよい。
- 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<sup>®</sup>、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21cm×14cmを限度とする。写真は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は肩番号で記す。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名以上の場合には3名連記の上、「ほか」あるいはet al.とする。
- 15) 患者同意書は個人情報保護の観点から、顔写真など患者個人の同意書が必要とされる情報を論文に掲載する場合は、著者が必ず投稿前に患者から同意書を取得し、原本は手元で保管して、コピーを編集委員会へ提出する。書式は本誌指定の書式を用いること。  
 複数の患者・家族からの同意書を必要とする場合には、全員から同意書を得ること。  
 また、意識障害や認知症などにより当該個人から同意書を得ることが困難な場合は、適切な代諾者(配偶者、親、子、後見人など)の同意でもよい。本人が死亡している場合は遺族からの同意書を得ること。

#### 4. 研究倫理の遵守と個人情報保護の方針

研究倫理の遵守と個人情報の保護については以下に則るものとする。

##### 1) 臨床研究

厚生労働省の各種“医学研究に関する指針”、特に“臨床研究に関する倫理指針”を遵守し、課題によっては各施設で研究倫理審査を受けること。

指針は以下のWeb siteに掲載されているので参照すること。

<http://www.mhlw.go.jp/general/seido/kousei/i-kenkyu/rinsyo/dl/shishin.pdf>

##### 2) 症例報告

遺伝学的検査については被験者より予め文書で同意を得ていること。

さらに、個人情報保護のために、論文に記載する個人情報\*は、学術的に必要な範囲に留め、個人が特定されないように充分配慮すること。原則的に診療年月日は月(上、中、下旬)までとし、出身地・

居住地は原則として都道府県までに留めること。

学術的価値により、顔写真など個人が特定される情報を掲載する必要がある場合には、予め患者・家族の同意書を要する。

\*注)：個人情報には以下のものが含まれる。

「個人名」、「イニシャル」、「診療録ID」、「生年月日」、「診療年月日」、「出身地」、「居住地」、「顔を含んだ身体写真」など。

## 5. 利益相反にかかわる自己申告

教育、研究という学術機関、学術団体としての責任と、産学連携活動に伴い生じる個人の利益とが衝突・相反する状態（利益相反 conflict of interest: COI）が必然的・不可避免的に生じてきている。この利益相反状態を日本神経感染症学会が適切に管理（マネジメント）して、初めて学会員が国民に信頼される教育・研究・診療活動を行うことが可能になる。日本神経感染症学会としては、「臨床研究の利益相反（COI）に関する共通指針（以下「共通指針」という）」に則り、本学会における運用として、投稿に際しては利益相反にかかる文書を添付するものとする。（COIの用紙を使用。）

## 6. 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、亀井聡、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：海馬に局限したMRI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

西暦 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)

事務局記録	論文番号	受理(西暦)	年	月	日
-------	------	--------	---	---	---

## 患者同意書

私は、自身に関係する情報が下記論文に含まれることの説明を受け、下記論文が日本神経感染症学会が刊行する学術誌「NEUROINFECTION」に掲載されることに同意します。

論文題名： \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

筆頭著者名： \_\_\_\_\_

(西暦) 年 月 日

患者署名： \_\_\_\_\_ ①

代諾者署名： \_\_\_\_\_ ①

(患者自身が署名できない場合)

## NEUROINFECTION 自己申告によるCOI報告書

著者全員氏名：(コンマで区切ってご記載ください)：

---



---

論文題名：\_\_\_\_\_

(著者全員について、投稿時から遡って過去1年間以内での発表内容に関する企業・組織または団体とのCOI状態を記載)

項目	該当の状況	有であれば、著者名：企業名などの記載
① 報酬額 1つの企業・団体から年間100万円以上	有・無	(記載例、日本太郎：○×製薬)
② 株式の利益 1つの企業から年間100万円以上、あるいは当該株式の5%以上保有	有・無	
③ 特許使用料 1つにつき年間100万円以上	有・無	
④ 講演料 1つの企業・団体からの年間合計50万円以上	有・無	
⑤ 原稿料 1つの企業・団体から年間合計50万円以上	有・無	

<p>⑥ 研究費・助成金などの総額</p> <p>1つの企業・団体からの研究経費を共有する所属部局（講座、分野あるいは研究室など）に支払われた年間総額が200万円以上</p>	有・無	
<p>⑦ 奨学（奨励）寄付などの総額</p> <p>1つの企業・団体からの奨学寄付金を共有する所属部局（講座、分野あるいは研究室など）に支払われた年間総額が200万円以上</p>	有・無	
<p>⑧ 企業などが提供する寄付講座</p> <p>（企業などからの寄付講座に所属している場合に記載）</p>	有・無	
<p>⑨ 旅費、贈答品などの受領</p> <p>1つの企業・団体から年間5万円以上</p>	有・無	

（本COI申告書は論文掲載後2年間保管されます）

申告日（西暦） 年 月 日

Corresponding author（署名） \_\_\_\_\_ (印)

### ※Corresponding author各位

投稿論文が採択され雑誌に掲載された際には、申告されたCOI状態について、論文末尾、謝辞または引用文献の前に掲載いたします。開示すべきCOI 状態がない場合にも、その旨を同部分に掲載いたします。

例1：本論文に関連し、開示すべきCOI状態にある企業・組織や団体  
 研究費・助成金：〇〇製薬  
 奨学寄付金：〇〇製薬  
 寄付講座：〇〇製薬

例2：本論文に関連し、開示すべきCOI状態にある企業、組織、団体はいずれも有りません。

編集責任者 亀井 聡

---

**Neuroinfection 第 19 卷 1 号**

**発行 2014 年 7 月 31 日**

**発行者 水澤 英洋**

**発行所** 日本神経感染症学会事務局  
〒 169-0072 東京都新宿区大久保 2-4-12  
新宿ラムダックスビル 9F  
株式会社 春恒社 学会事業部内  
TEL: 03-5291-6231  
FAX: 03-5291-2176

**印刷所** 株式会社 春恒社  
〒 169-0072 東京都新宿区大久保 2-4-12  
新宿ラムダックスビル 9F  
TEL: 03-5291-6231  
FAX: 03-5291-2177

---