

ISSN 1348-2718

NEUROINFECTION

神経感染症

Vol. 17 No. 1 2012

日本神経感染症学会

Japanese Society for Neuroinfectious Diseases

目 次

第16回日本神経感染症学会学術集会	辻 省次
会長講演 感染症診療におけるゲノム解析の意義と展望	辻 省次 1
特別講演 HAMの最新の話題	出雲 周二 6
教育講演1 神経感染症における宿主側遺伝的要因	楠原 浩一 11
教育講演2 マイコプラズマ肺炎後のADEMとGBS	楠 進 20
シンポジウムⅠ 「ゲノムから見た感染症」	
同じ病原菌種内での菌株の違いをゲノムからみる：病原性大腸菌を例として	林 哲也 26
網羅的ゲノム解析によるヒラメ喫食に関連する嘔吐下痢症の原因物質の探索	大西 真 35
真菌症のゲノム診断	楳村 浩一 42
脳膿瘍のゲノム診断	斎藤奈穂子 49
シンポジウムⅡ 「ワクチン接種後脳症について」	
日本のワクチン政策の問題点	中山 哲夫 56
ワクチン接種後脳炎・脳症について	栗山 勝 61
ワクチン接種と副反応の現状	永井利三郎 67
ワクチン接種後脳症について:ADEM	岸 崇之 70
シンポジウムⅢ 「震災と感染症」	
東日本大震災と感染症ーその概要と問題点	賀来 満夫 76
東日本大震災における破傷風症例7例の検討	森野 一真 77
震災時の感染症対策～スマトラの経験を東日本大震災に生かす～	加來 浩器 83
シンポジウムⅣ 「急性脳炎脳症」	
小児の脳炎・脳症	塙見 正司 86
脳症と代謝異常症	高柳 正樹 93
脳症の臨床特徴・自己抗体(抗グルタミン酸受容体抗体)：小児科領域	高橋 幸利 100
成人の辺縁系脳炎	亀井 聰 107
シンポジウムⅤ 「神経ウイルス感染症の最前線」	
HIV脳症の臨床と病理	岸田 修二 115
HTLV-1関連脊髄症の病因と病態	齊藤 峰輝 122
アシクロビル耐性単純ヘルペスウイルスによる中枢神経感染症	西條 政幸 132
プリオൺ病研究の最前線	堂浦 克美 136
原著論文 発熱から神経症状発現までの時間からみた	
pandemic influenza A (H1N1) 2009脳症の病型と予後との関連	森地振一郎 142
役員一覧	148
会則	149
投稿規程	151
投稿承諾書	153
編集者	

第16回日本神経感染症学会学術集会

第16回日本神経感染症学会学術集会会長 辻省次

第16回日本神経感染症学会学術集会(大会長 東京大学 辻省次)が、「グローバル化時代の神経感染症」をテーマに、2011年11月4、5日の日程で、学術総合センター(東京)にて開催されました。参加者は306名に上り、活気のある学会となりました。本学術集会では、グローバル化時代における、新興感染症、再興感染症、多剤耐性菌への対応などを積極的に取り上げるようにしました。また、本年3月11日の東日本大震災の発生を受けて、「震災と感染症」をテーマとしたシンポジウムを企画いたしました。

特別講演として「HAMの最新の話題(鹿児島大学 出雲周二)」、会長講演として「感染症診療におけるゲノム解析の意義と展望」、教育講演として「神経感染症における宿主側遺伝的要因(産業医科大学 楠原浩一)」、「マイコプラズマ肺炎後のADEMとGBS(近畿大学 楠進)」が取り上げられ、シンポジウムとしては、「ゲノムから見た感染症」、「ワクチン接種後脳症について」、「震災と感染症」、「急性脳炎脳症」、「神経ウイルス感染症の最前線」がとりあげられました。一般演題は115演題と例年以上に多く、密度の濃い発表、討議が行われました。

本学術集会では、感染症診療におけるゲノム解析の意義が、会長講演、シンポジウムで取り上げられました。細菌の16S rRNA遺伝子解析により、網羅的な起因菌の探索が可能であることが報告され、本法の優れた感度、臨床的有用性が示されました。特に、培養による起因菌の同定が困難な場合が多い抗菌剤投与下でも、本法が適用できることが特筆すべき点であります。この方法では薬剤感受性までは同定できませんが、起因菌が同定されれば、それだけでも治療戦略上非常に有用な情報となること、また、目標とする細菌が絞り込まれれば、培養条件を最適化し、起因菌の培養が可能となる場合があることなども重要であると考えられます。さらには、メタゲノム解析による起因菌の同定や腸内細菌叢研究への応用例などが紹介されました。今後、このようなゲノム解析を、本学会として、感染症診療に普及させていくことの重要性が指摘されました。

「震災と感染症」シンポジウムでは、東日本大震災の被災地で感染症の診療にあたられた東北大学の賀来満夫先生、福島県立救命救急センターの森野一真先生、防衛医科大学校の加來浩器先生から、震災現場での感染症への取り組みについてご発表をいただきました。賀来先生からは、レジオネラ、インフルエンザ、破傷風などへの取り組みの重要性とともに、従来の定点医療機関でのサーベイラインスが不可能となった広域災害における避難所でのリスクアセスメント、ニーズアセスメントの必要性と難しさについてのご指摘がありました。初動時からの迅速な対応として、各避難所へ出向いての感染対策マニュアルの配布が有効だったこと、インフルエンザに対する感染予防対策の必要性、状況に応じてタミフルなどを予防的に用いる必要性なども討議されました。森野先生からは、破傷風が9例と、この時期にしては頻発したこと、自律神経系の障害が強い場合の硫酸マグネシウムの有効性が指摘されました。破傷風に対する抗菌薬としてわが国ではペニシリンが用い

られていますが、わが国では未採用のメトロニダゾール静注製剤の必要性も指摘されました。加來先生からは、2004年のスマトラ沖地震津波災害での経験を元に開発された避難所サーベイランス (Daily Surveillance for Outbreak Detecting、DSOD) の有効性が報告されました。これはタブレット型多機能通信端末を用いて収集された各避難所のデータを集約・分析し、情報を避難所の地図情報に連動させて迅速に還元するシステムであり、産官学共同の取り組みの成果として紹介されました。岩手医科大学の発案による Infection Control Assistance Team が重要な役割を果たしたことも紹介されました。より広域できめ細かいサーベイランスと確実な情報提供の体制をいかに早期に構築するかが本シンポジウムで共有された課題であり、このためには調整窓口の一本化が必要で、地域(県)の中枢の機能が失われる広域災害における対応は、予め国レベルで決めておく必要があることも指摘されました。診療録が失われたことも問題点として指摘され、今後、電子カルテをクラウド上で共有できる態勢なども検討が必要と考えられました。また、ボランティアの参加に関しては、持ち込まれる可能性がある感染症への注意や、破傷風ワクチンの積極的な接種の必要性も指摘されました。震災に関連しては、一般演題でも、津波肺に合併した脳室内膿瘍 (Scedosporium 感染症) で、Voriconazole 等の治療が奏功した症例の報告がありました。

以上のように、神経感染症に関する幅広い分野の発表があり、特に、感染症におけるゲノム解析の意義、広域災害時の感染症への対応と検討課題など、重要な課題について、活発な討議が行われ充実した学術集会となりました。

会長講演

感染症診療におけるゲノム解析の意義と展望

辻 省次

Key words: DNA検査、メタゲノム解析、感染症、16S rRNA、次世代シーケンサー

はじめに

抗菌薬の開発が進んでいる現代においても、多剤耐性菌の出現、新興感染症、再興感染症の出現など、今日においても、感染症は、診療上重要な領域でありつづけている。特に、神経感染症の領域では、より良い機能予後のためには、早期の診断と、一刻も早い適切な治療の開始が望まれる。細菌性感染症の診断は、病原菌の培養による菌種の同定と抗菌薬に対する感受性の分析が基本であるが、病原菌の培養に一定の時間を要すること、また、日常診療においては、empiricに抗菌薬の投与が行われ、そのような条件下では、病原菌の培養が困難であり、病原菌の同定ができないケースが少なくない。病原菌の速やかな同定を目的として、病原菌のゲノムを、ポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction, PCR) によって同定する方法が開発され、日常診療に導入され、診療上不可欠の検査となっている。特に、結核菌の検出などにおいては、培養に長期の期間を要することからその有用性は高い。

一方、PCRによる遺伝子検査は、検出感度が高いこと、数時間という短時間で結果が得られるという大きな利点があるが、検査の対象となる病原菌があらかじめ定まっている必要があり、さまざまな種類の病原菌を考慮する必要のある日常診療においては、PCRによる検査法には一定の限界がある。このような背景から、病原菌のゲノム配列を直接的に解析することにより病原菌の同定ができれば、日常診療の上で、大変有用であると考えられる。近年になり、ゲノム配列解析技術の目覚ましい進歩があり、病原菌のゲノム配列を直接的に解析することが

可能になってきている。本稿では、感染症診療におけるゲノム解析の意義と展望について述べる。

1. 対象とする病原微生物が特定される場合 (PCRによる病原微生物の同定方法)

現在では、PCRによる病原微生物の検出が日常診療において頻用されるようになっている。筆者の研究室では、結核菌の迅速診断が必要であると考え、1990年に、PCRを用いた結核菌の検出法を報告した¹⁾。結核菌に関しては、鏡検による検出率が10-20%程度、培養による結核菌の同定には、8週間もの期間を要すること、培養により結核菌同定ができるのは50%以下であることを考えると、画期的な方法であった。single stepのPCRによる結核菌の検出の感度は、我々の研究室の予備的検討では、30コピーハー以上あれば確実に検出できるものであったが、その後、結核菌のPCRによる同定方法は、nested PCR法など改良されてきており、検出感度はさらに高くなっている^{2,3)}。

2. ゲノム配列解析を応用した、 病原微生物の同定方法

病原微生物のゲノム配列解析ができれば、原理的に病原微生物の同定が可能になると考えられる。ゲノム配列の解析方法としては、大きく分けて、1. 細菌間で保存性の高い16S rRNA遺伝子をPCRにより增幅し配列解析をする方法、2. 検体中に存在する病原微生物のゲノムについて、丸ごとゲノム配列解析を行い、そのデータを分析することによりそ

こに存在する微生物をすべて同定しようとする、メタゲノム解析と呼ばれる方法の2つがある。

A. 16S rRNA 遺伝子解析による病原菌の同定

細菌の16S rRNA（リボソームRNA）をコードする遺伝子は、機能に関連すると考えられる保存性の高い領域に可変領域が混在する構造を取っている。可変領域には、9個の高頻度可変領域(hypervariable region)が含まれている（図1）。この高頻度可変領域は、50-100塩基の長さで、この配列を調べることで、菌種の同定が可能である。すなわち、普遍領域にPCRプライマーを設定すれば、いずれの細菌の16S rRNA遺伝子であっても増幅することができ、得られたPCR産物について、直接塩基配列解析により高頻度可変領域の塩基配列を決定すれば菌種の同定が可能である⁴⁾。

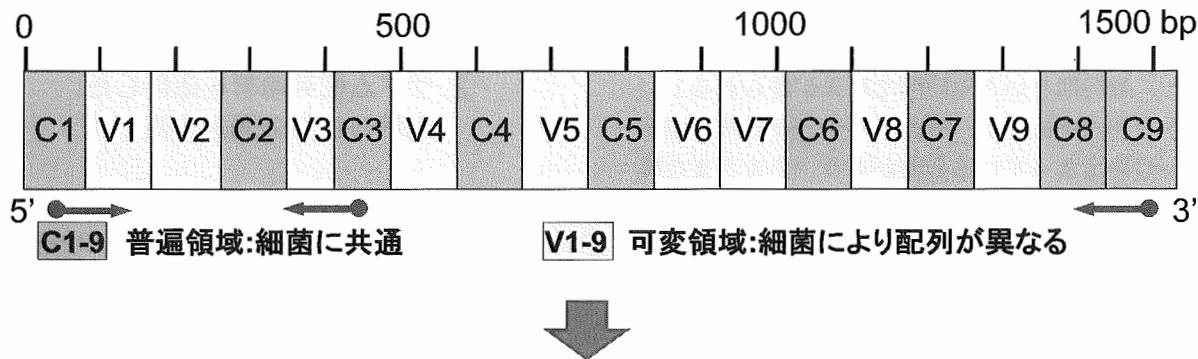
最近われわれが経験した症例で、起因菌の同定が困難で、empiric therapyを継続するも、病状の悪化がみられた脳膿瘍の症例について、脳膿瘍の穿刺液を用いて、16S rRNA遺伝子のPCR増幅、塩基配列解析を行い、*Streptococcus intermedius*が起因菌であることを同定することができた⁵⁾。菌種が同定されたことから、enrichment mediumを用いた培養ができ、抗菌薬感受性も確認できた。この症例では、抗菌薬の副作用により、経過中に抗菌薬の変更が必要であったが、菌種、感受性が確認されたことから、抗菌薬のステップダウンも可能で、後遺症なく完治して退院に至った。もう一例は、肺炎

球菌性髄膜炎の症例で、経過中に両側腸腰筋膿瘍を合併した。腸腰筋膿瘍の穿刺生検を施行し、培養により起因菌の同定を試みたがno growthであった。その後、抗菌剤投与にもかかわらず、膿瘍は増大した。CTガイド下右腸腰筋膿瘍ドレナージ術を施行した。ドレナージ液の培養では起炎菌は同定されなかつたが、16S rRNA 遺伝子解析を施行したところ、肺炎球菌(Hungary19A-6株)と直ちに同定でき、髄膜炎と同一の起因菌と考えられた。このように、培養では起因菌の同定ができない場合であっても、16S rRNA 遺伝子解析により速やかに起因菌の同定ができたことは、診療上、特に、抗菌薬の選択において大変有用であった。

16S rRNA 遺伝子解析では、細菌に共通な16S rRNA領域の増幅を行い、直接塩基配列解析を実施し、高頻度可変領域の塩基配列により細菌の同定が可能となるので、起因菌について幅広く検索できるという点が最大のメリットである。また、抗菌薬投与下においては、培養が困難なことが多く、その点でも、16S rRNA 遺伝子解析の有用性は高い。この方法では、抗菌薬の感受性まで調べることはできないものの、菌種が同定されると、抗菌薬の選択に反映できることが多く、大変有用である。また、適切な培地、培養法を選択することにより培養可能になることもあり、その点でも有用である。

課題としては、16S rRNA 遺伝子解析は、現在のところ、保険収載されておらず、このような解析技術を持っている研究室も限られており、普及して

1. 普遍領域に設定したプライマーを用いて、16S rRNA 遺伝子をPCRにより増幅



2. PCR産物の直接塩基配列決定

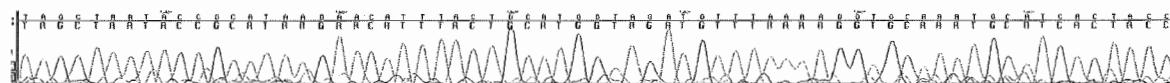


図1 16S rRNA遺伝子解析の原理

いない点である。診療上の有用性は極めて高いので、技術の普及、保険収載の実現など、今後関係者の努力が期待されるところである。

B. メタゲノム解析による微生物の同定

16S rRNA遺伝子解析は、細菌の16S rRNAをターゲットとした解析方法であるが、未知の病原微生物を幅広く検索する上では、限界もある。これに対して、微生物のゲノムについて、丸ごと塩基配列解析をして、そこに存在する微生物を網羅的に同定しようという方法がメタゲノム解析(metagenomics)と呼ばれる。従来のシーケンサーでこのような解析をすることは困難であったが、スループットがきわめて大きい次世代シーケンサーと呼ばれる新型高速シーケンサーが実用化されたことにより、メタゲノム解析が可能になってきている。

メタゲノム解析により病原微生物を同定できた例として、2,010年にデンマークで発生したミンクの神経疾患(振戦、足取りの異常、失調症状)のアウトブレイクの例を挙げることができる⁶⁾。脳homogenatesを用いた伝播実験で発症が確認され、感染症であることは確定したものの、通常の病原微生物の探索方法では、病原微生物を同定することができなかつた。そこで、脳homogenatesを用いて、メタゲノム解析を行ったところ、astrovirusのゲノム配列が確認された。astrovirusは、離乳前のミンクに見られる下痢症の起因ウイルスとして知

られていたが、ゲノム配列解析からは、下痢症を引き起こすastrovirusに対してのidentityは80.4%で、新種のastrovirusと確認された。わが国では、原因不明の下痢症患者の便を用いたメタゲノム解析が報告されている⁷⁾。急性期と回復期の便のメタゲノム解析により、急性期にのみ存在した細菌として、*campylobacter jejuni*が確認された。今回の、日本神経感染症学会学術集会のシンポジウムI「ゲノムから見た感染症」で、国立感染症研究所の大西らにより「網羅的ゲノム解析によるヒラメ喫食に関連する嘔吐下痢症の原因物質の探索」が報告された。疫学的な研究により、嘔吐下痢症患者に共通してヒラメの喫食が突き止められ、ヒラメ筋肉組織を用いたメタゲノム解析が行われ、*Kudoa septempunctata*が検出され、予防のための対策がとられた⁸⁾。

メタゲノム解析は、このような病原微生物の同定だけでなく、腸内細菌叢の網羅的分析などにも応用されている。腸内細菌叢を構成する細菌は食生活の内容によって大きく変化することが知られており⁹⁾、健康への関わりという点でも興味深い。2型糖尿病患者の腸内細菌叢のメタゲノム解析では、2型糖尿病の患者にはフィルミクテス門とClostridia綱が劇的に減少、Betaproteobacteria綱が豊富に存在することが報告されており、腸内細菌叢への介入で耐糖能を改善できる可能性なども示唆されている¹⁰⁾。

1. 対象とする病原微生物が特定される場合

結核菌、各種ウイルスのPCR解析 → 高い検出率

→ 日常診療で普及

2. 対象とする病原微生物が特定できない場合

16S rRNA 遺伝子解析

- 難培養性の条件下でも病原菌の検出が可能

メタゲノム解析

- 未知の病原微生物の特定
- 複数の病原菌を網羅的に同定(メタゲノム解析)

3. メタゲノム解析研究分野→ヒトの健康・疾病との関連

図2 感染症診療におけるゲノム解析の意義と展望

まとめ

これまで、感染症診療においては、PCRを用いた病原微生物の検出が行われてきているが、対象とする病原微生物を特定する必要があった。これに対して、16S rRNA遺伝子解析や、メタゲノム解析は、対象とする病原微生物が特定できない場合や難培養性の場合などにおいて、非常に有力な解析方法となる。特に、抗菌薬投与下のように難培養性の条件下で、威力を発揮する。今後、感染症診断におけるゲノム解析を積極的に日常診療の中に位置づけていく必要がある。ゲノム解析技術の普及への取り組み、保険収載を目指した積極的な取り組みが求められる。

謝辞

16S rRNA遺伝子解析は、宮崎大学フロンティア科学実験総合センター・生命科学研究部門生命環境科学分野 林 哲也教授によって行っていただいた結果であり、ここに深く感謝します。

参考文献

- 1) Kaneko K, Onodera O, Miyatake T, Tsuji S. Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by polymerase chain reaction (PCR). *Neurology*. 1990;40(10):1617-8. Epub 1990/10/01.
- 2) Takahashi T, Nakayama T, Tamura M, Ogawa K, Tsuda H, Morita A, et al. Nested polymerase chain reaction for assessing the clinical course of tuberculous meningitis. *Neurology*. 2005;64(10):1789-93. Epub 2005/05/25.
- 3) Takahashi T, Tamura M, Takahashi SN, Matsumoto K, Sawada S, Yokoyama E, et al. Quantitative nested real-time PCR assay for assessing the clinical course of tuberculous meningitis. *Journal of the neurological sciences*. 2007;255(1-2):69-76. Epub 2007/03/14.
- 4) Petrosino JF, Highlander S, Luna RA, Gibbs RA, Versalovic J. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. *Clinical chemistry*. 2009;55(5):856-66. Epub 2009/03/07.
- 5) Saito N, Hida A, Koide Y, Ooka T, Ichikawa Y, Shimizu J, et al. Culture-negative Brain Abscess with Streptococcus intermedius Infection with Diagnosis Established by Direct Nucleotide Sequence Analysis of the 16S Ribosomal RNA Gene. *Intern Med*. 2012;51(2):211-6. Epub 2012/01/17.
- 6) Blomstrom AL, Widen F, Hammer AS, Belak S, Berg M. Detection of a novel astrovirus in brain tissue of mink suffering from shaking mink syndrome by use of viral metagenomics. *Journal of clinical microbiology*. 2010;48(12):4392-6. Epub 2010/10/12.
- 7) Nakamura S, Maeda N, Miron IM, Yoh M, Izutsu K, Kataoka C, et al. Metagenomic diagnosis of bacterial infections. *Emerging infectious diseases*. 2008;14(11):1784-6. Epub 2008/11/04.
- 8) Kawai T, Sekizuka T, Yahata Y, Kuroda M, Kumeda Y, Iijima Y, et al. Identification of *Kudoa septempunctata* as the Causative Agent of Novel Food Poisoning Outbreaks in Japan by Consumption of *Paralichthys olivaceus* in Raw Fish. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2012. Epub 2012/01/28.
- 9) De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poulet JB, Massart S, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(33):14691-6. Epub 2010/08/04.
- 10) Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FW, Nielsen DS, Andreasen AS, Pedersen BK, et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PloS one*. 2010;5(2):e9085. Epub 2010/02/09.

[Abstract] Despite advancement in development of antimicrobial agents, infectious diseases are still life-threatening diseases in the daily clinical practice. In particular, emerging and re-emerging infectious diseases as well as antibiotic-resistant microorganisms are contemporary issues in this field. Various measures for the rapid diagnosis of infectious diseases have been developed employing polymerase chain reactions (PCR). The currently available methods for detection of microorganisms by PCR, however, need prior knowledge on the target microorganisms. In daily clinical practice, target microorganisms often cannot be well narrowed. Moreover, culture for pathogenic bacteria frequently results in no growth after initiation of empiric therapies, and some bacteria cannot be cultured even in optimum conditions. To overcome these difficulties, comprehensive nucleotide sequence analyses of bacterial 16S rRNA are promising approaches that enable rapid identification of the causative bacteria. Employing this method, we have been able to identify *Streptococcus intermedius* in a case of bacterial meningitis, which facilitated selection of antibiotics with excellent clinical outcome of the patient. These new technologies are strongly desired to be established in the daily clinical practice. With remarkable advancement in nucleotide sequencers, metagenomic analyses employing next-generation sequencers are emerging fields. It is expected that metagenomic analyses of various kinds of clinical specimens will facilitate identification of pathogens even if multiple pathogens are present in the specimens. Thus new technologies of sequencing analyses are expected to bring revolutionary improvement in the diagnosis of infectious diseases. It is strongly encouraged to make efforts to incorporate these new technologies into the health insurance system so that patients will be benefited from these technologies in the daily clinical practice.

Key words: DNA diagnosis, metagenomic analysis, infectious diseases, 16S rRNA,
next generation sequencers

特別講演

HAMの最新の話題

出雲周二

【要旨】 1986年にHTLV-1-associated myelopathy (HAM)が発見されてすでに四半世紀が経過した¹⁾。次々と新たな知見が積み重ねられ、その臨床像、病理像が明らかとなり、新たな疾患概念が確立していった。HAMに関連した新たな動きとして、平成20年6月にHAMが国の「難治性克服研究事業」の対象疾患として正式に指定された。また、平成22年9月にはHTLV-1感染対策に関する政府特命チーム組織され、23年度からHTLV-1対策が政策課題として本格的に動いている。最近、HTLV-1のキャリア数、ATL、HAMの両疾患についての全国疫学調査が実施され、HTLV-1感染者、HAM患者数ともに減少はみられず、大都市圏への拡散傾向が明らかとなった。HAM研究の新たな動向として、ウイルスの動態と抗ウイルス免疫動態の特徴など、HTLV-1感染症としての視点での研究がすすめられている。

Key words: HTLV-1関連脊髄症 (HAM)、疫学、ウイルス動態、抗ウイルス療法

HTLV-1感染の疫学：

HAM患者自身の社会活動がマスコミで報道されたことを契機として新たに社会医学的視点での動きが始まり、HTLV-1の健常感染者数、ATL、HAMの両疾患についての全国疫学調査が実施された。HTLV-1感染者数は20数年前の献血者の抗体陽性数から、全国で120万人と推定されていた。九州・四国、沖縄に多く、地域での対策により今後漸減し、数十年後には新規の感染者はこよなくゼロに近づくとの推計もあり、全国的な感染対策はとられず、また、感染者の全国調査も行われてこなかった。しかし、感染者、患者の実態調査の必要性を訴える声を受けて、研究班が組織され、日本赤十字社の協力を得て2008-2009年の初回献血者の抗体陽性率をもとに感染者数の調査が行われた²⁾。その結果、HTLV-1抗体陽性者は全国で108万人であると推計され、20数年前と比較し、予想ほど減少していないかった。さらに地域別にみると、母児間感染等に対する対策を行った九州地区では漸減の傾向が明らかであるのに比し、積極的な対策がなされていない他の地域、特に大都市圏ではむしろ増加してお

り、HTLV-1感染が全国へ拡散している実態が明らかにされた。

HAMについては、1995年に確診例1103名の患者が報告されている。今回、15年ぶりにHAM全国疫学調査が実施された³⁾。2007年、2008年の2年間に通院、入院したことのあるHAM患者を対象に、全国の神経内科診療施設にアンケート調査を施行した。回収率33.5%の時点でHAM患者は790人が登録された。内部コントロールとして同時に調査した筋萎縮性側索硬化症(ALS)患者は1002人が登録され、これまでの調査でALSの有病率は人口10万人あたり約4人と想定され、それとの比較により、HAMの有病率は人口10万人あたり3人、全国でおよそ3600人のHAM患者がいるものと推定された。患者の分布は九州・沖縄地方で52.0%を占めていたが、関東15.4%、近畿地方15.9%と大都市圏でも多くのHAM患者が集計され(図1)、前回調査と比較して大都市圏での比率の増加が明らかであった。

最近の傾向を見るためにHAM患者を1994年以前の診断例と1995年以後の診断例に分け比較した。診断年におけるHAM患者の年齢比較では、

1994年以前に診断された65歳以上の高齢者は1.3%でしかなかったが、1995年以降診断された患者では65歳以上の高齢者が26%を占めていた。近年、高齢になって診断される例が増加していることが示された。また、地域別には、1995年以降の診断が近畿で54例(+3%)、関東76例(+12.9%)が新たに診断され、大都市圏での診断が増加してお

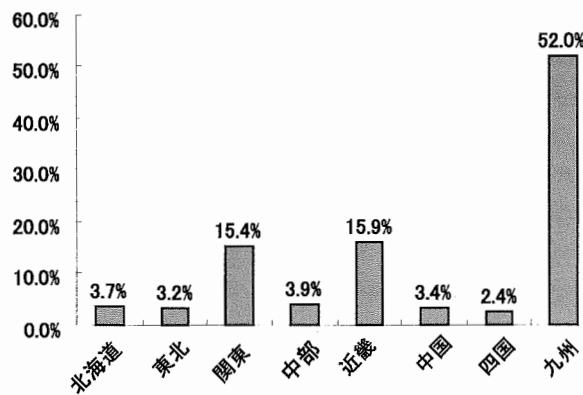


図1 地方別のHAM患者数の比率

り、HTLV-1感染者の全国への拡散傾向を裏付ける結果となっている。発症数を年別に見ると、1995年以降、実数として30人前後が新規にHAMを発症しており、2004年を除いて大きな変動は見られない(図2)。背景にあるHTLV-1キャリア数がほとんど変化していないことを背景に、毎年一定の割合でHAMも新規に発症し続けていることを示している。

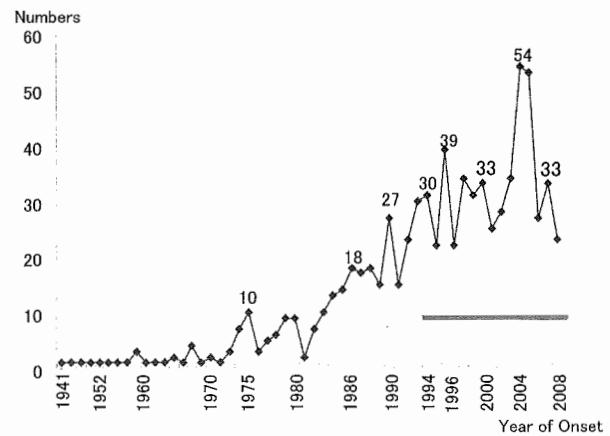


図2 HAM患者発症数の年時変化

HTLV-1感染症としてのHAM：

HAMの疾患概念確立の過程で重要な役割を果たしたもの一つは神経免疫学の主要な研究対象である多発性硬化症とHTLV-1との関連を示唆する論文がNature誌上に発表されたことで⁴⁾、実際、HAMの発見以前には多発性硬化症と診断されていた患者も少なからずいた。これまでにすすめられてきた多発性硬化症の研究テーマ、治療法はそのままHAMに応用され、次々とその免疫動態の解析や治療の試みがなされたことは記憶に新しい。一方、近年の分子生物学を背景としたウイルス学の進歩に呼応して、HAMの研究は免疫動態の解析からHTLV-1の動態そのものにその対象を移してきた。これまでに、ウイルス遺伝子のサブタイプによりHAM発症のリスクが異なること⁵⁾、HAMでは末梢血単核球中のプロウイルス量が健常キャリアに比較し約10倍多く、HAMの最大の発症リスクであること⁶⁾、PBMC中のプロウイルス量の変動は疾患活動性と連動していること⁷⁾、髄液中、さらに脊髄組織中のプロウイルス量が炎症の活動性と連動していること^{8, 9)}が明らかとなった。さらには、脊髄炎症病巣でウイルスは浸潤T細胞に感染しており¹⁰⁾、ウイルス

mRNAの発現¹¹⁾が証明されている。いずれの結果もウイルスの生体内での動態はHAMの発症、病勢と深く関連していることを示している。それに呼応して、免疫学の領域でもウイルスを標的とした免疫反応の特異性について精力的に解析が行われた。髄液中の抗HTLV-1抗体、特にIgM抗体価の上昇¹²⁾、髄腔内での抗体産生亢進¹³⁾はHAM患者髄腔内でHTLV-1に対する液性免疫が持続的に生じていることを示している。細胞性免疫については、HTLV-1の調節遺伝子産物であるTaxを認識する細胞傷害性T細胞がHAM患者末梢血から高率に分離できる事が明らかにされた¹⁴⁾。実際、このTax 11-19を認識する細胞傷害性T細胞がHAM患者のPBMCs 中で活性化しており、プロウイルス量の変動に連動して動いていることも明らかとなった¹⁵⁾。さらに、剖検例脊髄病巣でTax特異的細胞傷害性T細胞が集積していることも明らかとなった。これらの結果は、HAM患者の脊髄病巣でHTLV-1に対する強い免疫応答として炎症が生じていることを示している。

これらの研究はHAMがHTLV-1感染症であるという事実を明らかにし、ウイルス量を減らす、すなわち抗ウイルス療法がHAMの治療として最も適していることを示している。

HAM研究の最前線

HAMが難治性疾患克服研究事業の対象疾患に指定された流れを受けて、HAMのウイルスの動態を標的にした治療法開発を目指した研究が加速している。すでに臨床試験に入っている具体的な治療法として、細胞内でのHTLV-1遺伝子発現を標的にプロスルチアミンの治療効果が報告された。一方、ウイルス学の領域ではHTLV-1の細胞間感染拡大がウイルスシナプスの形成という特殊な機序を介して行われていることが明らかとなり^{16, 17)}、ウイルス感染受容体の解析やウイルスシナプス形成の分子機構が精力的にすすめられている。HAMは前述のごとく、感染者生体内でウイルス増生を背景に発症しており、生体内でこのウイルスシナプスを介した感染拡大が生じていることがうかがわれる。ウイルス感染拡大阻止はHAMの治療法として理想的で、その治療標的分子を探索する目的で、近年、一気に普及したマイクロアレー法、レクチンアレー法等による細胞膜蛋白表面の遺伝子発現、糖鎖分子の網羅的解析がすすめられている。また、プロテオーム解析を含めたこれらのポストゲノムの網羅的解析により、病態の理解、疾患活動性、重症度、予後予測などに有用なバイオマーカーの探索が進行中である。これまでに利用されている血中プロウイルス量や髄液中の細胞数・ネオプテリン値に加えて、CXCL9、CXCL10値が疾患活動性の評価に優れ、治療効果判定や予後予測に有用であることが示された。また、新たなバイオマーカーとしてHBZmRNA、TSLC1、gp46-197ペプチド抗体の有用性が検討されている。最新の手法として、定量プロテオーム

プロファイリング法により17種類タンパク質がHAM鑑別のマーカー候補としてリストアップされた。一方、HTLV-1感染者のごく一部にのみHAMは発症し、疾患感受性に関わる複数の因子があることは明らかで、そのいくつかはすでに報告されている^{18, 19, 20)}。次世代シーケンサーを用いた網羅的エキソーム解析も開始されることになった。

おわりに

HTLV-1感染は日本で古代縄文人の間で蔓延しており、現代まで継続的に感染が引き継がれてきた。当然、HAMの発見以前にもHAM患者は痙性脊髄麻痺や多発性硬化症などの診断で神経難病患者として存在し続けていた。そして、今回の疫学調査によりHAM患者は今でもHTLV-1感染者の中から一定の割合で発症し続けていることが明らかとなった。近年、HAMの研究は神経感染症としての視点ですすめられており、抗ウイルス療法の開発と感染対策により、縄文時代から続くHTLV-1感染の撲滅を目指して動き出している。一方、社会医学的観点からは、全国的な拡散傾向が明らかとなったことを受けて、HTLV-1の低侵淫地区におけるHAMに関する知識の啓発を目的としたパンフレットが作成され、また、関連の各研究組織が協力してHTLV-1に関する情報をわかりやすく紹介する「HTLV-1情報サービス」のウェブサイト (<http://htlv1joho.org/>) が立ち上げられた(図3)。HAMについて、広く正しく知るツールとして、HAMの発症予防、撲滅に役立つことを願っている。

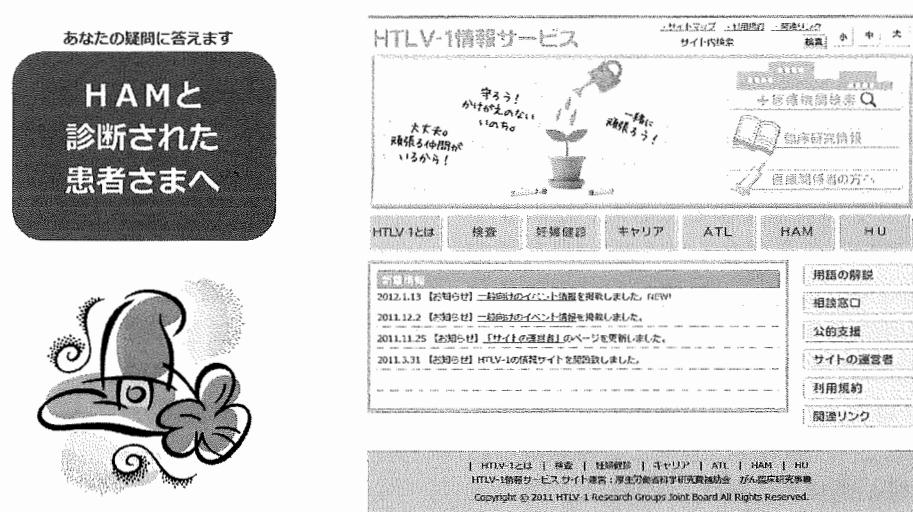


図3 HAM患者・家族用のパンフレットとHTLV-1情報サービスのホームページ

文 献

- 1) Osame M, Usuku K, Izumo S, et al. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. Lancet 1986; i, 1031-2.
- 2) 厚生労働科研費 新興・再興感染症研究事業 「本邦におけるHTLV-1感染及び関連疾患の実態調査と総合対策」(研究代表者:山口一成) 平成20年度報告書. 2009年.
- 3) 厚生労働科研費 新興・再興感染症研究事業 「本邦におけるHTLV-1感染及び関連疾患の実態調査と総合対策」(研究代表者:山口一成) 平成21年度報告書. 2010年.
- 4) Koprowski H, DeFreitas EC, Harper ME, et al. Multiple sclerosis and human T-cell lymphotropic retroviruses. Nature. 1985; 318:154-60.
- 5) Furukawa Y, Yamashita M, Usuku K, et al. Phylogenetic subtypes of HTLV-I gene and their risk to HTLV-I-assiciated myelopathy. J Infect Dis 2000; 182:1343-9.
- 6) Nagai M, Usuku K, Matsumoto W, et al. Analysis of HTLV-I proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-I carriers: High proviral load strongly predisposes to HAM/TSP. J Neurovirol 1998; 4: 586-93.
- 7) Takenouchi N, Yamano Y, Usuku K, et al. Usefulness of proviral load measurement for monitoring of disease activity in individual patients with human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. J Neurovirol. 2003; 9:29-35.
- 8) Moritoyo T, Izumo S, Moritoyo H, et al. Detection of human T-lymphotropic virus type I p40tax protein in cerebrospinal fluid cells from patients with human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. J. Neurovirol 1999; 5: 241-8.
- 9) Kubota R, Umehara F, Izumo S, et al. HTLV-I proviral DNA mount correlates with infiltrating CD4+ lymphocytes in the spinal cord from patients with HTLV-I-associated myelopathy. J. Neuroimmunol 1994; 53: 23-9.
- 10) Matsuoka E, Takenouchi N, Hashimoto K, et al. Perivascular T cells are infected with HTLV-I in the spinal cord lesions with HTLV-I-associated myelopathy / tropical spastic paraparesis: double staining of immunohisto-chemistry and polymerase chain reaction in situ hybridization. Acta Neuropathol 1998; 96: 340-6.
- 11) Moritoyo T, Reinhart TA, Moritoyo H, et al. Human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy and tax gene expression in CD4+ T lymphocytes. Ann Neurol 1996; 40: 84-90.
- 12) Nagasato K, Nakamura T, Shirabe S, et al. Presence of serum anti-human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) IgM antibodies means persistent active replication of HTLV-I in HTLV-I-associated myelopathy. J Neurol Sci. 1991 ;103:203-8.
- 13) Kitze B, Usuku K, Izumo S, et al. Diversity of intrathecal antibody synthesis against HTLV-I and its relation to HTLV-I associated myelopathy. J Neurol 1996; 243:393-400.
- 14) Jacobson S, Shida H, McFarlin DE, et al. Circulating CD8+ cytotoxic T lymphocytes specific for HTLV-I pX in patients with HTLV-I associated neurological disease. Nature 1990; 348:245-8.
- 15) Kubota R, Hanada K, Furukawa Y, et al. Genetic stability of human T lymphotropic virus type I despite antiviral pressures by CTLs. J Immunol. 2007; 178:5966-72.
- 16) Igakura T, Stinchcombe JC, Goon PK, et al. Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. Science. 2003; 299:1713-6.
- 17) Majorovits E, Nejmeddine M, Tanaka Y, et al. T-lymphotropic virus-1 visualized at the virological synapse by electron tomography. PLoS One. 2008; 28; 3(5):e2251.
- 18) Sabouri AH, Saito M, Lloyd AL, et al.

- Polymorphism in the interleukin-10 promoter affects both provirus load and the risk of human T lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Infect Dis.* 2004; 190:1279-85.
- 19) Kodama D, Saito M, Matsumoto W, et al. Longer dinucleotide repeat polymorphism in matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) gene promoter which correlates with higher HTLV-I Tax mediated transcriptional activity influences the risk of HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *J Neuroimmunol.* 2004; 156:188-94.
- 20) Nose H, Saito M, Usuku K, et al. Clinical symptoms and the odds of human T-cell lymphotropic virus type 1-associated myelopathy/ tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in healthy virus carriers: application of best-fit logistic regression equation based on host genotype, age, and provirus load. *J Neurovirol.* 2006; 12:171-7.

教育講演 I 神経感染症における宿主側遺伝的要因

神経感染症における宿主側遺伝的要因

楠原 浩一

【要旨】近年の免疫遺伝学的解析の進歩により、神経感染症とくに神経ウイルス感染症の発症に関する宿主側の遺伝的要因の解明が進んでいる。遺伝的要因には主に遺伝子変異と遺伝子多型があるが、前者については、この5年の間に単純ヘルペス脳炎、インフルエンザ脳症および急性壊死性脳症と特定の遺伝子変異との関連が報告されている。遺伝子多型については、インフルエンザ脳症および亜急性硬化性全脳炎との関連が研究されている。この分野における研究の進展は、これらの感染症の発症リスクの評価や重症化の予測、それに基づく予防・治療の個別化、さらには新しい治療法の開発に繋がるものと期待される。

Key words: 亜急性硬化性全脳炎 (subacute sclerosing panencephalitis)、
単純ヘルペス脳炎 (herpes simplex encephalitis)、
インフルエンザ脳症 (influenza-associated encephalopathy)、
急性壊死性脳症 (acute necrotizing encephalopathy)、
宿主遺伝要因 (host genetic factor)

1. はじめに

近年の免疫遺伝学的解析の進歩により、神経感染症とくに神経ウイルス感染症の発症に関する宿主側の遺伝的要因の解明が進んでいる。

遺伝的要因には主に遺伝子変異と遺伝子多型があるが、前者については、単純ヘルペス脳炎 (herpes simplex encephalitis、HSE) とインフルエンザ脳症、急性壊死性脳症 (acute necrotizing encephalopathy、ANE)、後者については、インフルエンザ脳症と亜急性硬化性全脳炎 (subacute sclerosing panencephalitis、SSPE) について述べる。

2. 遺伝子変異と神経感染症

1) 単純ヘルペス脳炎 (HSE)

a) UNC-93B 変異と HSE

UNC-93B は、12の膜貫通領域を有する小胞体の膜蛋白であり、TLR3、TLR7、TLR8、TLR9の膜貫通部と結合して、炎症性サイトカ

イン産生のシグナル伝達に関わっている (図1)¹⁾。

Casrouge らは、HSE を発症し血族婚を認める2家系を解析し、TLR3、7、8、9の刺激に対して IFN- α 、 β 、 λ の産生がないことが、UNC-93B 欠損マウスに類似していることを見出した。この所見をもとに UNC-93B 遺伝子の解析を行い、両家系に 1034del4、781G > A 変異をそれぞれホモで検出した²⁾。いずれもフレームシフトによりストップコドンが出現する変異であった。

b) TLR3 変異と HSE

TLR3 は、二本鎖 RNA を認識し、抗ウイルス免疫応答に重要な役割を持つ自然免疫受容体であり (図1)、上皮細胞や樹状細胞の他、中枢神経系のミクログリアやアストロサイトに発現している。IRAK4 に変異があつても HSV に対する易感染性はみられないが、TLR3 は UNC-93B に関連する TLRs の中で唯一 IRAK4 と無関係である。2007年、Zhang らは、血縁関係のない2症例に TLR3 遺伝子の 1660C > T

(P554S) 変異をヘテロで検出した³⁾。TLR3の細胞外ドメインはリガンド結合部位であるleucine-rich repeatで構成されているが、P554はその中で二本鎖RNAとの結合に重要な部位を占めており、種を越えて保存されている。この変異により、HSV感染に対するIFN- β 、IFN- λ の産生が低下することが脳炎発症につながっているものと考えられる。

最近、同じグループのGuoらは、1660C>T(P554S)と、2236C>T(E746X)をcompound heterozygoteで持つTLR3完全欠損のHSE症例を報告した⁴⁾。興味深いことに、本症例は、他のウイルスには易感染性を示さず、また、種々の血球細胞はHSV-1刺激でIFN産生を示したことから、TLR3欠損の影響は中枢神経系におけるHSV感染に限局していると考えられた。

c) TNF receptor-associated factor 3 (TRAF3) 変異とHSE

TRAF3はTLR3→TRIFの下流にあり、IKK-related kinaseであるTBK1とIKKiを介して、IFN- α 、 β 、 λ の産生を誘導する(図1)。2010年、Pérez de Diegoらは、4歳時にHSEに罹患した18歳女性について、TLR3からI型IFN産生に至る経路に関連した8分子の遺伝子

解析を行い、TRAF3遺伝子のexon 4に352C>T(R118W)変異をヘテロで検出した⁵⁾。この変異は、TNF receptorやTLR3を含むIFNを誘導するreceptorからのTRAF3を介したシグナル伝達を阻害すると考えられる。

2) TLR3変異とインフルエンザ脳症

Hidakaらは、TLR3のミスセンス変異908T>C(F303S)をヘテロで持つ4歳女児例を報告した⁶⁾。この変異は、IFN- β 、NF- κ Bのレポーターアッセイでloss-of-function変異であることが確認されており、インフルエンザ脳症の発症に関与しているものと考えられる。

3) RANBP2変異と急性壊死性脳症(acute necrotizing encephalopathy、ANE)

遺伝子異常を伴うANEとしては、まず、2003年、Neilsonらが3世代16症例がANEを発症し、MRIで両側視床、脳幹にT2高信号を呈している家系を報告した⁷⁾。翌2004年には、連鎖解析で感受性locusが2番染色体長腕上にmapされた⁸⁾。2009年、Neilsonらは、上記を含む16家系を解析し、うち12家系にRAN-binding protein 2 (RANBP2)遺伝子の変異、1880C>T (T585M)、2085C>T (T653IW)、2094C>T (I656V)をヘテロで見出した⁹⁾。RANBP2変異とANE発

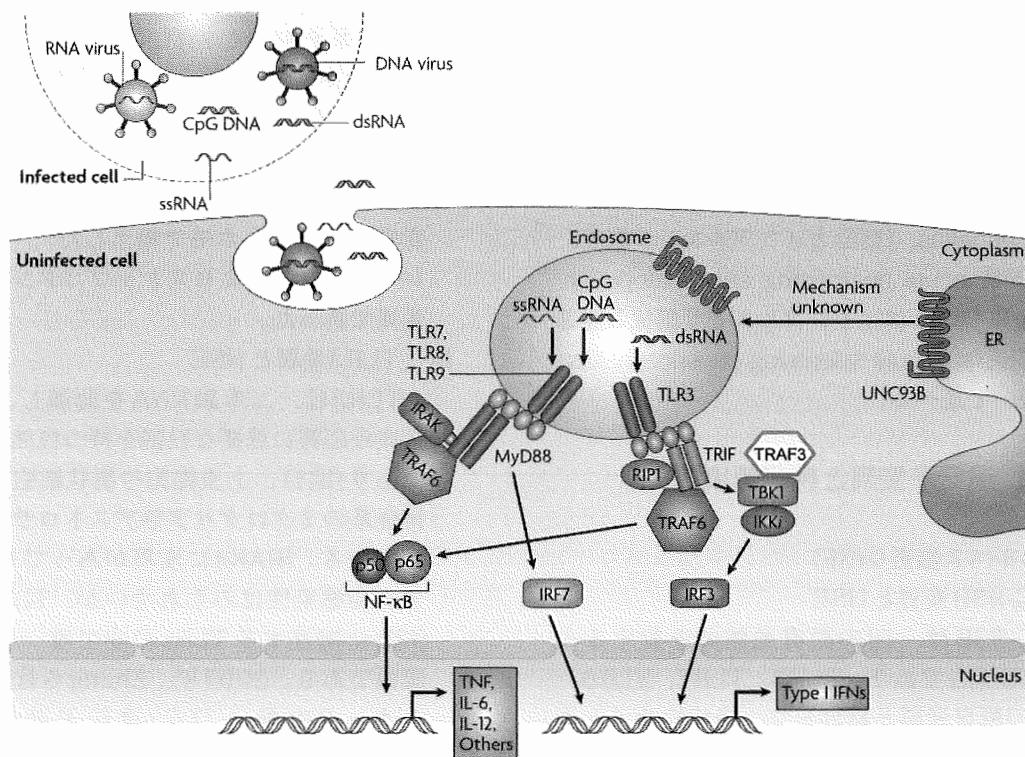


図1 エンドソーム内のウイルス由来核酸に対するTLR3, TLR7, TLR8, TLR9を介したシグナル伝達
(文献1)より一部改変)

症との関連は明らかではないが、RANBP2が、神経細胞でのミトコンドリア分布やエネルギー产生、脂質代謝に関与していることと関連している可能性が示唆されている¹⁰⁾。

RANBP2変異によるANEは、ANE1と称されており、以下のような臨床的特徴がある。①肝障害が軽微である。②病変に出血性の変化が乏しい。③予後が比較的良好。④再発しやすい。⑤思春期から成人での発症が多い。⑥脳幹や視床以外にも病変がみられる。

3. 遺伝子多型と神経感染症

1) インフルエンザ脳症

carininitine palmitoyl transferase II(CPTII)は、ミトコンドリアで脂肪酸を代謝してATPを产生する重要な酵素であり、その失活により、ATPが閾値以下になり、細胞は“エネルギー危機”に陥る。インフルエンザ脳症と関連する代表的な遺伝子多型として次の2つが知られている¹¹⁾。1055T > G(F352C)は、わずかな体温上昇で活性を失う熱不安定性遺伝子多型であり、日本人のみで報告されている。1102G > A(V368I)は、それ自身は熱不安定性はないが、F352Cの熱不安定性を増強させる多型であり、日本人以外でも見出される。重症インフルエンザ脳症では、1055T > Gと1102G > Aを併せ持つ患児が半数以上を占めると報告されている。これらの多型を有する患者では、高熱持続で後天性CPTII熱失活が誘導され細胞内ATPが低下することが脳症発症につながると考えられる¹¹⁾。

2) 亜急性硬化性全脳炎(SSPE)

a) SSPEの発症要因

SSPEは麻疹ウイルス(measles virus、MV)による遅発性の中権神経感染症である。麻疹罹患時に体内に侵入したMVが免疫系からの排除を逃れ、中枢神経系で持続感染を起こすことによって発症するが、その発症機序には不明な点が多い。

SSPE患者の脳から分離されたMVは特有の遺伝子変異を有し感染性ウイルス粒子の形成能を欠くことが知られている。しかし、この性質が、SSPEの発症に関わっているのか、長い潜伏期間の間に変異が蓄積した結果であるのかという点については明らかでない。

SSPEの発症に宿主側要因が関与していることを示唆する事実としては、2歳未満での麻疹

罹患ではSSPEの発症リスクが高いことやSSPE発症率の性差などが知られている¹²⁾¹³⁾。一方、SSPE患者の免疫学的検討では、血清および髄液中の抗MV抗体価が高値であることや、中枢神経系だけでなく末梢血単核球(PBMNC)にも持続感染が成立することが報告されている¹⁴⁾¹⁵⁾。しかし、これまでに種々の免疫異常が報告されているものの、普遍的異常は未だ確立されていない。

b) SSPEにおけるmyxovirus resistance protein A (MxA) 遺伝子の解析

MxAは、IFN- α 、 β によって誘導される抗ウイルス蛋白であり、ウイルスに対する自然免疫において重要な役割を果たしていると考えられている。MxAは、ヒト単球細胞株においてMVの増殖を抑制することが知られているが、このようなMVの増殖抑制は神経系の細胞においても観察され、その機序はウイルス遺伝子の転写抑制であると報告されている。そこで、MxA遺伝子のプロモーター領域にある2つのSNP(−88G/Tおよび新たに確認した−123C/A)の頻度をSSPE群と正常対照群で比較した¹⁶⁾。−88G/TはInterferon-stimulated response element(ISRE)-like sequence上にあるため、alleleによって転写活性が変化する機能的多型であることが予想された。−88G/Tの解析では、genotype頻度はTTホモタイプが正常対照群で6%であるのに対しSSPE群では25%で有意に高く、またallele頻度でもSSPE群でT alleleの頻度が有意に高かった(表1)。一方、−123C/Aについては、genotypeにおいてもallele頻度においても両群間に有意な差は認められなかった。

表1. SSPE患者群と対照群におけるMxA promoter −88 G/T のgenotype およびallele 頻度¹⁶⁾

	対照群(%) (n=90)	SSPE群(%) (n=40)	P値
genotype頻度			
G/G	43 (48)	16 (40)	NS
G/T	41 (46)	14 (35)	NS
T/T	6 (6)	10 (25)	0.003
allele頻度			
G	127 (71)	46 (58)	0.040
T	53 (29)	34 (42)	

P値は $2 \times 2 \chi^2$ 検定で算出 NS: not significant ($P>0.05$)

正常対照者において-123 C/Aと-88 G/Tで構成されるハプロタイプの頻度を推定したところ、C-Gがもっとも多いハプロタイプで70%近くを占め、A-Tは20%、A-Gは10%を占めていた。Hardy-Weinberg平衡との比較から、この2つのSNPは連鎖不平衡にあることが判明した。正常対照群とSSPE群におけるハプロタイプの推定頻度を比較したところ、-123A/-88TがSSPE群に多くみられた(31.2% vs. 19.8%)。-123A単独では両群間の有意差が認められないことから、-88Tが両群の差の主たる原因と考えられた。

次にSSPEとの関連が認められた-88G/T

の機能解析をデュアルルシフェラーゼアッセイにより行った。-123C/Aの影響を考慮して、主なハプロタイプであるC-G、A-G、A-Tを有するプロモーター領域を組み込んだルシフェラーゼ発現プラスミドをそれぞれ作成し、HeLa細胞に導入して、IFN- α 添加後の転写強度を比較した。その結果、すべてのハプロタイプでIFN- α による転写活性の上昇が認められるが、その中でSSPEに多いハプロタイプであるA-Tがもっとも高い活性を示すこと、また、-88にTを含む配列はGを含む配列よりも強くMxA遺伝子の転写を誘導することが判明した(図2)。

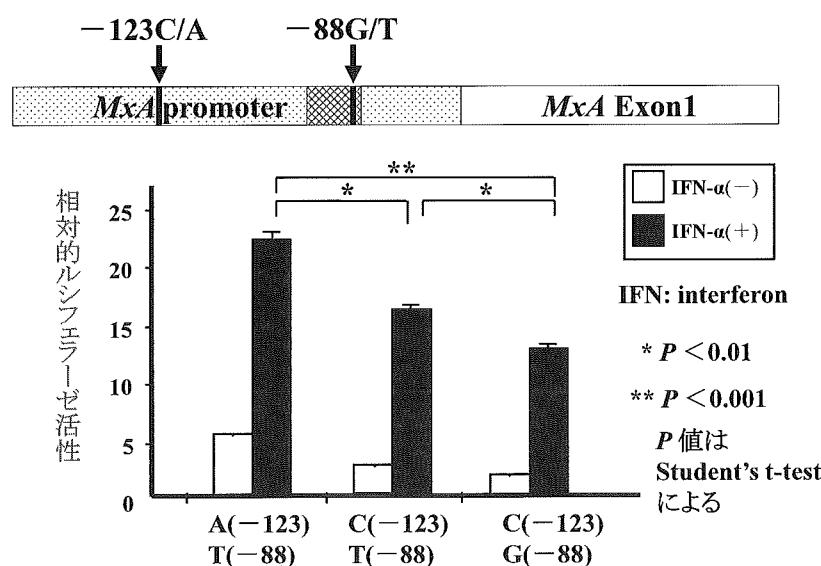


図2 MxA -123/-88ハプロタイプとMxAプロモーター活性¹⁶⁾

-123A/-88T, -123C/-88T, -123C/-88Gを有するMxAのプロモーター領域を組み込んだルシフェラーゼ発現プラスミドの転写強度(相対的ルシフェラーゼ活性)をIFN- α 添加の有無で比較。□: IFN- α 添加なし, ■: IFN- α 添加あり, エラーバーは標準偏差を示す。

以上の結果より、SSPE群ではMxA-88 T alleleの頻度が高く、またこのT alleleはMxAの発現を強く誘導することが示された。SSPE患者で抗ウイルス蛋白の発現が高いことは逆説的に思われるが、MxAが強く発現すれば感染細胞内でのウイルス遺伝子の転写は強く抑制され、ウイルス蛋白の合成がより低下し、感染細胞表面への発現はより低下するため、MVが免疫系による排除を免れやすくなり、その結果、持続感染をおこしやすくなることが考えられる。ドイツWürzburg大学のter MeulenらのグループもMxAに関して同様の仮説を提唱し

ている¹⁷⁾。

c) SSPEにおけるTh1/Th2サイトカインおよび関連分子の遺伝子解析

SSPE患者における末梢血単核球のMV特異的Th1/Th2サイトカイン産生能の検討では、大部分の患者においてTh1サイトカインのひとつであるIFN- γ 産生能が低下し、Th2サイトカインの産生は保たれていることが報告されている¹⁸⁾。このことから、SSPE患者では麻疹罹患後も長期間にわたって相対的Th2優位が持続している可能性が示唆される。この仮説に基づいて、我々はTh1/Th2バランスに関連す

るサイトカインの遺伝子多型がSSPEの発症に寄与している可能性を検討した¹⁹⁾。対象には、Th1サイトカインおよびその関連分子としてIFN-γ、IFN-γR1、IFN-γR2、interferon regulatory factor-1 (IRF-1)、IL-12Rβ1、Th2サイトカインおよびその関連分子として、IL-4、IL-4R、IL-10を選定した。これらの分子をコードする遺伝子の多型(IFNGとIRF1についてリピート多型、それ以外はSNP)の関連解析を行った結果、*IL4* promoter -589 T alleleの頻度が正常コントロールに比べSSPEで有意に高く($P=0.031$)、その他の多型ではSSPEとコントロール間に有意差は認めなかつた。ロジスティック回帰分析により*IL4* promoter -589および他の多型との交互作用を解析したところ、*IL4* promoter -589TTとIRF1 allele 1(ヘテロまたはホモ)とのgenotypeの組み合わせの頻度はコントロール(22.0%)に比べ、SSPE患者(47.7%)では有意に高かった($P=0.003$)。*IL4* promoter -589 T alleleが、C alleleより高いpromoter活性を示すことは既に報告されている^{20), 21)}。また、我々は、IRF1のallele 1が、Th2優位の疾患であるアトピー性皮膚炎と関連していることを報告した²²⁾。以上より、*IL4* promoter -589 T alleleとIRF1のallele 1の組み合わせは、Th2反応の促進と、Th1反応の抑制を通じて、SSPEの発症にかかわっていることが示唆された。

d) SSPEにおけるdsRNA認識関連分子の遺伝子多型解析

自然免疫におけるdsRNAの認識分子であるTLR3および近年同定されたretinoic acid-inducible gene I (RIG-I)、RIG-Iのファミリー分子であるmelanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5)、laboratory of genetics and physiology 2 (LGP2)のSSPE発症との関連を解析した²³⁾。それぞれの遺伝子についてHapMap²⁴⁾を参考に検出力の高いSNPを選択し関連解析を行った。RIGI、MDA5、LGP2では選択したSNPとSSPEとの間に有意な関連をみとめなかつた。TLR3の3つのSNPの中では、c.1234C/T (L412F)においてSSPE群と正常対照の多型頻度に有意差を認めた。すなわち、T(アミノ酸ではF)アリルが、SSPE群で有意に高頻度であった($P=0.028$) (表2)。c.1234C/T (rs3775291)の近傍に

あるc.1377C/T (rs3775290)についてもRFLP法によりgenotypeを決定し関連解析を行ったが、差は認めなかつた。

表2. SSPE群と対照群におけるTLR3の各多型のallele頻度²³⁾

多型	allele	対照群 (%)	SSPE群 (%)	P値
-7C/A	C	130 (77.4)	60 (75.0)	0.68
	A	38 (22.6)	20 (25.0)	
IVS3+71C/A	C	132 (78.6)	61 (76.3)	0.68
	A	36 (21.4)	19 (23.8)	
c. 1234C/T (L412F)	C (L)	122 (72.6)	47 (58.8)	0.03
	T (F)	46 (27.4)	33 (41.3)	
c. 1377C/T	C	107 (63.7)	53 (66.3)	0.69
	T	61 (36.3)	27 (33.8)	

TLR3やRIG-IなどのdsRNA認識分子は、ウイルス感染を細胞内で検知することによってI型インターフェロンの産生を誘導し、ウイルス感染に対する初期自然免疫において重要な役割を果たしている。末梢血においては、麻疹ウイルス野性株に対する初期免疫の発動にはRIG-Iが主に働いているとされている。一方、神経系の細胞では、RIG-Iはほとんど発現していないのにに対して、TLR3は発現がみられ、特に脳血液閂門を構成するアストロサイトでは強発現している²⁵⁾。したがって、中枢神経系麻疹ウイルス感染に対する自然免疫発動にはRIG-IよりもTLR3が関与していると考えられる。TLR3の細胞外ドメインは、リガンド結合モチーフであるleucine-rich repeat (LRR)が25個連なった構造をとっている。L412Fでは、15番目のLRRを構成するLの1個がFに置換される。この置換は立体構造にはあまり変化を与えないが、dsRNAの結合部位としてもっとも有力視されている糖鎖修飾部位のすぐ近傍であることから、糖鎖修飾の程度や方向が変わってTLR3とdsRNAの結合が変化する可能性がある。その結果、中枢神経系の麻疹ウイルス感染においてTLR3を介した自然免疫シグナルが修飾されることにより、SSPEの疾患感受性に影響する可能性が考えられる。

e) フィリピンのSSPE患者におけるMxA、IL-4、IRF-1およびTLR3の遺伝子解析

民族を超えてSSPE発症に普遍的に関与している宿主側要因を明らかにするために、これまでの研究で日本人においてSSPE発症との関連がみとめられた4つの遺伝子多型について、フィリピン人において同様の関連がみとめられるかを検討した²⁶⁾。

IL4-589C/Tと*MxA*-88G/Tのアリル頻度およびgenotype頻度、*IRF1* GTリピート多型のアリル頻度の比較では、*IL4*-589C/TのCT genotypeがSSPE群で有意に多くみられた($P=0.04$)。以外には、両群間に差はみとめられなかった。フィリピン人において日本人と同様の結果が得られなかつた理由として、遺伝学的背景の違いに加えて、フィリピンでは日本と比較して環境因子の関与が大きい可能性が考えられる。

f) SSPEにおける抑制性副刺激分子の遺伝子多型解析

既に述べたように、SSPE患者においては他の慢性ウイルス感染と同様にMV特異的IFN- γ の産生が低下している¹⁸⁾。そこで、Tリンパ球機能の抑制に関与している抑制性副刺激分子がSSPE発症に関連しているかを明らかにするために、cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4 (CTLA4)、programmed cell death 1 (PD-1)、B and T lymphocyte attenuator (BTLA)、CD80、CD86、programmed cell death ligand 1 (PDL1)、PDL2、herpes virus entry mediator (HVEM) の各分子をコードする遺伝

子の計20個のSNPを解析した²⁷⁾。その結果、PD1遺伝子の3個のSNP (rs4656739 G/A、rs4978592 G/A、rs2227982 C/T) でSSPE患者と健常対照の間のminor allele頻度に有意差をみとめた(表3)。PD1遺伝子では、rs4656740を含めた4ヶ所のSNPによるハプロタイプの頻度においても患者群と対照群の間に有意差をみとめた(GCGC、 $P=0.022$ ；ATAT、 $P=0.009$) (表4)。日本人集団で有意差をみとめたPD1遺伝子について、フィリピン人集団でも同様の解析を行ったところ、各SNPのminor allele頻度では有意差をみとめなかつたが、ハプロタイプ解析が可能であった3ヶ所のSNPのハプロタイプ頻度で患者群と対照群に有意差をみとめた(GCG、 $P=0.011$) (表4)。翻訳領域とexon-intron junctionのシークエンス解析では両集団とも変異や新規の多型はみられなかつた。次に日本人SSPE患者と年齢性別をマッチさせた対照群において、PBMNCからcDNAを作成しPD1mRNAの発現を比較したところ、SSPE群ではPD1遺伝子発現が有意に高値であった($P<0.001$) (図3)。

表3. 抑制性副刺激分子の各SNPのminor allele頻度(日本人)²⁷⁾

多型	allele頻度 対照群/SSPE群		P値	多型	allele頻度 対照群/SSPE群		P値	
	rs133618	T/C	42.0/47.5	0.47	rs2705534	G/T	21.0/23.8	0.61
CTLA4	rs231775	C/T	32.0/38.8	0.37	rs9288953	C/T	45.0/53.8	0.26
	rs231779	A/G	42.0/46.3	0.58	rs2171513	T/C	29.0/31.3	0.98
	rs3087243	A/G	30.0/36.4	0.40	BTLA			
CD80	rs2228017	T/C	29.0/25.0	0.51	rs4656739	G/A	36.0/53.8	0.007
				rs4656740	C/T	35.0/48.8	0.062	
CD86	rs1129055	G/A	37.0/31.3	0.40	rs4978592	G/A	35.0/55.0	0.007
				rs2227982	C/T	34.0/53.8	0.017	
HVEM	rs1886730	A/G	46.0/46.3	0.98	PDL1			
	rs2234161	T/C	51.0/50.0	0.98	rs822342	T/C	43.2/43.8	0.93
	rs2234167	A/G	5.0/5.0	0.98	rs2297137	A/G	50.0/52.5	0.74
				PDL2				
				ss48532780	A/G	6.9/13.8	0.12	
				rs16923189	G/A	27.0/23.8	0.62	

表4. PD1の4つのSNPによるハプロタイプの推定頻度(日本人、フィリピン人)²⁷⁾

	対照群	SSPE群	OR (95%CI)	P値
日本人				
GCGC	0.33	0.49	1.5 (1.1-2.5)	0.022
ATAT	0.62	0.43	2.1 (1.3-3.9)	0.009
フィリピン人				
GCG	0.53	0.67	1.8 (1.1-2.9)	0.011
ATG	0.19	0.12	0.5 (0.3-1.0)	0.070
ATA	0.15	0.18	1.5 (0.8-2.7)	0.180

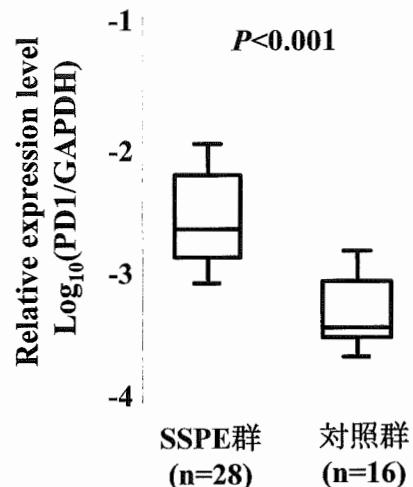


図3 SSPE群と対照群におけるPD1 mRNAの定量的RT-PCR²⁷⁾。

PD1 mRNAの末梢血単核球での発現を、対照群とSSPE患者群で比較。箱ひげ図の横線は下から10, 25, 50(中央値), 75, 90パーセンタイルの値を示す。

次に、これらのハプロタイプに含まれるプロモーター領域のSNP(-606G/A)のGアリルがPD-1の発現亢進に関与しているかをデュアルルシフェラーゼアッセイにより検討した。その結果、-606Gアリルを持つベクターの相対的ルシフェラーゼ活性は 7.75 ± 0.93 であり、-606Aアリルを持つベクターの活性(4.93 ± 0.38)より有意に高値であり($P < 0.001$ 、Mann-Whitney

U test)、*PD1*遺伝子のプロモーター領域のSNPの2つのアリルのうち、SSPE患者で頻度が有意に高いハプロタイプを構成するGアリルが、Aアリルよりも有意に高いプロモーター活性を持つことが示された(図4)。これは、SSPE患者のPBMNCで*PD1* mRNA発現が高いという上記の結果と一致した。

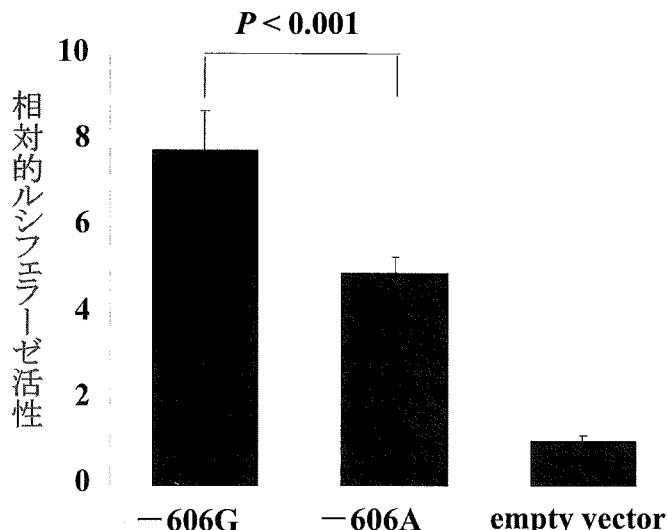


図4 *PD1* -606G/Aの各alleleと*PD1*プロモーター活性²⁷⁾. -606G, -606Aの各alleleを有する*PD1*のプロモーター領域を組み込んだルシフェラーゼ発現プラスミドの転写強度(相対的ルシフェラーゼ活性)を比較.

慢性ウイルス感染時にはウイルス特異的CD8陽性T細胞は、“疲弊した”と表現されるサイトカイン産生能や増殖能が低下した状態にあるが、そのような細胞では*PD1*の高発現がこの現象に関与していることが明らかにされている²⁸⁾。本研究で日本人とフィリピン人という2つの異なる民族集団においてSSPE群で*PD1*遺伝子のGCGハプロタイプの頻度が高いという結果が得られたが、このハプロタイプは高いプロモーター活性によるPD-1の発現亢進を介してMV特異的免疫応答を抑制することによりSSPEの発症に関連している可能性が示唆される。

4. おわりに

神経感染症の宿主側遺伝的要因に関するこれまでの知見を紹介した。この分野における研究の進展は、これらの感染症の発症リスクの評価や重症化の予測、それに基づく予防・治療の個別化、さらには新しい治療法の開発に繋がるものと期待される。

共同研究者

石崎義人、由茅直子、武本環美、鳥巣浩幸、佐々木由佳、高畠 靖、中尾 太、野村明彦、Saifuddin Ahmed、Wafaa M. Bassuny、井原健二、吉良龍太郎、原 寿郎(九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野)、井上岳彦、竹下研三(鳥取大学医学部脳神経小児科)、Judy R. Pipo-Deveza、Marissa B. Lukban、Aida M. Salonga(Department of Pediatrics & Neurosciences, University of the Philippines / Philippine General Hospital, Manila, Philippines)

謝 辞

ご協力をいただいたSSPE青空の会(親の会)の方々、患者末梢血をご提供いただいた全国31施設の先生方に深謝いたします。

文献

- 1) Beutler B, Eidenschenk C, Crozat K, et al. Genetic analysis of resistance to viral infection. *Nat Rev Immunol* 7:753-766, 2007.
- 2) Casrouge A, Zhang SY, Eidenschenk C, et al. Herpes simplex virus encephalitis in human UNC-93B deficiency. *Science* 31:308-312, 2006.
- 3) Zhang SY, Jouanguy E, Ugolini S, et al. TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis. *Science*. 317:1522-1527, 2007.
- 4) 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.
- 5) Pérez de Diego R, Sancho-Shimizu V, Lorenzo L, et al. Human TRAF3 adaptor molecule deficiency leads to impaired Toll-like receptor 3 response and susceptibility to herpes simplex encephalitis. *Immunity*. 33:400-411, 2010.
- 6) 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.
- 7) Neilson DE, Eiben RM, Waniewski S, et al. Autosomal dominant acute necrotizing encephalopathy. *Neurology*;61:226-230, 2003.
- 8) Neilson DE, Feiler HS, Wilhelmsen KC, et al. Autosomal dominant acute necrotizing encephalopathy maps to 2q12.1-2q13. *Ann Neurol* 55:291-294, 2004.
- 9) 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.
- 10) 中村和幸、早坂 清. ウイルス関連急性脳炎・脳症の発症と遺伝的素因. *日本臨床臨牀* 69:550-554, 2011.
- 11) Smahi A, Elain G, Romero P, et al. Thermal instability of compound variants of carnitine palmitoyltransferase II and impaired mitochondrial fuel utilization in influenza-associated encephalopathy. *Hum Mutat* 29:718-727, 2008.
- 12) Gascon GG. Subacute sclerosing panencephalitis. *Semin Pediatr Neurol* 3: 260-269, 1996.
- 13) Britt JB. Slow viruses. In: *Textbook of Pediatric Infectious Diseases*. Feigin RD, Cherry JD, (eds) WB Saunders, Philadelphia, pp. 1646-1665, 1998.
- 14) Dyken PR. Subacute sclerosing panencephalitis: current status. *Neurol Clin* 3: 179-196, 1985.
- 15) Fournier JG, Tardieu M, Lebon P, et al. Detection of measles virus RNA in lymphocytes from peripheral-blood and brain perivascular infiltrates of patients with subacute sclerosing panencephalitis. *N Engl J Med* 313:910-915, 1985.
- 16) Torisu H, Kusuvara K, Kira R, et al. Functional MxA promoter polymorphism associated with subacute sclerosing panencephalitis in Japan. *Neurology*. 62:457-60., 2004.
- 17) Schneider-Schaulies J, Niewiesk S, Schneider-Schaulies S, et al. Measles virus in the CNS: the role of viral and host factors for the establishment and maintenance of a persistent infection. *J Neurovirol* 5: 613-622, 1999.
- 18) Hara T, Yamashita S, Aiba H, et al. Measles virus-specific T helper 1/T helper 2- cytokine production in subacute sclerosing panencephalitis. *J Neurovirol* 6:121-126, 2000.
- 19) Inoue T, Kira R, Nakao F, et al. Contribution of the interleukin 4 gene to susceptibility to subacute sclerosing panencephalitis. *Arch Neurol* 59: 822-827, 2002.
- 20) Rosenwasser LJ, Klemm DJ, Dresback JK, et al. Promoter polymorphisms in the

- chromosome 5 gene cluster in asthma and atopy. Clin Exp Allergy 25 (Suppl 2) :74-78, 1995.
- 21) Kawashima T, Noguchi E, Arinami T, et al. Linkage and association of an interleukin 4 gene polymorphism with atopic dermatitis in Japanese families. J Med Genet 35: 502-504, 1998.
- 22) Nakao F, Ihara K, Kusuhara K, et al. Association of IFN-gamma and IFN regulatory factor 1 polymorphisms with childhood atopic asthma. J Allergy Clin Immunol 107: 499-504, 2001.
- 23) Ishizaki Y, Takemoto M, Kira R, et al. Association of toll-like receptor 3 gene polymorphism with subacute sclerosing panencephalitis. J Neurovirol 14: 486-491, 2008.
- 24) The International HapMap Consortium. The International HapMap Project. Nature 426: 789-796, 2003.
- 25) Jack CS, Arbour N, Manusow J, et al. TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes. J Immunol 175: 4320-4330, 2005.
- 26) Pipo-Deveza JR, Kusuhara K, Silao CL, et al. Analysis of MxA, IL-4, and IRF-1 genes in Filipino patients with subacute sclerosing panencephalitis. Neuropediatrics 37: 222-228, 2006.
- 27) Ishizaki Y, Yukaya N, Kusuhara K et al (2010) : *PD1* as a common candidate susceptibility gene of subacute sclerosing panencephalitis. Hum Genet 127:411-419,. 2010.
- 28) Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. Nature 439: 682-687, 2006.

教育講演II マイコプラズマ肺炎後のADEMとGBS

マイコプラズマ肺炎後のADEMとGBS

楠 進

【要旨】マイコプラズマ肺炎後には、末梢神経障害であるギラン・バレー症候群(GBS)や、急性散在性脳脊髄炎(Acute Disseminated Encephalomyelitis, ADEM)などの中枢神経障害がみられることがある。病態については不明の点が多いが、われわれは免疫性神経疾患の抗糖脂質抗体検索の過程で、ミエリンに局在する糖脂質であるガラクトセレブロシド(Galactocerebroside, Gal-C)に対する抗体が、マイコプラズマ肺炎後のGBSやADEMで高頻度にみられることを見出した。Gal-Cでウサギを感作すると脱髓性ニューロパチーを発症すること、抗Gal-C抗体は脱髓をきたす因子であることが、他のグループにより報告されており、抗Gal-C抗体はマイコプラズマ肺炎後の神経障害の病態に関与する可能性が考えられる。抗Gal-C抗体陽性血清を、肺炎マイコプラズマ菌体成分で吸収すると、抗Gal-C抗体活性が吸収されることから、マイコプラズマ菌体のもつ糖鎖に対する免疫反応の結果として抗Gal-C抗体が産生されるという「分子相同性機序」が推定された。またマイコプラズマ菌体には、Gal-C類似の糖鎖構造をもつ糖脂質が存在することも明らかとなっている。一方で、マイコプラズマ肺炎に罹患しながら神経症状を発症しない患者にも、抗Gal-C抗体がみられる場合があることから、抗体上昇のみでは神経障害に結びつかないと考えられる。またマイコプラズマ肺炎後のGBSやADEMで抗Gal-C抗体陰性の症例もみられることから、その他の因子の関与も考慮する必要がある。マイコプラズマ肺炎後の神経障害には重症例も多いことから、今後も多様な観点からの詳細な検討が必要と考えられる。

Key words: 肺炎マイコプラズマ、糖脂質、抗ガラクトセレブロシド抗体、ギラン・バレー症候群、急性散在性脳脊髄炎

はじめに

マイコプラズマ肺炎後には、末梢神経障害であるギラン・バレー症候群(GBS)や、急性散在性脳脊髄炎(Acute Disseminated Encephalomyelitis, ADEM)などの中枢神経障害がみられることがある。本項では、これらのマイコプラズマ肺炎後の神経障害について、とくにわれわれが見出した抗ガラクトセレブロシド(Galactocerebroside, Gal-C)抗体との関連を中心に述べる。

1) マイコプラズマ肺炎後の神経合併症

マイコプラズマ肺炎に伴う神経障害としては、

脳炎、脳幹脳炎、血管障害、両側性線条体壊死、小脳炎、脊髄炎、髄膜(脳)炎、ADEMなどの中枢神経障害と、末梢神経障害であるGBSなどがある。

マイコプラズマ肺炎後の中枢神経合併症は、小児科領域で多く報告されており、2-7%にみられるとの記載がある¹⁾。一方GBSは高頻度に先行感染があるが、先行感染因子として同定される中ではマイコプラズマ肺炎の割合は比較的高く、*Campylobacter jejuni*、Cytomegalovirusなどに次いで2-6%を占めると報告されている²⁾⁻⁴⁾。

肺炎マイコプラズマ(*Mycoplasma pneumoniae*,

Mp)の細胞膜にはリポ蛋白があり、それが各種のサイトカインを誘導して炎症をきたす。またMpの細胞膜には糖脂質や糖タンパクも存在しており、それらに対する免疫反応により神経障害をきたす可能性がある。さらに、血管炎や凝固系の亢進をきたして、血管障害を引き起こす可能性がある。マイコプラズマ肺炎後にはこのようなメカニズムで、中枢あるいは末梢神経の障害をきたすと考えられている⁵⁾。

マイコプラズマ肺炎後の神経障害の治療としては、感染が十分に抑え切れていない場合にはマクロライド系の抗生剤が用いられ、炎症や自己免疫機序をコントロールするために、ステロイド、血液浄化療法、免疫グロブリン大量療法などの免疫調整療法がおこなわれる。

2) マイコプラズマ肺炎後のGBS、ADEMと抗Gal-C抗体

われわれは、神経疾患における抗糖脂質抗体の研究を行い、GBSやFisher症候群において急性期に抗糖脂質抗体が高頻度にみられるることを見出している。その中で、GBSにおいては、糖鎖末端のGalactosyl-N-acetyl-Galactosaminyl(Gal-GalNAc-)基を認識して、GM1, GD1b, GA1の3種の糖脂質に結合する抗体はしばしば認められる。ところが多数の検体をしらべていくうちに、それら3種類だけでなく、Gal-Cにも反応のみられる血清があり、それらはマイコプラズマ肺炎後の症例であることに気付いた。

そこで免疫性末梢神経障害における抗Gal-C抗体について、1995年に最初に報告したが、その時は5症例であり、GBSが4例、先行感染後の多巣性運動性ニューロパチーが1例であった⁶⁾。うち3例はGM1, GD1b, GA1にも反応がみられ、1例はGM1, GD1bに、残る1例はGA1に対する反応がみられた。同時にしらべた78例のマイコプラズマ肺炎の先行がみられないGBSでも2例にGal-Cに対する抗体がみられたが、抗Gal-C抗体とマイコプラズマ肺炎の関連はきわめて強いことが示された。

3) 抗Gal-C抗体と脱髓

Gal-Cはミエリンの糖脂質であり、中枢神経ミエリンにも末梢神経ミエリンにおいても主要な糖脂質として知られる。Gal-Cでウサギを感じることにより、脱髓性ニューロパチーが作成されること⁷⁾、さらに抗Gal-C抗体は脱髓を引き起こす因子であること⁸⁾がSaidaらにより示されている。従って、マイコプラズマ肺炎後に上昇する抗

Gal-C抗体も、神経障害の病態機序において脱髓因子として働く可能性が高い。

しかし、マイコプラズマ肺炎後で神経症状のない33例の患者血清を検討したところ、6例(IgMのみ2例、IgGのみ1例、IgMとIgGどちらもが3例)において抗Gal-C抗体がみられることがわかった⁹⁾。すなわち抗Gal-C抗体の血中での上昇のみでは、脱髓をきたすとは限らず、脱髓をきたすには他の要因の関与も必要であると考えられる。

その後他のグループからもマイコプラズマ肺炎後のGBSと抗Gal-C抗体について報告が行われた。オランダからは15例のマイコプラズマ肺炎後のGBSについての報告があり、11例で抗Gal-C抗体陽性で電気生理所見の得られた13例中11例は脱髓型であった。一方マイコプラズマ肺炎後で神経症状のない例でも19例中11例で抗Gal-C抗体が陽性であったことである¹⁰⁾。一方Susukiらは、7例のマイコプラズマ肺炎後のGBSについて検討し、6例が抗Gal-C抗体陽性との結果を得た。そして1例はGM1, GA1にも交差反応のみられる軸索障害型であり、脱髓型はなかったと報告した¹¹⁾。われわれの抗体測定した症例の検討では、マイコプラズマ肺炎後で抗Gal-C抗体陽性症例のうち詳しい電気生理検査の結果が得られた6例について調べると、3例が脱髓型で、後の3例は判定不能・正常・軸索障害型が各1例であり、抗Gal-C抗体のみ陽性であった3例はいずれも脱髓型という結果であった(未発表)。動物実験の結果や、前述の神経症状のない症例の結果とも合わせると、明らかな脱髓をきたすには抗Gal-C抗体の存在だけでは不十分であるが、他の何らかの条件が備わったときに抗Gal-C抗体は脱髓因子として病態形成に関わる可能性が高いと考えられる。

4) マイコプラズマ肺炎後の中枢神経障害と抗Gal-C抗体

マイコプラズマ肺炎後の中枢神経障害においても抗Gal-C抗体陽性例が報告された。3例のマイコプラズマ肺炎後の脳炎の全例で、抗Gal-C抗体が陽性であった¹²⁾。そのうち1例(53歳男性)は大脳白質に多発性の病巣があり、ADEMと診断され、methylprednisoloneの静注とtetracyclineの投与でも改善みられず予後不良であった。他の2例はCTは正常であり、うち1例(12歳男児)はTetracyclineで改善、もう1例(8歳男児)はとくに積極的治療なしで改善したことであった。また7歳の女児で、マイコプラズマ肺炎後に

重篤な脳脊髄炎を発症し、akinetic mutism の状態となり、4カ月後に意識回復して高次脳機能は正常となったが、C2レベル以下の全感覚消失、弛緩性四肢麻痺が残った症例も報告された¹³⁾。このように、マイコプラズマ肺炎後の中枢神経障害では、きわめて重篤な経過をとることがあり、注意が必要である。

5) 抗Gal-C抗体産生のメカニズム

GBSにおける抗糖脂質抗体の产生メカニズムとしては、先行感染因子のもつ糖鎖エピトープに対する免疫反応の結果として抗糖脂質抗体が產生されるという「分子相同意機序」が提唱されており、とくに *C.jejuni* 感染後の GBS で多くの研究成果が発表されている。マイコプラズマ肺炎後の抗Gal-C抗体産生にも同様のメカニズムが働いている可能性を考えて、われわれはマイコプラズ

マ菌体から作成されたマイコプラズマ抗原試薬で抗Gal-C抗体が吸収されるかどうかを検討した。その結果、患者血中の抗Gal-C抗体の活性は、マイコプラズマ抗原試薬により大部分が吸収された。同時に上昇しているGM1やGA1などに対する反応は、吸収されるものとそうでないものがあった（表1A）。一方マイコプラズマ肺炎後ではなく、抗Gal-C抗体の上昇もないGBS血清にみられる、GM1、GD1b、GQ1b、GalNAc-GD1aなどに対する抗体は全く吸収されなかつた（表1B）。従って、マイコプラズマ肺炎により、菌体のもつ糖鎖構造に対して抗体が产生され、その抗体がGal-Cに反応していることが示唆され、マイコプラズマ肺炎後の抗Gal-C抗体の上昇も分子相同意機序によるものと考えられる¹⁴⁾。

表1 患者血中の抗糖脂質抗体価のマイコプラズマ菌体成分による吸収試験（文献14より引用）

A マイコプラズマ肺炎後のGBS

症例	抗体クラス	抗原	吸収率(%)
マイコプラズマ肺炎後のGBS			
1	IgG	Gal-C	100
2	IgG	Gal-C	91
3	IgG	Gal-C	100
4	IgM	Gal-C	83
		GA1	<10
5	IgG	Gal-C	86
		GA1	<10
6	IgM	Gal-C	82
		GA1	19
	IgG	Gal-C	42
		GA1	91
7	IgM	Gal-C	89
		GA1	76
	IgG	GM1	85
		GA1	68

B マイコプラズマ肺炎の先行のないGBSおよびIgM paraproteinemiaを伴うニューロパチー

症例	抗体クラス	抗原	吸収率(%)
マイコプラズマ肺炎の先行のないGBS			
8	IgG	GM1	<10
9	IgG	GM1	<10
10	IgG	GM1	<10
11	IgG	GM1	<10
		GD1b	<10
12	IgG	GM1	<10
		GA1	<10
13	IgG	GQ1b	<10
14	IgG	GQ1b	<10
15	IgG	GalNAc-GD1a	<10
16	IgG	GalNAc-GD1a	<10
IgM paraproteinemiaを伴うニューロパチー			
17	IgM	GM1	<10
		GD1b	<10
		GA1	<10

マイコプラズマ菌体から脂質を抽出して分析すると、多くの糖脂質が存在することがわかり、患者血清はそれらの糖脂質に強く反応する抗体をもつことも確認された¹⁴⁾。さらに Gal-C をウサギに免疫して得られた抗Gal-C抗血清も、マイコプラズマ菌体の糖脂質に反応することが示された¹⁴⁾。また肺炎マイコプラズマの一部の糖脂質抗原の糖鎖構造も明らかとなっている¹⁵⁾。

以上より、マイコプラズマ肺炎では、マイコプラズマ菌体の糖鎖抗原に対する免疫反応の結果として抗Gal-C抗体が产生されることがあり、そのように產生された抗Gal-C抗体はある条件のもとで末梢神経および中枢神経のミエリンに結合して脱髓を引き起こすと考えられる。

6) 最近のマイコプラズマ肺炎後の神経障害

2011年1月から8月の間に当科に抗体測定依頼のあった症例について検討したところ、マイコプラズマ肺炎後の症例は33例であり、内訳は GBS17例、髄膜脳炎10例、ADEM1例、Fisher 症候群5例であった。年齢をみると、髄膜脳炎に罹患する症例は若年者が多い。抗体測定結果については、10例で抗Gal-C抗体陽性（IgMは4例、IgGは6例で重複なし）であり、10例中 GBS は7例、髄膜脳炎が3例であった（表2）。

抗Gal-C抗体陰性例の23例中で他の抗体陽性例が12例あったが、Fisher 症候群の5例は抗GQ1b抗体が陽性であった（表3）。

表2 2011年1月～8月に当科に抗体測定依頼のあつた症例で、マイコプラズマ肺炎後であつた33例のまとめ

疾患(例数)	GBS (17)	Fisher (5)	ADEM (1)	髄膜脳炎 (10)
年齢	31.7±21.9	36.4±22.8	22	21.8±19.9
抗Gal-C抗体陽性	7	0	0	3
10例の抗Gal-C抗体の内訳				
IgM 4例, IgG 6例 (IgMとIgGの重複なし)				

表3 表2の33例のうち、抗Gal-C抗体が陰性であった23例中12例にみられた他の抗体のまとめ(重複してみられる場合あり)

IgG (+PA)は、Phosphatidic acidを抗原に添加することで抗体活性が認められるIgG抗体

抗Gal-C抗体陰性例23例中の他抗体陽性例(12例)			
	IgM	IgG	IgG(+PA)
GM1	1		2
GM2	3		
GM3		1	1
GD1a		1	2
GD1b			4
GD3	1	3	
GT1b		1	2
GQ1b		6	5
GT1a	1	1	4
GalNAc-GD1a	3	1	

マイコプラズマ肺炎後のGBSにおける抗Gal-C抗体を発表した1990年代後半と比較すると、抗Gal-C抗体が陽性となる症例が少ない印象がある。肺炎マイコプラズマの菌体の組成が変化している可能性もあり、今後の詳細な検討が必要である。

おわりに

マイコプラズマ肺炎後の神経障害について抗Gal-C抗体に焦点を当てて述べてきた。抗Gal-C抗体は、脱髓因子として神経障害性をもつことが初めて示された抗糖脂質抗体であり、またマイコプラズマ肺炎との関連が明らかになり、*C.jejuni*感染後のGM1抗体などと同様に分子相同性機序による抗体産生が示された抗体もある。一方で、マイコプラズマ肺炎後の神経障害には抗Gal-C抗体陰性例も存在し、未同定の様々な他の因子の病態への関与も考えられる。重症例も多いことから、今後も多様な観点からの詳細な検討が必要と考えられる。

文献

- 1) Lerer RJ, Kalavsky SM: Central nervous system disease associated with *Mycoplasma pneumoniae* infection: report of five cases and review of the literature. Pediatrics 52: 658-668, 1973.
- 2) Jacobs BC, Rothbarth PH, van der Meché FG, et al: The spectrum of antecedent infections in Guillain-Barré syndrome: a case-control study. Neurology 51: 1110-1115, 1998.
- 3) Hao Qi, Saida T, Kuroki S, et al: Antibodies to gangliosides and galactocerebroside in patients with Guillain-Barré syndrome with preceding *Campylobacter jejuni* and other identified infections. J Neuroimmunol 81: 116-126, 1998.
- 4) Ogawara K, Kuwabara S, Mori M, et al: Axonal Guillain-Barré syndrome: relation to anti-ganglioside antibodies and *Campylobacter jejuni* infection in Japan. Ann Neurol 48: 624-631, 2000.
- 5) Narita M: Pathogenesis of neurologic manifestations of *Mycoplasma pneumoniae* infection. Pediatr Neurol 41: 159-166, 2009
- 6) Kusunoki S, Chiba A, Hitoshi S, et al: Anti-Gal-C antibody in autoimmune neuropathies subsequent to mycoplasma infection. Muscle Nerve 18: 409-413, 1995.
- 7) Saida T, Saida K, Dorfman SH, et al: Experimental allergic neuritis induced by sensitization with galactocerebroside. Science 204: 1103-1106, 1979.
- 8) Saida K, Saida T, Brown MJ, et al: In vivo demyelination induced by intraneuronal infection of antigalactocerebroside serum. Am J Pathol 95: 99-116, 1979.
- 9) Kusunoki S, Takizawa H, Kanazawa I: Infection by *Mycoplasma pneumoniae* induces serum antibody against Gal-C. Muscle Nerve 19: 257-258, 1996.
- 10) Ang CW, Tio-Gillen AP, Groen J, et al: Cross-reactive anti-galactocerebroside

- antibodies and *Mycoplasma pneumoniae* infections in Guillain-Barré syndrome. J Neuroimmunol 130: 179-183, 2002.
- 11) Susuki K, Odaka M, Mori M, et al: Acute motor axonal neuropathy after *Mycoplasma* infection - Evidence of molecular mimicry. Neurology 62: 949-956, 2004.
 - 12) Nishimura M, Saida T, Kuroki S, et al: Post-infectious encephalitis with anti-galactocerebroside antibody subsequent to *Mycoplasma pneumoniae* infection. J Neurol Sci 140: 91-95, 1996.
 - 13) Kumada S, Kusaka H, Okaniwa M, et al: Encephalomyelitis subsequent to *Mycoplasma* infection with elevated serum anti-Gal C antibody. Pediatr Neurol 16: 241-244, 1997.
 - 14) 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.
 - 15) Miyachi A, Miyazaki A, Shingu Y, et al: Synthesis and absolute structures of *Mycoplasma pneumoniae* β -glyceroglycolipid antigens. Carbohydr Res 344: 36-43, 2009.

ADEM and GBS subsequent to *Mycoplasma pneumoniae* infection

Susumu Kusunoki

Such neurological disorders as Guillain-Barré syndrome (GBS) and acute disseminated encephalomyelitis (ADEM) may occur after infection by *Mycoplasma pneumoniae*. We reported the frequent presence of anti-galactocerebroside (Gal-C) antibody in sera from patients with GBS and ADEM subsequent to *Mycoplasma pneumoniae* infection. Gal-C is a major glycolipid antigen in the myelin of both the central and peripheral nervous systems. Induction of demyelinating neuropathy in rabbits after sensitization to Gal-C was reported by other groups and anti-Gal-C antibody was shown to be a demyelinating factor. We found that preincubation with the reagent of *Mycoplasma pneumoniae* specifically absorbed the anti-Gal-C antibody activities in the sera. Anti-Gal-C antibody recognized several glycolipids in *Mycoplasma pneumoniae*. Those data show the presence of Gal-C-like structures in *Mycoplasma pneumoniae* and indicates that anti-Gal-C antibodies produced by molecular mimicry mechanism may play a role in the pathogenesis of GBS and ADEM as a demyelinating factor. In the pathogenesis of neurological complications of *Mycoplasma pneumoniae* infection, several other factors also may be involved. Future investigation from several standpoints is necessary.

Key words: *Mycoplasma pneumoniae*, glycolipid, antigalactocerebroside antibody, Guillain-Barré syndrome, acute disseminated encephalomyelitis

〈シンポジウムⅠ〉ゲノムから見た感染症

同じ病原菌種内での菌株の違いをゲノムからみる ：病原性大腸菌を例として

林 哲也

【要旨】細菌のゲノム解析は極めて急速に進展しており、新型シーケンサーの登場によって、この流れは一段と加速されつつある。完全な全ゲノム配列が公表されている菌種・菌株は既に1000を優に超え、概要配列（ドラフト配列）の決定されているものはその数倍にのぼる。細菌の全ゲノム解析が開始された当初から、病原細菌は最も重要なゲノム解析の対象となってきたが、現在、病原細菌に関しては、大部分の主要病原菌種において、少なくとも1株の代表菌株のゲノム解読が終了したといえる状況となっている。さらに最近では、1)マイナーな病原菌種やヒト常在菌種等への解析対象の拡大、2)同一菌種内の多様な菌株を対象とした大規模なゲノム比較、3)常在細菌叢などの対象としたゲノム解析（メタゲノム解析）などの新しい流れが生じてきている。本稿では、2)の研究に焦点を絞り、その例として、私たちの研究室の主な解析対象である腸管出血性大腸菌を取り上げる。具体的には、腸管出血性大腸菌O157と非病原性大腸菌K-12株とのゲノム比較、O157とO157以外の血清型のEHEC(O26, O111, O103)との比較解析、さらには同じO157菌株間でのゲノム比較やその結果を応用したO157菌株の迅速識別キット開発などについて紹介する。

Key words: ゲノム比較、ゲノム多様性、進化、腸管出血性大腸菌、病原性

はじめに

細菌のゲノム解析は極めて急速に進展しており、短時間で大量の配列データが取得できる新型シーケンサーの登場によって、この流れは一段と加速されつつある。完全な全ゲノム配列が公表されている菌種・菌株は既に1000を優に超え、概要配列（ドラフト配列）の決定されているものはその数倍にのぼる。このような状況の中で、最近では様々な環境細菌や有用細菌なども幅広くゲノム解析の対象となってきたが、細菌の全ゲノム解析が開始された当初（1990年代半ば）から、病原菌は常に最も重要なゲノム解析の対象となってきた。このことは病原菌あるいは感染症の研究における全ゲノム情報の必要性あるいは有用性をよく表している。

現在、病原細菌のゲノム解析に関しては、大部分の主要病原菌種において、少なくとも1株の代表菌

株のゲノム解読が終了したといえる状況となっており、病原菌のゲノム解析あるいは医学系の細菌ゲノム研究においては、新しい流れが生じてきている。それらは以下の3点に要約できる。

- (1) マイナーな病原菌種（日和見感染菌など）やヒト常在菌種等へのゲノム解析対象の拡大
- (2) 同一菌種内の、血清型、病原型、進化系統あるいは分離由来（ヒト/動物/環境・重症度・分離地域・場所など）等が異なる多数の菌株のゲノム比較
- (3) 常在細菌叢などの難培養性微生物を含む細菌集団全体を対象としたゲノム解析（メタゲノム解析）

本稿では、(2)の研究に焦点を絞り、その例として、私たちの研究室の主な解析対象である大腸菌、特に種々の病原性大腸菌の中でも臨床的・社会的に最も重要な腸管出血性大腸菌(enterohemorrhagic

E. coli; EHEC)を取り上げる。具体的には、腸管出血性大腸菌 O157と非病原性大腸菌K-12株とのゲノム比較、O157とO157以外の血清型のEHEC (O26, O111, O103) や他の様々な病原型をもった大腸菌株との大規模な比較解析、さらには同じO157菌株間でのゲノム比較やその結果を応用したO157菌株の迅速識別キット開発などについて紹介する。大腸菌での解析結果が他の菌種にもすべて当てはまるわけではないが、様々な病原菌種の中で最も精力的にゲノム解析等が進められている大腸菌の研究成果から、遺伝子の水平伝播を中心としたメカニズムによって、病原細菌が如何にダイナミックに進化・多様化し、異なった病原型や毒力をもった菌株がどのように出現するのか、またゲノム比較から得られた研究成果の臨床への直接的な応用例などをご理解いただきたい。

大腸菌の多様性と腸管出血性大腸菌

大腸菌 *Escherichia coli* は、ヒトを含む多くの脊椎動物の腸内常在菌の1つであり、基本的には病原性は無いか日和見感染を起こすのみである。しかし、病原性大腸菌と呼ばれる一部の菌株はヒトに対して明らかな病原性を示す（図1）。病原性大腸菌は、腸管感染症を起こすもの（下痢原性大腸菌 diarrheagenic *E. coli*; DEC）と腸管外感染症を起こすもの（Extraintestinal pathogenic *E. coli*; ExPEC）に大別され、前者はさらに5ないしは6種類の病原型に分類され、それぞれが異なる病原性を有し、臨床的にも疫学的にも異なる特徴を示す。後者も尿路病原性大腸菌 Uropathogenic *E. coli* (UPEC) や新生児髄膜炎の起因菌などに分類される^{1,2)}。同じ大腸菌の中に、このように多様な病原菌株が出現



図1 大腸菌の多様性と腸管出血性大腸菌

したメカニズムは、それぞれの病原型に特有な外来性の病原遺伝子セットの獲得によると考えられる³⁾。

下痢原性大腸菌の中で、先進諸国において特に問題となっているのが腸管出血性大腸菌EHECである。その理由は、

- (1) 感染力が強く、多数の散発事例だけでなく、大規模な集団感染も起こすこと、(2) 激しい腹痛と出血を伴う出血性大腸炎を起こすこと、(3) 溶血性尿毒症症候群 hemolytic uremic syndrome (HUS) や脳症などの生死にかかる重篤な合併症を引き起こし、先進諸国においても、ある割合で亡くなる患者がであること、(4) 保菌動物（主にウシ）

の腸管に相当な頻度で定着しており感染源となるが、ウジなどでは症状を呈さないことがほとんどのため、感染源の排除は難しいこと、などである。

EHECとしては、O157の血清型をもつ菌株が最も有名であるが、他にも様々な血清型をもつもの (non-O157 EHEC; O26やO111など) が存在するが、全てのEHECに共通する特徴は、志賀毒素 Shiga toxin (Stx) と呼ばれる強力な毒素を産生することである。Stxの遺伝子は、バクテリオファージ（細菌を宿主とするウイルス）が運んでおり、Stxファージの感染と染色体へのファージゲノムの挿入（プロファージとなる）によって、Stx産生性

が附与されている。

多様なEHECは大きく2つのグループ、典型的なもの (typical EHEC) と非典型的なもの (atypical EHEC) に分けて考えることが一般的である。

1) 典型的EHEC

典型的EHECは、LEE (locus for enterocyte effacement) と呼ばれるゲノム領域を有し、この領域には3型分泌系 type III secretion system (T3SS) という蛋白質分泌装置、T3SSによって分泌される数種の蛋白質 (エフェクターとよぶ)、インチミンintiminとよばれる細胞付着因子、遺

伝子発現調節蛋白質などがコードされている。典型的EHECは、何らかの付着因子を用いて腸管上皮細胞に付着 (初期付着) した後、このT3SSを使って、エフェクター蛋白質を宿主細胞内に直接注入し、上皮細胞の形態・機能を変化させ、炎症や下痢などを惹起する (図2)。なお、LEEがコードするT3SSは腸管病原性大腸菌 enteropathogenic *E. coli* (EPEC) と呼ばれる病原性大腸菌にも存在し、典型的EHECはEPECにStxファージが感染することによって出現したという言い方もできる。

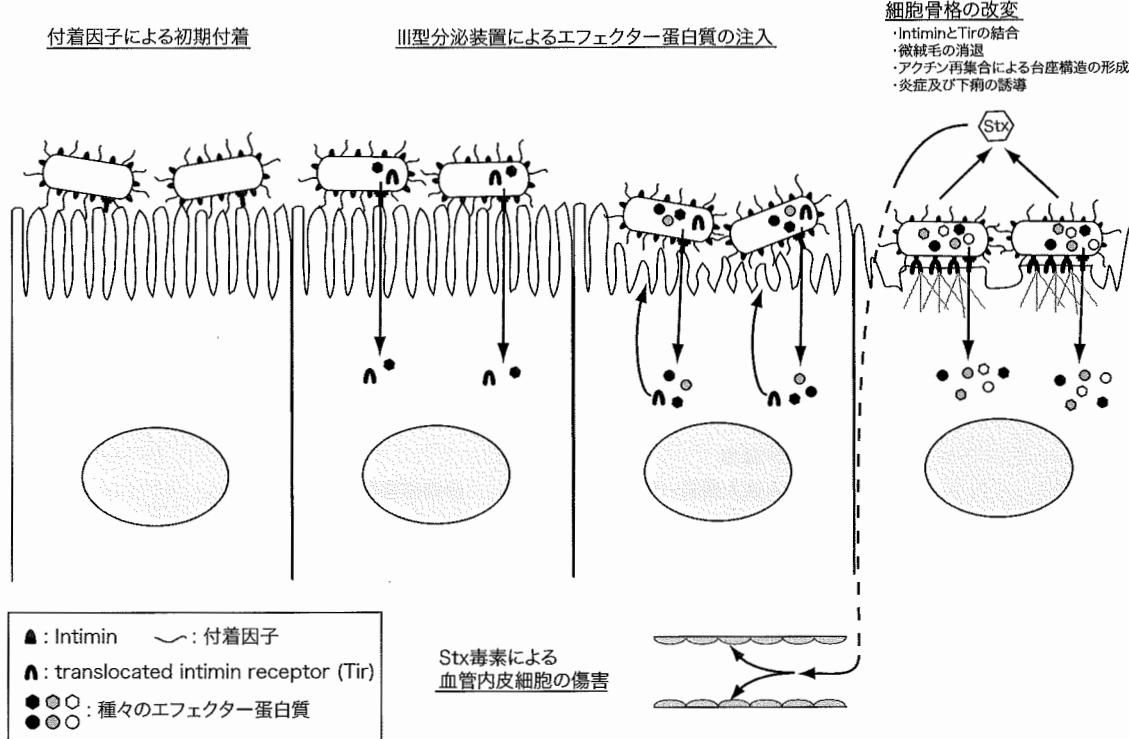


図2 EHECの感染過程：T3SSによる定着・宿主細胞の修飾・炎症および下痢症の惹起とStx毒素の産生

典型的EHECの代表はO157であるが、non-O157 EHECの中ではO26, O111, O103などの血清型をもつ株がメジャーである。これらのnon-O157 EHECはいずれもO157と同様の病原性を有すると考えられているが、HUSなどを合併し重症化する頻度が比較的高いnon-O157 EHECとしては、O26, O111, O103, O121, O145が挙げられる⁴⁾。ただし、我が国で分離されるEHECの約70%はO157が占める (O26は約20%、O111が4%程度)。血清型の分離頻度には、ある程度の地域差はあるものの、世界的にみてもO157が最も重要なEHECとなっている。

2) 非典型的EHEC

Stxを産生するがLEE領域を保有しない大腸菌を一括りにして非典型的EHECという。LEE領域をもたないことから、腸管への付着と腸炎発症のメカニズムは典型的EHECの機構とは異なると考えられるが、その解析はほとんど進んでいない。非典型的EHECの代表であるO113やO91などはヒトに対して確実な病原性を有し、出血性大腸炎やHUSなどの合併症も引き起こすこともある。しかし、その他のマイナーな血清型には単にStx遺伝子を有するだけの菌も含まれていると考えられ、病原性があるか否かがはつきりしない

ものが大部分である。

非典型的EHECの中で注目されるのは、2011年の5月、6月にヨーロッパで大規模な集団感染を引き起こしたO104:H4である⁵⁾。この血清型のEHECは以前にも分離されたことがあるが、極めて稀な血清型であり、まったく注目されていなかった。しかし、今回の事例では、ドイツを中心とする欧洲各国で3000人以上の患者が発生し、800人以上の重症患者と40人以上の死者が出た⁶⁾。このことは、非典型的EHECもけっして軽視してはならないことを示唆する。なお、今回のO104:H4菌株は、腸管凝集性大腸菌(enteroaggregative *E. coli*; EAEC)と呼ばれるタイプの下痢原性大腸菌にStxをコードするファージが感染したものであることが明らかとなっている^{6,7)}。

EHECのゲノム解析

O157のゲノム解析は、2001年という早い時期に（大腸菌としては非病原性の実験室株であるK12株に次いで2番目）、米国のグループによってO157 EDL933株（米国で1980年代に分離された菌株）⁸⁾と我々のグループによってO157 Sakai株（1996年に大阪堺市で発生した大規模集団感染の原因菌株）⁹⁾の全ゲノム配列が解読され、ゲノム情報が利用できるようになったことでO157を用いた研究が大きく前進した。

その後、2009年に我々のグループがO26、O111、O103の全ゲノム配列の決定を行うことに成功し（図3）、これらの主要なnon-O157 EHECが保有する病原遺伝子セットはO157のものと非常に良く似ていることが判明した¹⁰⁾。この結果は、O111などの基本的な病原性メカニズムは、O157の全ゲノム情報やゲノム情報に基づいて、世界各国

の研究者によって展開されている多くの研究によって少しづつ明らかにされてきたO157の病原性メカニズムと良く似たものであることを意味する。

EHECが出現した過程（遺伝的メカニズム）：EHECのパラレル進化

O157のゲノム解析から明らかになった最も重要な点は、O157が大量の外来性DNAを獲得していることである。O157には非病原性大腸菌K-12株には存在しない1,500 kbものゲノム配列が存在し、そのほとんどはO157のゲノム上に多数存在するファージやファージ様遺伝因子、あるいはプラスミドに由来する外来性のDNAである。そこには1700もの遺伝子がコードされており（当然K-12株には存在しない）、この中にStx遺伝子やT3SSの遺伝子群をはじめとする多数の病原遺伝子が存在する。したがって、O157は多数のファージやファージ様遺伝因子、あるいはプラスミドを介してO157に特有の病原遺伝子セットを獲得し、その病原性を進化させてきたといえる（図4）。

このような外来性病原遺伝子の獲得の中で特に面白いのは、T3SSの進化である。既に述べたように、LEE領域（これもファージ様の外来性遺伝因子の1つ）の獲得により、O157にはT3SSの基本的な要素（分泌装置と7種のエフェクターなど）が備わっている。しかし、LEE領域とは別に、多数のファージがエフェクターをコードする遺伝子を運び込んでおり、O157が產生するT3SSエフェクターは40種類にもなる¹¹⁾。したがって、O157のT3SSという病原システムは、LEE領域に加えて、多数のファージが次々と感染して多数のエフェクターなどを持ち込むことによって進化した複雑なシステムといえる。

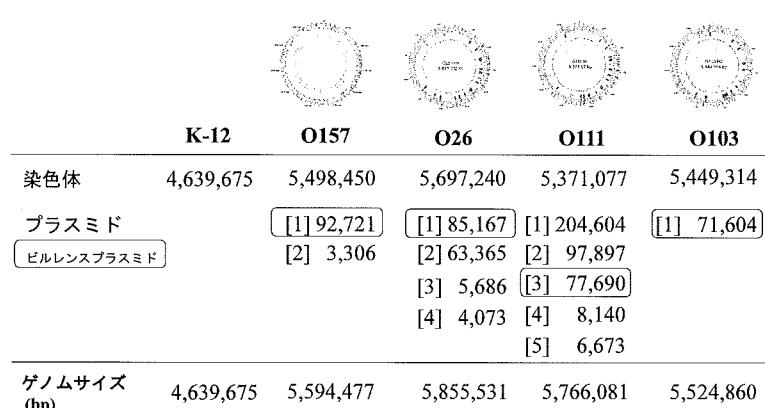


図3 腸管出血性大腸菌O157, O26, O111, O103の全ゲノム解析(K-12株との比較)

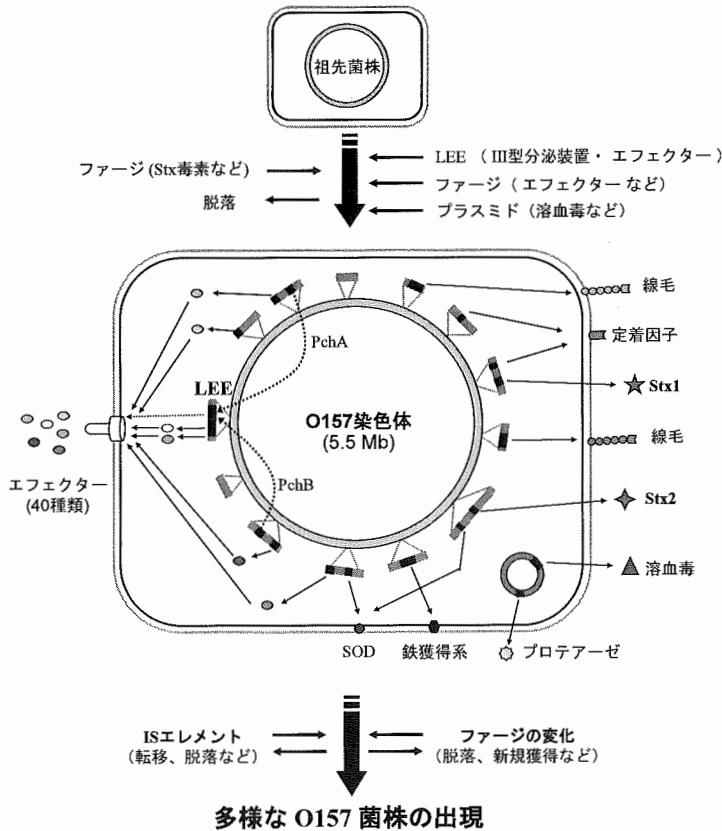


図4 O157の出現・進化と多様化のメカニズム(模式図)

この模式図はO157のゲノム解析から明らかになってきたO157の出現・進化の過程を示すために作成したものであるが、模式的にはO26, O111, O103などのnon-O157 EHECの出現・進化および多様化の過程もまったく同じと考えてよい。

一方、O111, O26, O103にも多数のファージやファージ様の遺伝因子が感染しており、病原遺伝子をコードするプラスミドも存在し、これらの転移性遺伝因子の獲得を通して、非常に良く似た病原遺伝子セットを獲得している。面白いことに、全ての大腸菌に保存されているゲノム配列に基づいた進化系統解析の結果では、これらのnon-O157 EHECはいずれもO157とは独立に進化してきた大腸菌株である(図5)。ただし、同じ病原遺伝子を運んでいるファージ(例えばStxをコードするファージ)は、各EHECで多様性が存在し、同じではない。同様に、同じような病原遺伝子(溶血毒素やプロテアーゼなど)をコードするEHECのビルレンスプラスミドもプラスミド自体の構造は異なる。したがって、同じファージやプラスミドがEHEC間で直接やり取りされたわけではなく、それぞれが独自にファージやプラスミドなどを獲得することで、結果的に同じような病原遺伝子セットを獲得し、同じような病原性を持った大腸菌として出現したと考えてよい(図5)。何故こういった一種の収斂進化が生じたのかは不明であり、様々な議論があるが、このような進化は「EHECの平行進化 parallel evolution of EHEC」と呼ばれている¹⁰⁾¹²⁾。

O157株間でのゲノムの多様性

各地で分離されるO157株をPFGE(パルスフィールドゲル電気泳動)で解析すると様々なゲノムの制限酵素切断パターンが観察され、このような多様性は、O157菌株の疫学調査(集団感染の検出や感染源の追跡など)に広く利用されている。しかし、このような制限酵素切断パターンの多様性が存在するということは、ゲノム自体の配列や構造に何らかのバリエーション(多様性)が存在することを意味する。そこでは、我々のグループでは、国内で分離されたO157の中から8株を選び、マイクロアレイを使ったComparative genomic hybridization(CGH)解析と我々が独自に開発したlong PCRを用いたゲノム比較解析法(全ゲノムPCTRスキャニング; whole genome PCR scanning)を用いて、Sakai株をレファランス配列としたO157株間でのゲノム多様性解析を進めてきた¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾。その結果、O157のゲノム上に多数存在するプロファージ領域には予想以上に激しい多型(サイズの大きな構造多型)が存在すること、また、様々なゲノム領域で検出されるサイズの小さな構造多型の形成には2種類のISエレメント(最も単純なトランス

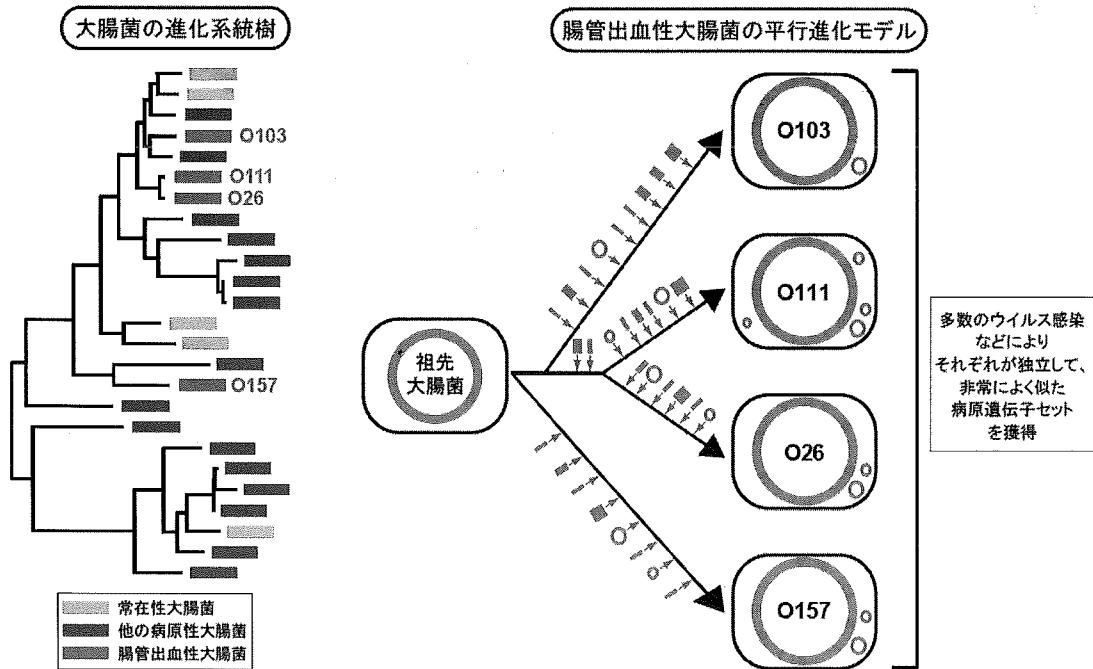


図5 EHECのパラレル進化

左図は各種大腸菌に保存されている900遺伝子の配列を基に作成した系統樹の模式図。O157, O111, O26, O103などのEHECはそれぞれ異なる系統の大腸菌株であることがわかる。

ポゾン) が関与していることを明らかにしている。このことは、O157ではファージの入れ替わりやファージ間での組換え、ISエレメントの転移や転移に伴うゲノムの欠失やリアレンジメントが頻繁に生じており、こういった遺伝的イベントによって現在でも様々なゲノム多様性を持ったO157菌株が活発に生み出されていることを意味する(図4)。non-O157 EHECでは、菌株間でのゲノム多様性解析はあまり進んでいないが¹⁷⁾、ゲノム構造やその出現のメカニズムから考えると、同じような現象(株間でのゲノム多様化)が他のEHECでも生じている可能性が高い。

一方、こういった菌株間でのゲノム多様性研究の成果に基づいて、我々のグループではISエレメント(この場合はIS629という種類)のゲノム挿入部位の多様性を応用したO157の迅速菌株識別法を開発している¹⁸⁾。このシステムはO157 IS-printing systemとしてTOYOBOからキットとして販売され、地方衛生研究所などで、PFGE法を補完する迅速なファーストスクリーニング法として既に使用されている(図6)。さらに、IS629を介してゲノムの多様性が生じるメカニズムを解析する中で(国立

動物衛生研究所の楠本博士との共同研究)、IS-Excision Enhancer (IEE) という、ISの脱落あるいはそれに伴うゲノムの欠失を誘導するまったく新しい蛋白質を発見するなど、学術的には極めて重要な知見も得られている¹⁹⁾。

結語

本項で紹介したデータは、EHECという特定のタイプの病原性大腸菌のものであり、EHECで見られたゲノム進化や多様化の様式・メカニズムが他の菌種にもすべて当てはまるわけではない。しかし、他の病原菌も様々な形でダイナミックな進化・多様化を遂げており、少なくとも重要な病原菌種においては、菌種内でのゲノム多様性研究を積極的かつ大規模に進める必要がある。そういう研究から得られる結果は、生物の進化・多様化メカニズムといった極めて基礎的な研究分野だけでなく、O157の研究成果からも理解できるように、疫学解析などにも直接的な応用が可能である。新型シーケンサーの普及が、こういった研究の推進に大きく貢献することは間違いない。

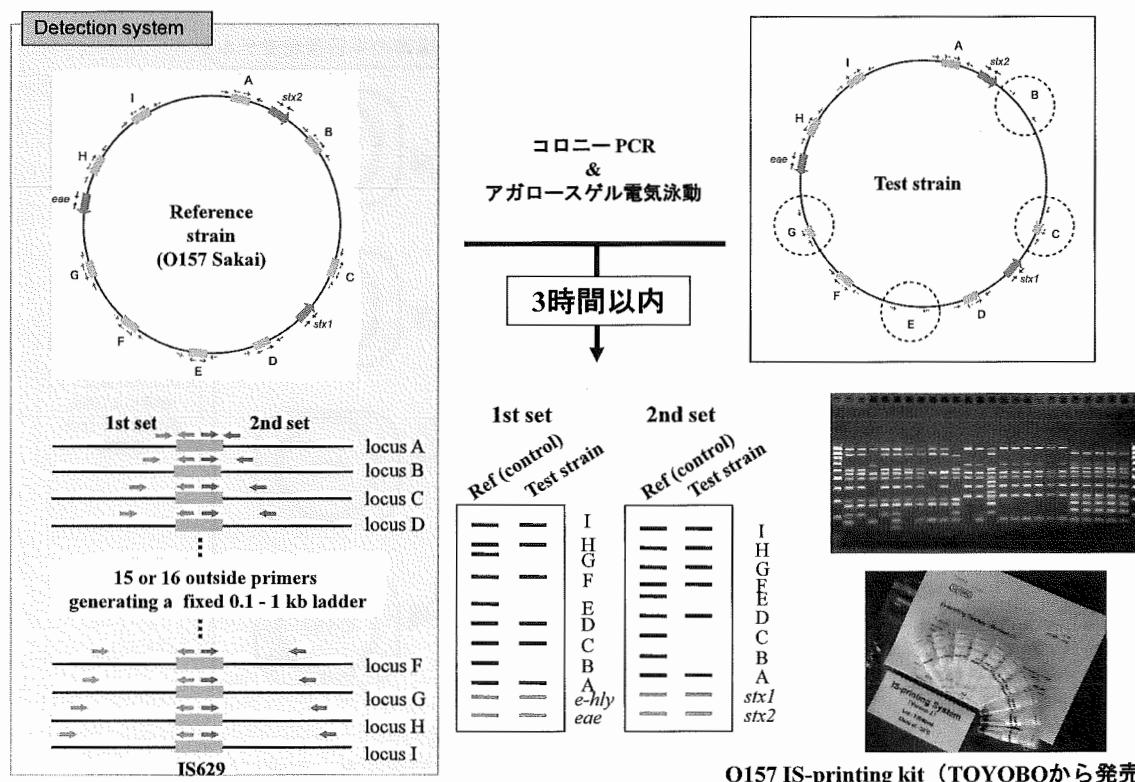


図6 O157菌株間でのIS629挿入部位のバリエーションを利用したO157菌株迅速識別システム

参考文献

- Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. 1998; C Microbiol Rev 11: 142-201.
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. 2004; Nat Rev Microbiol 2: 123-140.
- Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. Nat Rev Microbiol 2010; 8: 26-38.
- Karmali MA, Mascarenhas M, Shen S, et al. Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. 2003; J Clin Microbiol 41: 4930-4940.
- Frank C, Werber D, Cramer JP, et al. Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. 2011; N Engl J Med 365:1771-1780.
- Rasko DA, Webster DR, Sahl JW, et al. Origins of the *E. coli* strain causing an outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany. 2011; N Engl J Med 365: 709-717.
- Perna NT, Plunkett G 3rd, Burland V, et al. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. 2001; Nature 409: 529-533.
- Hayashi T, Makino K, Ohnishi M, et al. Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. 2001; DNA Res 8: 11-22.
- Ogura Y, Ooka T, Iguchi A, et al. Comparative genomics reveal the mechanism of the parallel evolution of O157 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. 2009; Proc Natl Acad Sci USA 106: 17939-17944.
- Tobe T, Beatson SA, Taniguchi H, et al. An extensive repertoire of type III secretion effectors in *Escherichia coli*

- O157 and the role of lambdoid phages in their dissemination. 2006; Proc Natl Acad Sci USA 103:14941-4946.
- 12) Reid SD, Herbelin CJ, Bumbaugh AC, et al. Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*. 2000; Nature 406: 64-67.
- 13) Ohnishi M, Terajima J, Kurokawa K, et al. Genomic diversity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 revealed by whole genome PCR scanning. 2002; Proc Natl Acad Sci USA 99: 17043-17048
- 14) Ogura Y, Kurokawa K, Ooka T, et al. Complexity of the Genomic Diversity in Entrohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 Revealed by the Combinational Use of the O157 Sakai OligoDNA Microarray and the Whole Genome PCR scanning. 2006; DNA Res 13: 3-14.
- 15) Ooka T, Ogura Y, Asadulghani M, et al. Inference of the impact of insertion sequence (IS) elements on bacterial genome diversification through analysis of small-size structural polymorphisms in *Escherichia coli* O157 genomes. 2009; Genome Res 19: 1809-1816.
- 16) Leopold SR, Magrini V, Holt NJ, et al. A precise reconstruction of the emergence and constrained radiations of *Escherichia coli* O157 portrayed by backbone concatenomic analysis. 2009; Proc Natl Acad Sci USA 106 : 8713-8718.
- 17) Ogura Y, Ooka T, Asadulghani, et al. Extensive genomic diversity and selective conservation of virulence-determinants in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strains of O157 and non-O157 serotypes. 2007; Genome Biol 8: R138.
- 18) Ooka T, Terajima J, Kusumoto M, et al. Development of a multiplex PCR-based rapid typing method for enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains. 2009; J Clin Microbiol 47: 2888-2894.
- 19) Kusumoto M, Ooka T, Ogura Y, et al. Insertion sequence-excision enhancer removes transposable elements from bacterial genomes and induces various genomic deletions. 2011; Nat Commun 2: 152.

Genomic comparison pathogenic *E. coli* strains, an example of intra-species genomic comparison of pathogens

Tetsuya Hayashi

[Abstract] Bacterial genome sequencing is very rapidly progressing, which is further being enhanced by new-generation sequencing technologies. The number of published sequenced is more than 1000 and much more draft sequences are available in data-bases. Since the very of bacterial genome sequencing, pathogenic bacteria have been main targets of the analysis, and now, at least one representative strain has been sequenced in almost all major pathogenic species. In this research field, several new trends have been emerged; 1) expansion of targets to minor pathogens and commensals, 2) large scale comparative intra-species analyses using a number of strains with different origins or characters, 3) metagenomic analyses of microbial communities, such as intestinal microbiota. The focus of this article is the large scale intra-species analysis, and as an example of such analysis, I describe the data that have been obtained from a series of our researches on enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) strains, which include genomic comparisons of EHEC O157 and non-pathogenic strain K-12, of O157 and non-O157 EHECs (O26, O111, and O103 EHECs), and of multiple O157 EHEC strains. A rapid strain discrimination system, which we developed on the basis of the results of genomic comparisons of O157 strains, is also described

Key words: genomic comparison, genome diversity, evolution, enterohemorrhagic *E. coli*, pathogenicity

〈シンポジウムⅠ〉ゲノムから見た感染症

網羅的ゲノム解析によるヒラメ喫食に関連する 嘔吐下痢症の原因物質の探索

大西 真¹、黒田 誠²、八幡裕一郎³

【要旨】国内において原因不明の嘔吐下痢集団事例が近年増加傾向にあった。そこで、その原因を探るために原因不明事例の疫学解析をおこない、その一部においてヒラメが原因食品である可能性が示された。ハイスクロープットDNAシークエンサーを用いて、関連が疑われたヒラメおよび参照ヒラメに対する網羅的ゲノム解析を行った。比較解析からヒラメに寄生する*Kudoa*属粘液胞子虫が事例関連ヒラメに存在することを示した。このことにより、粘液胞子虫が原因微生物である可能性を指摘するに至り、網羅的なメタゲノム解析が有効であった例を紹介する。

食品を介した嘔吐下痢症

食中毒とは食品に起因する急性胃腸炎および神経障害などの中毒症の総称であり、食中毒原因微生物、化学性毒物などで汚染された飲食物の喫食により集団的に発生する。食品衛生法は食中毒が発生した場合の報告・調査・行政処分等を定めている。食中毒患者等を診断した医師は、24時間以内に文書・電話・口頭により最寄りの保健所長に届け出なければならない。あるいは保健所長が食中毒患者等の発生を認めるときは、速やかに都道府県知事等に報告することとなっている。これら情報を集積した厚生労働省の食中毒統計資料によると、年間1000-1500件程度の食中毒事例が報告され、患者総数は20,000-40,000におよぶ。原因物質は細菌、ウイルス、化学物質、自然毒等多岐にわたり、その同定作業には体系的な検査診断が必須である。既知原因物質の特定に至らない場合は、原因不明のまま報告するか、有症苦情として扱われることになる。

原因不明の食中毒事例

検査技術の発達、ウイルス性食中毒に関する知見の集積から平成10年以降では95%を超える事例において何らかの原因物質の特定が可能となってき

た。しかしながら、平成19年以降原因不明食中毒事例の報告の割合が増加しており、調査の必要性が高まった。この背景の一つとして、平成12年以降瀬戸内海沿岸地域において嘔吐・下痢を主症状とし重篤な状態に陥ることなく1~2日で軽快する症例が散見されはじめたことがあげられた¹⁾。

この原因不明の食中毒事例に関する全国調査の結果から、瀬戸内沿岸特有のものではなく、全国的に発生していることが明らかとなった¹⁾。主要症状は下痢、嘔吐、嘔氣である、潜伏時間は12時間以内の例が多く、また、推定原因食品の調査では、非加熱魚介類の提供との関連が疑われた。通常、このような主要症状および潜伏時間からは黄色ブドウ球菌などの毒素産生性細菌との関連が疑われるが、通常の検査では既知の病原体あるいは毒素は検出されず、原因物質の特定は困難であった。

原因不明事例の疫学的解析

原因不明の食中毒あるいは有症苦情という形で地方自治体への報告が蓄積されてきた。厚生労働省の食中毒統計によると、原因物質不明の食中毒事例の全体に対する割合は平成10年を境に減少した(図1)。これはウイルス性食中毒の報告がなされるようになったことに起因する。一方で原因不明食中毒

1：国立感染症研究所 細菌第一部 (〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1)

2：病原体ゲノム解析研究センター、3：感染症情報センター

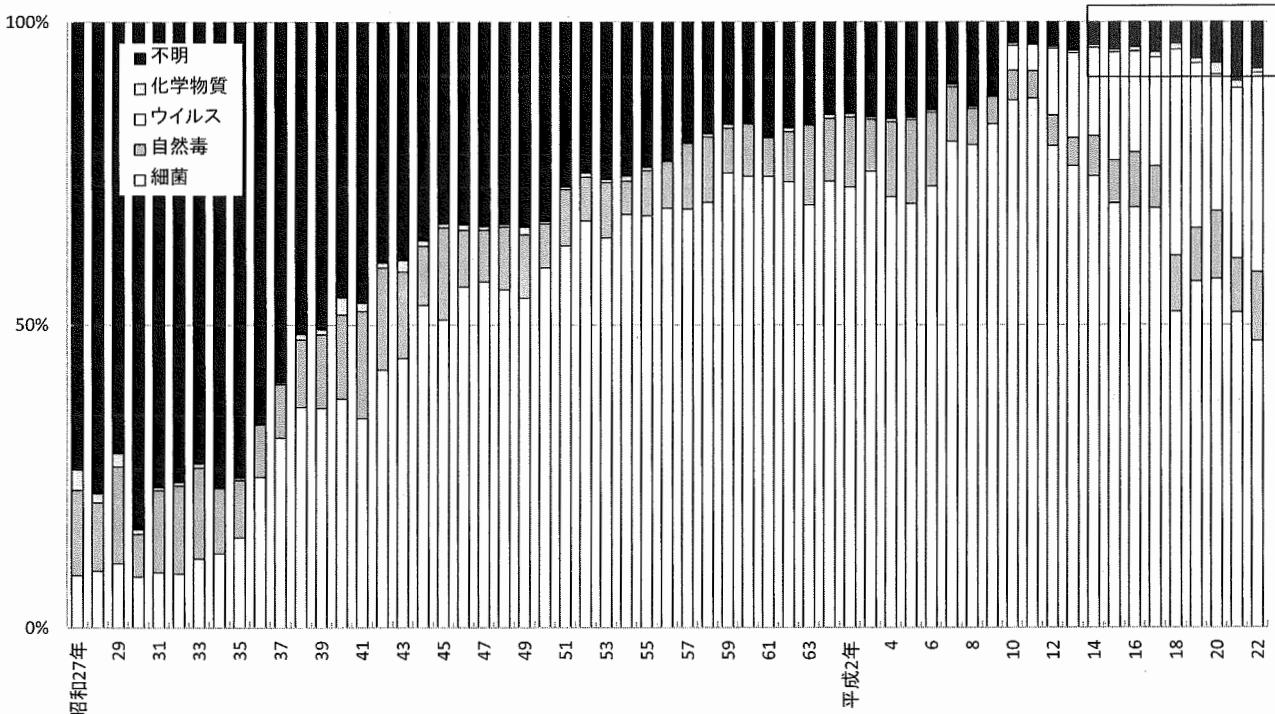


図1 原因物質別構成割合の年次推移

厚生労働省食中毒統計から原因物質数を抽出し、原因物質を細菌、自然毒、化学物質、ウイルス、不明に分類しその構成割合の年次推移を示した。図右上の四角で囲んだ部分に着目すると、原因物質不明食中毒の割合が増加する傾向が読み取れる。

事例は、平成19年頃より再び増加傾向がみられるようになった。

病因物質不明であるため地方自治体における検査実務、原因が疑われる施設への指導等の行政対応に苦慮する事態が引き起こされた。そこで、平成21年より厚生労働省を中心に有症苦情事例の情報および検体の収集が行われ、状況把握が進められてきた。

国立感染症研究所感染症情報センターにおいて、疫学的な解析が開始された。「一過性の下痢、嘔気および嘔吐を主症状とする集団発生であり、既知の病原物質が検出されない、あるいは検出されても症状等と合致しない有症例」を症例定義として用いた。2008年10月より2010年6月の期間に全国で145件の病因物質不明事例の報告があり、そのうち摂食者30名以上かつ発症者10名以上の事例が25事例存在した。そのうち18例について詳細な検討がなされた。摂食者における発症割合は11.9%-85.7%であった。発症者が共通の食事をしてから発症するまでの時間の中央値4.5-16.3時間に分布し、最短1時間、最長43時間であった。共通して摂食されているヒラメのOdd比は0.4から43と幅広く、加えてその他の食品でも高いOdd比を示すものがあり今回解析された事例が全て単一の原因食

材であることは否定的であった。しかし、少なくともヒラメ喫食が原因となる事例が存在することが強く示唆された。特に今回解析された事例のうち、3つの事例においては有意に高いOdd比、17.11(1.87-157.26)、43.0(2.36-784.1)および37.32(4.57-257.88)(括弧内は95%信頼区間)を示し、ヒラメ喫食と発症の強い相関が認められた(表1)。これらの3つの事例の発症者における下痢、嘔気、嘔吐、腹痛を示す症例の割合を表1に示し、また、喫食から発症までの時間を図2に示した。いずれの事例においても7-9時間あるいは4-6時間の間に発症する患者がピークを示し、12時間以内に発症する患者が70% (事例A=73.3%、事例B=81.0%、事例C=89.6%)を超えていた。

いずれの事例も既知の病原体の存在は証明されていないことから、既知の病原体が従来の方法で検出感度以下存在しているか、あるいは未知の病原微生物によりヒラメが汚染されていることが推測された。網羅的なゲノム解析を実施することで未知、あるいは微量の既知病原体の存在を検証することが可能であると考え、国立感染症病原体ゲノム解析センターにおいてその可能性を追求することとなった。

表1 ヒラメ喫食が疑われた嘔吐・下痢集団事例

Outbreak	Date	Incubation Period (h)			OR	95% CI	Symptom (%)			
		Median	Min	Max			Diarrhea	Nausea	Emesis	Abdominal Pain
A	11, 2009	7.0	1.0	24.5	17.11	1.87-157.26	73.3	26.7	53.3	13.3
B	11, 2009	6.5	2.5	24.5	43.00	2.36-784.10	66.7	71.4	76.2	19.0
C	5, 2010	5.0	3.0	43.0	37.32	4.57-257.88	75.0	64.6	43.8	64.6

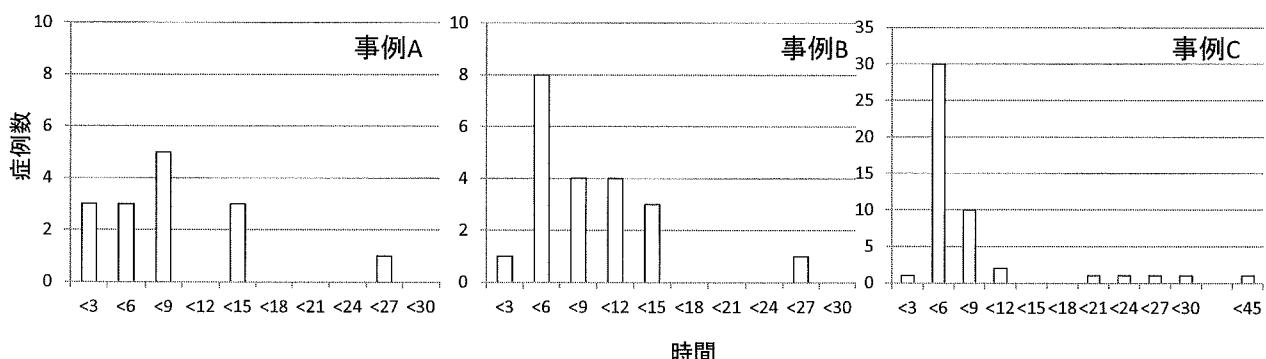


図2 嘂食から発症までの時間
3つのヒラメ喫食が原因と考えられた事例の各症例におけるヒラメ喫食と発症までの時間の分布を示した。

解析対象検体の選定

食中毒には大きく毒素型と感染型との2つの型に分類出来る。それぞれ、食品中において原因微生物から産生された毒素を摂取することが原因となるものと、摂取された食品中の原因微生物が体内で増殖することが原因となるものである。今回着目したヒラメ喫食に関連する事例は潜伏時間が比較的短いことから毒素型の食中毒の特徴をもつ。

そこで網羅的ゲノム解析を実施するために、解析検体の種類を検討した。検体としては、吐瀉物あるいは下痢便のような臨床椪体を解析するか、あるいは推定された原因食材を解析するかの2通りが考えられる。今回の事例は毒素型の可能性が否定できないため、臨床椪体を用いるよりも食品を直接解析する方がより原因物質の推定の可能性が高いと判断した。

次に、仮定する未知の病原体の存在が微量であると想定し、如何に食品由来のDNAとの仕分けを行うかを検討した。ヒラメゲノム配列は解読されておらず、網羅的ゲノム解析により得られる配列情報から効率的にヒラメゲノム由来配列を除くことが困難であると予想された。推定される汚染病原体が細菌であると仮定するならば、原核生物に特有の16SリボソームRNA遺伝子をPCR法により網羅的に増幅することで細菌由来のDNA断片のヒラメ由来

DNAに対する存在比を高めることが可能である。しかしながら、ウイルス、真菌、寄生虫が原因物質である場合には効果がない。そこで、事例と関連しないヒラメ切り身から同時にゲノム配列情報を取得し、事例関連ヒラメからのゲノム配列情報との比較解析を行うこととした。

ハイスループットシークエンサーの利用

近年、従来の塩基配列決定法と比較して高速で大量のDNA配列取得することが可能な手法を用いた解析機器が実用化されている。また、ランニングコストも従来法に比べ安価であり、短時間で従来法の数百倍もの配列情報を得ることが出来ることから、解析目的とそれに見合い解析デザインを用意することが可能であれば、その利用価値は高い。今回のプロジェクトにおいては、未知の病原体のゲノム情報を、断片的でもよいから抽出することを目的とした。また、解析デザインの骨格は、参照ゲノム（事例と関連しないヒラメ）と対象ゲノム（事例関連のヒラメ）から得られる配列情報の比較（引き算）を行うこととした。膨大な食品由来DNA断片のなかから未知の病原体ゲノム配列を抽出する必要があり、このような解析デザインは従来の塩基配列決定法のみでは、実現が困難である。ハイスループットのシークエンサーが利用可能であることが前提とな

る。国立感染症研究所 病原体ゲノム解析センターに設置されている、Illumina Genetic Analyzer IIを利用することで計画を実施することとなった。

網羅的ゲノム解析

ヒラメ喫食が原因と考えられた嘔吐・下痢発症事例におけるヒラメ残品(HIRAME-0904)および築地市場で入手したヒラメ(HIRAME-Control)を対象に網羅的なゲノム配列の取得を実施した。これら2種類のヒラメ検体は国立医薬品食品衛生研究所から冷凍状態で提供をうけた。RNAゲノムをもつウイルスが原因となっている可能性も否定出来ない。検体から得られたRNAからcDNAを作成し、ゲノムDNAと併せて解析することで解析の網羅性を高めることとした(図3)。以下に簡単に実際の作業工程を述べる。

2種のヒラメの筋肉組織(30 mg)からゲノムDNAおよびRNAをAmbion Total Nucleic acid purification kitを用いて精製した。RNAからはInvitrogen SuperScript choice systemにて2本鎖cDNAを作成した。DNAおよびcDNAを混合し、イルミナ解読用のDNAライブラリー(平均100 bpインサート長)を作成し、Illumina GA IIを用いて網羅的塩基配列決定を行った。HIRAME-Control由来のDNA配列を1567万本、事例関連ヒラメ HIRAME-0904由来のDNA配列を1435万

本取得することに成功した(図3)。相同性検索プログラムMEGABLASTを利用してことで、HIRAME-0904由来DNA配列のうち、HIRAME-Control由来配列と相同性を持つものを除去した(図4)。残ったDNA配列283万本がHIRAME-0904からのみ得られた特徴的なDNA配列であることを示す。

次にHIRAME-0904から得られた特徴的なDNA配列を核酸データベースに対して相同性検索を行い、その結果をMEGANによりTaxonomy分類した(図4)。283万本のHIRAME-0904に特徴的な配列と考えられたもののうち、データベース上に存在する既知配列に相同性を示さない配列が235万本であり、HIRAME-0904由来配列1435万本のうち16.4%を占めた。データベースに登録されているウイルスあるいは細菌由来の配列との相同性を示す配列は797および783本であった。これらの配列の中で既知の腸管病原性を示す微生物由来であることが推測されたものはほとんど存在しなかった。一方、真核生物由来の配列と相同性を示すものが47万本存在し、ウイルスあるいは細菌由来のものよりも500倍ほど多く存在した。それらの配列の詳細な分類を検討すると、ミクソゾア門に分類される粘液胞子虫(*Kudoidae*)の配列と相同性を示すものが37万本と際立って多量に存在することが示された。また、実際にヒラメ筋肉中に*Kudoa*属に特徴的な胞子が確認された。

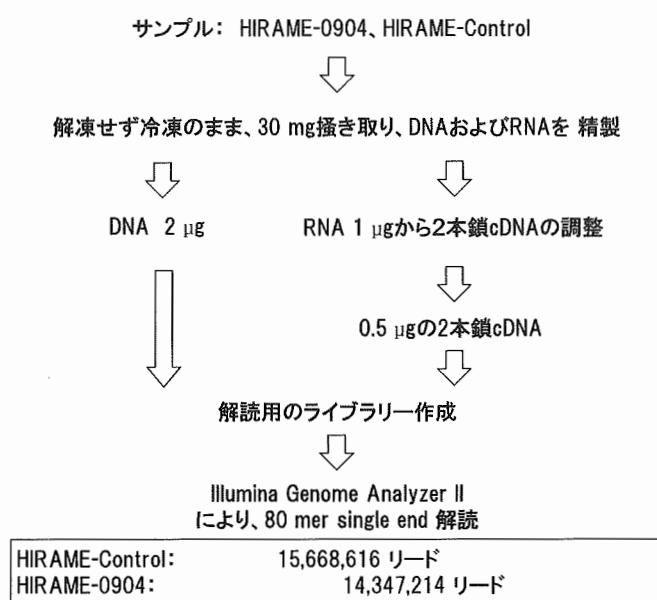


図3 網羅的メタゲノム解析における検体処理スキーム

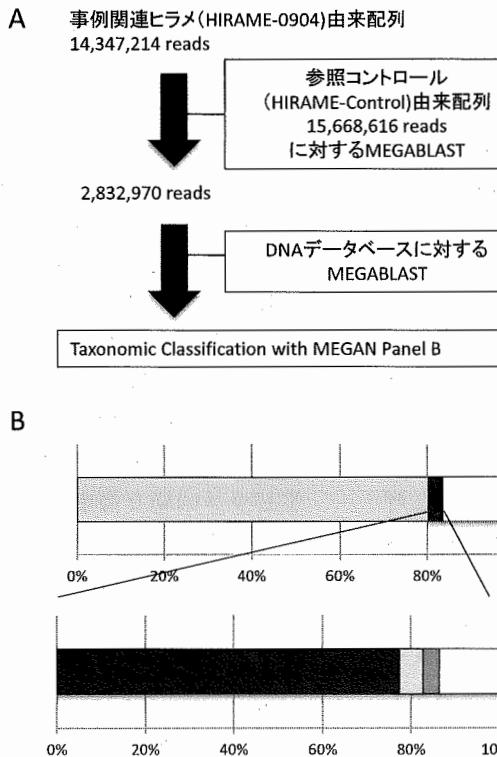


図4 網羅的メタゲノム解析における解析スキーム(A)および配列の由来の推測(B)

事例関連ヒラメ由来の配列から、参照ヒラメ由来の配列と共に見られる配列を除去し、事例関連ヒラメ由来に特異的に存在する配列をデータベース検索することで、その由来を推測した。細菌あるいはウイルス由来の配列と推測されたものは、それぞれ783本、797本であり全体の0.005%に相当するに過ぎなかった。

定量的PCR系の確立

原因不明の嘔吐・下痢症と関連が疑われるヒラメ残品 (HIRAME-0904) から、*Kudoa* 属の18SリボゾームRNA遺伝子の増幅し、その配列決定を試みた。既報の増幅プライマーSSU1およびSSU3の組み合わせで、HIRAME-0904由来DNAを鋳型にした場合に1.1 kbの特異的増幅が認められた。アガロースゲルより1.1 kbの増幅DNA断片を抽出した後、塩基配列決定した。得られた配列は*K. thalassomi* 18SリボゾームRNA遺伝子と98%の相同意を示した。この配列は後にDNAデータベースに登録された*K. septempunctata* 由来配列と完全に一致した。これらのことから*K. septempunctata* が事例関連ヒラメに寄生していたことが強く示唆された。しかしながら、これまで*Kudoa* 属粘液胞子虫のヒト病原性に関する知見は全く報告されておらず、ゲノム配列の存在のみでは原因物質と考えることは困難であった。そこで、事例関連ヒラメにおける*Kudoa* spp. の存在を確認するために定量的RT-PCRの検査系を確立した(図5)。ヒラメ18Sr RNAならびに*Kudoa* spp. それぞれに特異的なPCRプライマーを設計し、精製し

たRNAを鋳型にして増幅を試みた。用いた検体は嘔吐・下痢事例との関連が認められないヒラメ8検体と、事例との関連が疑われるヒラメ5検体を用いた。定量的RT-PCRにおいて、参照ヒラメを対象とした場合には有意な増幅が認められなかつたが、有症事例に関連するヒラメでは30サイクル以内に有意な増幅が認められた(図5)。

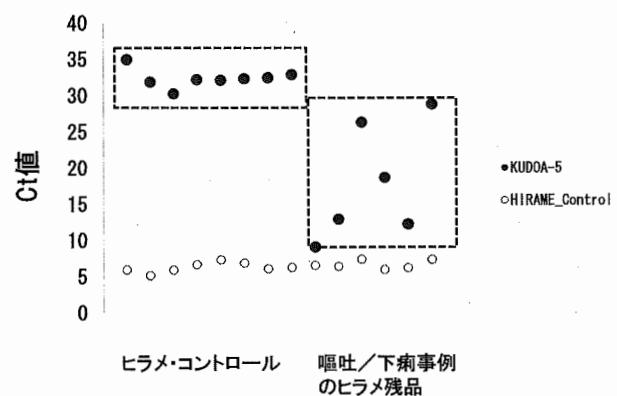


図5 定量的RT-PCR法による解析
Paralichthys lethostigma(ヒラメ)18S ribosomal RNA gene *Kudoa* spp. 18S-rDNAのアライメントから、ヒラメ、*Kudoa* spp. それぞれに特異的なプライマー設計して実験に用いた。

粘液胞子虫とは

粘液胞子虫はミクソゾア門 (Phylum Myxozoa) に属する生物で、水棲の脊椎動物と無脊椎動物、主に魚類と環形動物の2つの宿主の間を交互に寄生する複雑で特徴的な生活環を持つ。その詳細は他の総説²⁾に譲るが、以下に概略を紹介したい。

元来、ミクソゾア門は2つの綱、粘液胞子虫綱 (Class Myxosporea) および放線胞子虫 (Class Actinosporea) から構成されていた。これは、宿主から放出される胞子が形態的に全く異なっており、異なる生物として認識されていた。1984年のWolfとMarkiw³⁾によって、ニジマスの旋回病と呼ばれる魚病の原因となる粘液胞子虫 (*Myxobolus cerebralis*) の胞子がイトミミズに取り込まれることで放線胞子虫 (*Triactinomyxon gyrosalmo*) に変態することが報告された。興味深いことにイトミミズから放出された放線胞子虫はニジマスに感染することが実験的に示されたことである。このことから、放線胞子虫は粘液胞子虫の生活環の1ステージに過ぎず、同一の生物であると認識されはじめた。

現在では、粘液胞子虫の生活環の概要是次のように考えられている。魚類に寄生している粘液胞子虫の粘液胞子がなんらかの要因で魚の体外に放出された後、環形動物に経口的に摂取される。環形動物の体内で増殖、放線胞子形成が行われる。虫体が成熟したのち、環形動物の体外に排泄され、水中で浮遊する放線胞子が魚に接触することで魚に感染することになる。魚への侵入門戸については種に依存して異なるようであるが、体表、鰓、鰓、食道等多様であるとされる⁴⁾⁻⁶⁾。古くから粘液胞子虫感染と魚病については多くの知見が蓄積されてきているが、ヒトに対する病原性についての報告は存在しない。

粘液胞子虫綱 (Class Myxosporea) の胞子は、殻に囲まれた胞子原形質と複数の極囊からなる。極囊の数は様々であるが、4つ以上の極囊を持つ粘液胞子虫は *Kudoa* 属に分類される。これまで多くの種が報告されているが、2010年にも養殖ヒラメの筋肉組織より7つの極囊を持つ *Kudoa* 属粘液胞子虫が見いだされ、報告された⁷⁾。この粘液胞子虫は形態ならびに18SリボソームRNA遺伝子の配列から、新種 *Kudoa septempunctata* として提案された⁷⁾。本網羅的解析から得られた *Kudoa* 属粘液胞子虫も、18SリボソームRNA遺伝子の配列から *K. septempunctata* であると考えられた。ヒラメに寄生する *Kudoa* 属粘液胞子虫としては *K. thrysites* が報告されているが、*K. thrysites* がヒトに対して

病原性を示す報告はない。

K. septempunctata の病原性

K. septempunctata の腸管毒性について評価法の構築が国立医薬品食品衛生研究所、大阪府公衆衛生研究所等で精力的に進められている。下痢原性の評価に関しては乳飲みマウスを用いた動物モデルによる評価が進められてきた。他方、嘔吐活性評価のためのモデル動物であるスンクスを用いた実験系の開発が進められてきた。それぞれ、*K. senptempuctata* の精製された胞子あるいは *K. senptempuctata* 寄生ヒラメの切り身を用いた実験で腸管液体貯留活性および嘔吐活性が確認されている⁸⁾。しかしながら、それぞれの活性に関する病原因子の特定には至っていないため、より簡便な活性評価法の確立が求められている。簡便な毒性評価法の確立は、*K. senptempuctata* の病原機構の解明に不可欠である。また、*K. senptempuctata* が原因と考えられる食中毒の予防方策を立案するためにも必須であると考えられる。

おわりに

本稿では網羅的ゲノム解析によるヒラメ喫食に関連する嘔吐下痢症の原因物質の探索について紹介した。神経感染症とは直接的な関係はない本稿ではあるが、近年凄まじい技術的進歩を遂げているハイスクループットシーケンサーの利用例として参考にしていただきたい。原因微生物の判明が難しい感染症例における、原因診断のアプローチの一つとして今後さらに活用例が増加することが予想される。今回紹介したケースのように、全く予想もしない微生物が疾病と関連する可能性を示唆する場合もでてくることも予想される。当然、微生物の存在を示すのみでは病因物質と判断することは出来ない。しかしながら、網羅的ゲノム配列から得られた情報を利用することで、検討課題の抽出解析手法の構築の道筋が立てられる意義は大きい。

K. senptempuctata の生活環に関しては不明な点が多い。特に養殖ヒラメにおける *K. senptempuctata* が寄生する機会、さらには天然ヒラメにおける *K. senptempuctata* の寄生状況についての知見が必要と考えられる。また、ヒラメに寄生する他のクドア属粘液胞子虫 *K. thrysites* との鑑別、さらには他の *Kudoa* 属粘液胞子虫との鑑別法の開発が必要である。

本研究は厚生労働科学と区別研究事業（研究代表者 国立医薬品食品衛生研究所 小西良子博士）により進められた。本稿では、特に網羅的ゲノム解析に焦点を当てて紹介したが、多くの先生方との共同研究の一部である。特に、国立医薬品食品衛生研究所 小西良子博士、大西貴弘博士、鎌田洋一博士、大阪府公衆衛生研究所 久米田裕子博士、河合高生博士、国立感染症研究所 病原体ゲノム研究センター 関塚 剛には深く感謝する。

文献

- 1) 曽根啓一: 従来の疫学的手法で解明できない事例のための新たな調査手法の検討 平成21年度 地域保健総合推進事業報告書 2010
- 2) 横山 博: 魚類に寄生する粘液胞子虫の生活環と起源。Jpn. J. Protozoa 37: 1-9, 2004
- 3) Wolf K, Markiw ME: Biology contravenes taxonomy in the Myxozoa: new discoveries show alternation of invertebrate and vertebrate hosts. Science 225: 1449-1452, 1984.
- 4) Markiw ME: Portals of entry for salmonid whirling disease in rainbow trout. Dis Aquat Org 6: 7-10, 1989.
- 5) El-Matbouli M, Hoffmann RW, Mandok C: Light and electron microscopic observations on the route of the triactinomyxon - sporoplasm of *Myxobolus cerebralis* from epidermis into rainbow trout cartilage. J Fish Biol 46: 919-935, 1995.
- 6) Yokoyama H, Urawa S: Fluorescent labeling of actinospores for determining the portals of entry into fish. Dis Aquat Org 30: 165-169, 1997.
- 7) Matsukane Y, Sato H, Tanaka S, et al: *Kudoa septempunctata* n. sp. (Myxosporea: Multivalvulida) from an aquacultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) imported from Korea. Parasitol Res 107:865-872, 2010.
- 8) Kawai T, Sekizuka T, Yahata Y, et al: Identification of *Kudoa septempunctata* as the causative agent of novel food poisoning outbreaks in Japan by consumption of *Paralichthys olivaceus* in raw. Clin Infect Dis (in press).

*Outbreaks of an unidentified food-borne disease associated with consumption of raw fish have increased in Japan since 2003. We conducted an epidemiological analysis of outbreaks. The analysis could implicate that an olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) as the potential food source for the outbreaks. Furthermore direct sequencing of a mixture of purified DNA and double-stranded cDNA from total RNA extracted was performed using the Illumina Genome Analyser II. Using a comprehensive analysis pipeline constructed for identifying the potential pathogen, we could reveal the presence of the *Kudoa septempunctata* in the *P. olivaceus* sample suspected as the causative food source. In this review we describe the strategy of the comparative metagenome analysis.*

〈シンポジウムⅠ〉ゲノムから見た感染症

真菌症のゲノム診断

槇村浩一

【要旨】 真菌は、その著しい多様性のために、巨視的なキノコから微視的なカビ・コウボに至る広範な生物群であり、現在認識されている種数が10万種程度、推定種数は150万種に及ぶものと考えられている。そのなかでヒトに病原性を示す菌種数は100から400と言われている。そこで本稿では、主にDNA塩基配列の解析によって得られた分子系統学的見地から、病原真菌を中心として生物における真菌とは何か考えるとともに、これら多様な真菌による感染症(真菌症)に対するゲノム診断の現状を纏めた。

1 はじめに

真菌の多様性は著しく、形態のみ着眼しても食卓を賑わす巨視的なキノコから微視的なカビ・コウボに至る広範な生物群である。現在記載されている真菌の種数は10万程度¹⁾、推定種数は150万に及ぶ²⁾ものと考えられている。真菌(Fungi; 分類群としては真菌界または菌界)の特徴を表1にまとめた¹⁾。

これら多様な真菌による感染を病原的に診断するためには、まずは分子系統に基づいた真菌界とその中における病原真菌の理解が起因菌同定に不可欠となる。

2 生物における真菌とその特徴

生物の分類体系には未だに流動的な部分が残されているが、近年の分子系統解析の結果に基づき、生物の系統における真菌(菌界)と動物、並びに他の生物との関係を図1にまとめた。起源生物Protobiontからはじまり、古細菌Archaea型の細胞から派生した真核生物Eukaryoteから、真菌と動物は、共にオピストコンタとして同じ分類群に帰属することが示されている。オピストコンタOpisthokonta(opistho 後方 + kontos 鞭毛)とは、鞭毛の反対側に向かって遊泳する細胞をもつ生物群である。具体的にはヒトをはじめとする動物の精子を想起されたい。多くの真菌は鞭毛を持たないが、ツボカビは

鞭毛を有する。

この事実が、後述する真菌症対策を難渋させている本質的な問題である。すなわち、系統的にかけ離れた細菌とは異なり、真菌と我々とは細胞を分かち合った縁戚であるため、共有する遺伝的・表現形的形質はおのずから少なくない。従って、本症診断のために必要となる真菌特異的なマーカー候補は限られており、治療薬開発上不可欠となる選択的な標的の発見は困難である。正に真菌は、葉緑体のない植物でもなければ、抗菌薬が効かない細菌でもなく、我々と起源を分け合う分類群であることが理解できよう。

3 病原真菌の分類と系統

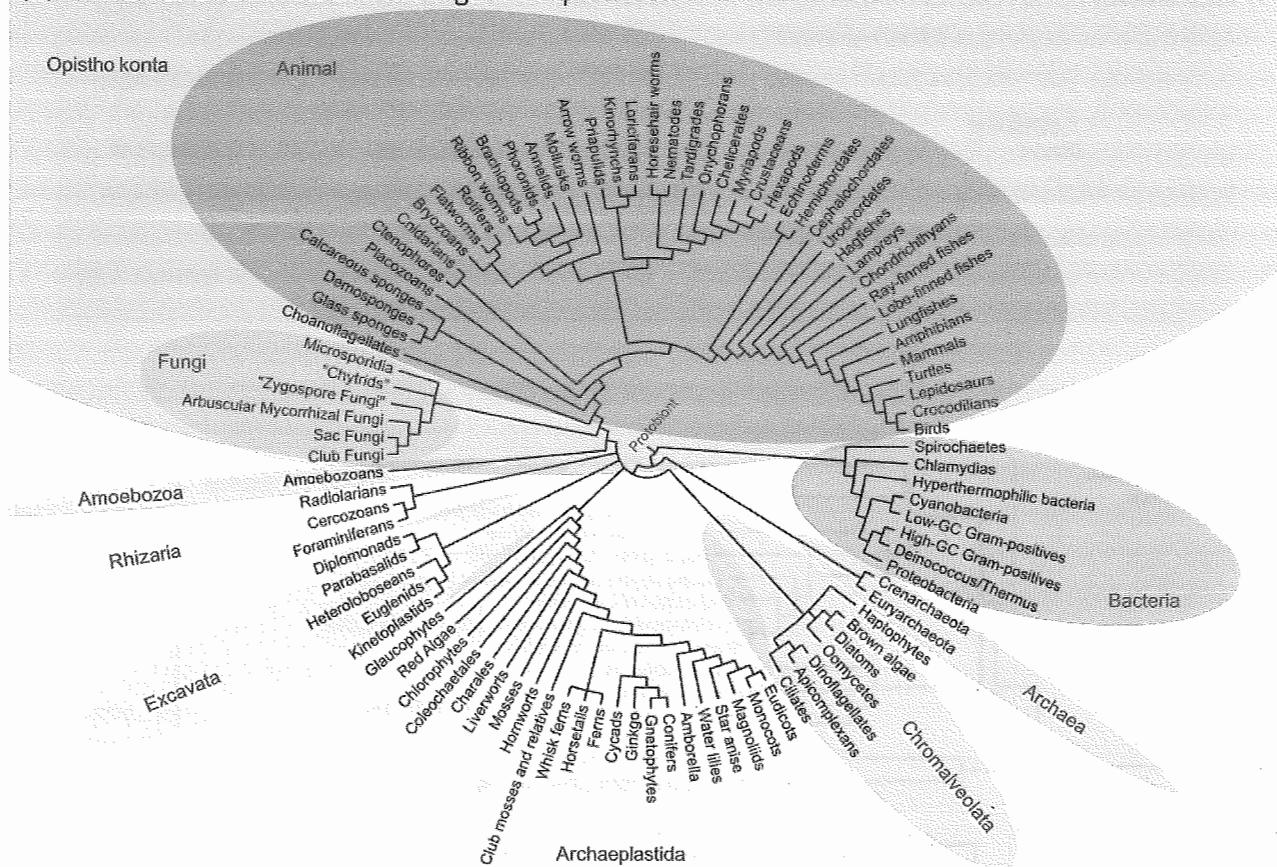
真菌はかつて、主に有性胞子の形成様式に基づいて分類されていた。つまり、配偶子融合に引き続いて子囊内に子囊胞子を形成するのが子囊菌門、担子器上に担子胞子を形成するのが担子菌門であり、配偶子嚢の接合によって生じた接合子から接合胞子を生じるのが接合菌門に帰属するシステムである。このほかにヒトに対する病原菌が知られていないツボカビ門(カエルツボカビで今なお問題となっている³⁾)を加えると4門となっていた。

しかし、近年の分子系統解析(ゲノムDNA塩基配列の比較等によって生物進化の道筋を明らかにしようとする研究)報告によれば、かつて原虫に分類

表1 真菌界の特徴

1. 真核生物である（分子系統上は動物に近い）。
2. 通常、菌糸または酵母として生育し、一部のものは生活環の一時期に巨大な子実体（キノコ）を形成する。
3. グルカン、マンナン、キチンなどを含む堅固な細胞壁を有する。
4. 細胞外酵素、その他の代謝産物を分泌し、栄養物を分解吸収する。
5. 従属栄養型である（葉緑体を持たず、光合成を行わない）。
6. 多くのものは運動性がない（ツボカビ門以外は鞭毛を持たない）。
7. 有性生殖および無性生殖によって胞子／分生子を形成する。
8. 環境中では主に分解者として腐生的に生育しているが、一部のものは寄生的である。
9. 多様性に富み、記載された菌種は10万種に及ぶ（推定種数100万種）

図1 Tree of Life based on rRNA gene sequences



Life: The Science of Biology, 9th ed., by D. Sadava, D. M. Hillis, H. C. Heller, and M. Berenbaum (Sinauer Associates and W. H. Freeman, 2011)より改

されていた微胞子虫（ヒト病原性も知られている）が真菌となり、接合菌門が系統的な帰属が不明として廃止されて亜門に格下げされた他、分類群の名称を含めて大きく変化した⁴⁻⁶⁾（表2）。但し、微胞子虫門を除くヒト病原真菌について考えれば2門1類（接合菌のグループを仮にまとめて「類」と呼ぶ）の枠組が大きく変わることではない。以下にヒト主要

病原真菌の分子系統樹（図2）を示すとともに、各々の分類群について概説した。

1) 子囊菌門

子囊菌門には重要なヒト病原真菌の多くが帰属しており、3亜門に分類される。

① タフリナ亜門（旧 古生子囊菌綱）：他の2亜

表2 真菌界分類表

界	亜界	門	亞門	ヒト病原菌の例	備考	
真菌界 Kingdom of Fungi	二核菌類亜界 Dikarya	微胞子虫門 Microsporidia		<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	動物界に帰属していた	
		ツボカビ門 Chytridiomycota		ない		
		コウマクノウキン門 Blastocladiomycota		ない		旧 ツボカビ門
		ネオカリマスチクス門 Neocallimastigomycota		ない		
		不明	ケカビ亜門 Mucoromycotina	<i>Mucor circinelloides</i> , <i>Rhizopus oryzae</i> , <i>Absidia corymbifera</i>		
	グロムス門 Glomeromycota	ハエカビ亜門 Entomophthoromycotina	<i>Conidiobolus coronatus</i> , <i>Basidiobolus microsporus</i>		旧 接合菌門	
		トリモチカビ亜門 Zoopagomycotina	ない			
		キクセラ亜門 Kickxellomycotina	ない			
	子囊菌門 Ascomycota	タブリナ亜門 Taphrinomycotina	<i>Pneumocystis jirovecii</i>		旧 古生子囊菌綱	
		サッカロミセス亜門 Saccharomycotina	<i>Candida albicans</i>		旧 半子囊菌綱	
担子菌門 Basidiomycota	チャワンタケ亜門 Pezizomycotina	<i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> , <i>Histoplasma capsulatum</i>		旧 真正子囊菌綱		
	ブクニニア亜門 Pucciniomycotina	<i>Rhodotorula rubra</i>		旧 サビキン綱		
	クロボキン亜門 Ustilaginomycotina	<i>Malassezia restricta</i>		旧 クロボキン綱		
		ハラタケ亜門 Agaricomycotina	<i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Trichosporon asahii</i> , <i>Schizophyllum commune</i>		旧 菌蕈(きんじん)綱	

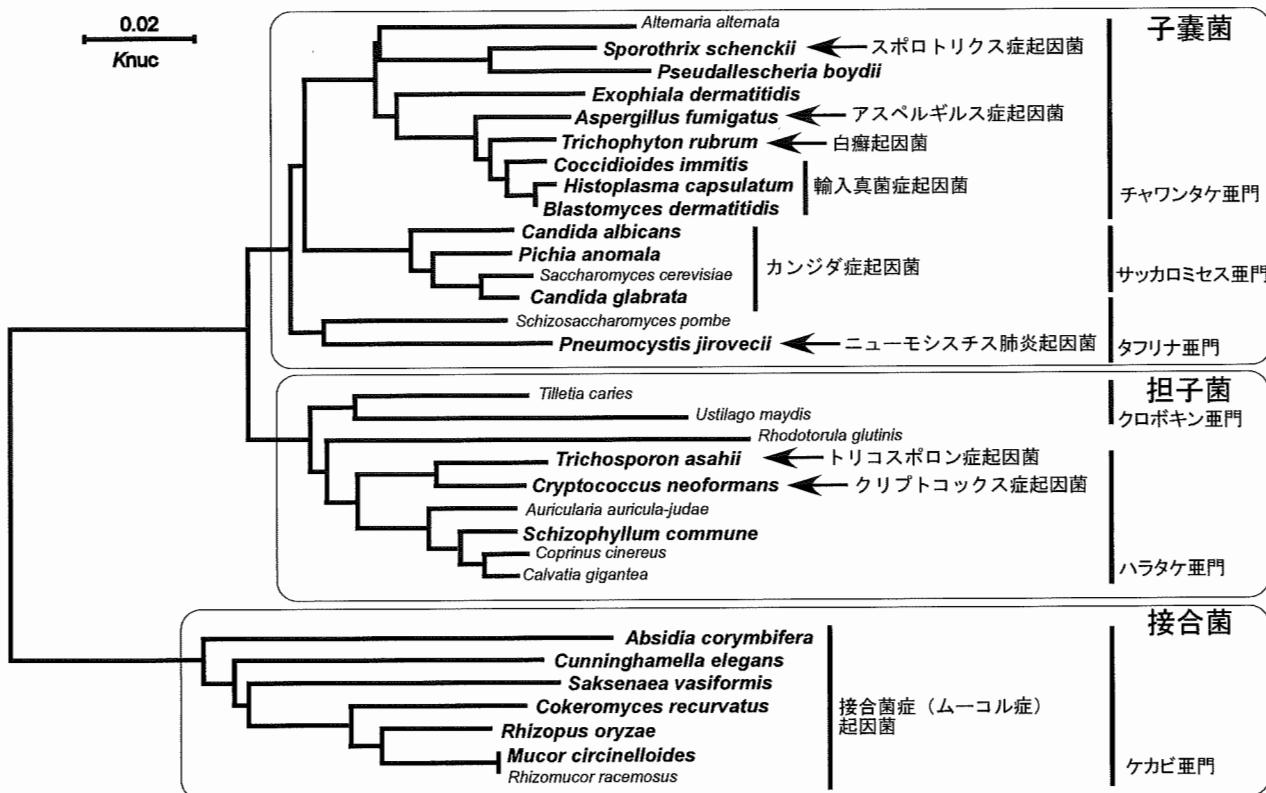


図2 18SrDNA塩基配列に基づいた主要病原真菌の分子樹形

門が出現する以前に子囊菌門の共通の祖先から分岐したものと考えられている。本綱に属する重要なヒト病原真菌としては、*Pneumocystis jirovecii* がある。

- ② サッカロミセス亜門（旧 半子囊菌綱）：主に単細胞で生育する出芽酵母が帰属する。主要病原真菌としては、*Candida albicans* をはじめとした*Candida* 属酵母等が含まれる。
- ③ チャワンタケ亜門（旧 真正子囊菌綱）：病原真菌としても重要な糸状菌（カビ）の大部分を帰属させる分類群である。主要病原真菌としては、同じく *Aspergillus* 属の *A. fumigatus* が日和見真菌症起因菌として最も重要である。皮膚科領域において問題となる *Trichophyton rubrum*、輸入真菌症起因菌となる *Coccidioides immitis* や *Histoplasma capsulatum* も本分類群を構成している。

2) 担子菌門

担子菌門は多くのキノコを含む分類群であるが、重要な病原真菌も一部に含まれている。ここでは以下の3綱を挙げる。

- ① ハラタケ亜門（旧 菌蕈 - きんじん - 綱）：クリプトコックス症起因菌である *Cryptococcus neoformans* や、日和見真菌症の起因菌として重要であり、また夏型過敏性肺臓炎のアレルゲンともなる *Trichosporon asahii* が、本綱に属する出芽酵母が帰属する。
- ② サビキン亜門（旧 サビキン綱）：ヒト病原真菌としては、時に真菌血症の起因菌となる *Rhodotorula* 属酵母がある。
- ③ クロボキン亜門（旧 クロボキン綱）：ヒトにおいては症例数が比較的多い癪風、脂漏性皮膚炎、およびマラセチア嚢胞炎の起因菌となり、経中心静脈栄養管理に関連して時に真菌血症を惹起する *Malassezia* 属の脂質要求性酵母がここに帰属する。

3) 接合菌類

国内における病原真菌としては、接合菌綱 *Mucor*（ムーコル）目に限定される。*Rhizopus oryzae* は日和見真菌症の起因菌として最も高頻度に分離される菌種である。その他に *Cunninghamella* 属や *Mucor* 属等、他の本目各属による感染も知られているが、各種抗真菌薬に対する感受性が不良であること等から何れの菌による感染も致命的である。

4 新しく病原真菌に加わった「微胞子虫」

微胞子虫とは、かつてはミトコンドリアを共生させる以前の形態を保った原始的な「原生生物」と理解されており、生物の8界説においてはアーケアゾアに分類されていた。しかし、分子系統解析によつて真菌界の一員であることが明らかとなった。極端な細胞内寄生菌であり、そのゲノムサイズは *Encephalitozoon cuniculi* で 2.9 Mb⁷⁾ と大腸菌の6割程度に過ぎない。各種の動物を自然宿主とするが、主に免疫不全患者において難治性の下痢症から全身播種感染がしられている。また、健常人においても一過性の下痢症を生じることが知られており、脳膜瘻例も報告されている⁸⁾。診断は直接検鏡によるが、遺伝子診断法も報告されている⁹⁾。現在のところ治療は抗原虫薬によることが多い¹⁰⁾が、今後は診断・治療の両面において「真菌」的アプローチが期待できる。

5 真菌症に対するゲノム診断

一般に特異的な臨床所見を欠く本症の診断は困難であるため、理論的には全ての菌種を各々迅速・高感度・特異的に検出・同定しうる検査法として遺伝子診断法に期待が集められてきた。また、表現形質に乏しい起因菌の同定・型別方法としても、起因菌のゲノム塩基配列解析が、事実上唯一最後の手段と考えられている。検体中から起因菌遺伝子、またはその転写産物が抽出できる以上、理論的には培養を経ることなく起因菌の病原性、抗真菌薬感受性等の情報が得られる可能性もある。しかし、病原真菌において遺伝子診断に耐える程、明らかに起因菌の表現形質を反映する塩基配列は未だの特定されていない。

病理組織にみる形態的特徴から起因菌種を同定する試みとしては、*in situ* ハイブリダイゼーション法が報告されており¹¹⁾、各種病原糸状菌の同定が可能となりつつある。今後検出手順（技術）とプローブの標準化が可能となれば広く利用されることが期待できる。

一般に真菌症の遺伝子診断を論ずる場合、①分離菌株の菌種を同定しようとする遺伝子同定（Molecular identification）と、②菌種内における型別を同定しようとする遺伝子型別（Molecular typing）、および③臨床検体から分離培養を経ることなく、起因菌種遺伝子の有無と菌種同定を直接行

おうとする狭義の遺伝子診断(Molecular diagnosis)が含まれている。

6 真菌症ゲノム診断の実際

主要病原真菌に関する限り、遺伝子同定では分離菌株の抽出遺伝子から、菌種特異的なリボソームRNA遺伝子またはその他の特異的塩基配列をPCRによって增幅後、直接塩基配列決定法による菌種同定が可能である。また、同遺伝子群を標的としたPCRまたはTaqManTM PCRによる狭義の「真菌症遺伝子診断」法が本邦では受託検査として施行されている。これら従来の「真菌遺伝子診断法」は、他の検査法で起因菌の同定・検出が不能な場合に、特に有用性が高く、比較的迅速性にも優れている。

一例として、クリプトコックス症診断用に起因菌となる*Cryptococcus neoformans*および*C. gattii*を各々同時に同定できる系が報告されており、近年問題となっているパンクーパー株のスクリーニングに活用できる^[12,13]。

しかし、多くの施設において遺伝子診断は实际上外部機関への受託によってはじめて可能となる検査となっており、本来迅速性が利点の一つであった遺伝子診断法の臨床応用が大きく妨げられていた。

PCRを基幹とした遺伝子診断法の抱える様々な問題点を解決するべく様々な新規特異的遺伝子増幅系が公表された。その中でもloop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法は、特異的塩基配列の検出が一定温度の反応で迅速(20-60分)に可能であり、遺伝子診断をサーマル・サイクラーから解き放った画期的なシステムであり、真菌症診断にも応用されている^[14]ことから今後の発展が期待できる。

菌株の識別による疫学解析系としては、近年のゲノム塩基配列解析決定技術の普遍化、簡便化に伴って、複数の特定遺伝子における遺伝子塩基配列多形を、塩基配列レベルで特定し、その配列多形を集積することによって菌株識別を行おうとする、multilocus sequence typing (MLST)による遺伝子菌株識別法も実用レベルに至っている^[15]。自動塩基配列決定装置が普遍化した今日において、本法の院内真菌感染対策上の有用性は計り知れない。現段階で、本法の適用範囲は、限られているが、病原真菌ゲノムプロジェクトの進行によって新たな菌種への適応が期待できる。

多くの研究者の参入と、有用な情報の交換、および協力関係による斯界の研究開発とその発展を期待

したい。

6 おわりに

広く生物界から真菌界を概観し、その成果に基づいた真菌症ゲノム診断を概説した。真菌による健康障害は、有史以来の白癬に始まり、概ね1980年代後半以降は医療医学の高度化・複雑化に伴って深在性真菌症対策が最重要課題となった。今後は、様々な常在真菌叢や環境真菌の暴露、あるいは定着に伴う様々な健康障害も問題となろう。

これら真菌関連の様々な健康障害を解析するためにも生物としての真菌自体の分類・生態を含めた広い範囲の知的基盤の整備が必須となる。多くの方々の医真菌研究への参加を期待したい。

文献

- 1) Kirk PM, et al. eds. (2008). Dictionary of the Fungi 10th Ed., CAB International, Wallingford.
- 2) Watson R T et al. (eds.) (1995) Global biodiversity assessment-summary for policy-makers. Cambridge University Press
- 3) Pounds JA, Bustamante MR, Coloma LA, Consuegra JA, Fogden MP, Foster PN, La Marca E, Masters KL, Merino-Viteri A, Puschendorf R, Ron SR, Sanchez-Azofeifa GA, Still CJ, Young BE. (2006) Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. Nature. 439:161-167.
- 4) Makimura K, Tamura Y, Mochizuki T, Hasegawa A, Tajiri Y, Hanazawa R, Uchida K, Saito H, Yamaguchi H (1999) Phylogenetic classification and species identification of dermatophyte strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. J Clin Microbiol 37: 920-924.
- 5) Hibbett DS, et al. A higher level classification of the Fungi. Mycological Research 111: 509-547, 2007.
- 6) 馬渡峻輔他、生物分類表 IN石川統 他編 生物学辞典 (2010) 東京化学同人、東京

- 7) Michae " I D. Katinka (2001) Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. NATURE 414 : 450-453.
- 8) Oleg Ditrich et al. (2011) *Encephalitozoon cuniculi* Genotype I as a Causative Agent of Brain Abscess in an Immunocompetent Patient. . J. Clin. Microbiol. 49(7):2769.
- 9) Spencer D. Polley et al. (2011) Detection and species identification of microsporidial infections using SYBR Green real-time PCR. Journal of Medical Microbiology 60: 459-466
- 10) Jo Seddon & Sanjay Bhagani (2011) Antimicrobial therapy for the treatment of opportunistic infections in HIV/AIDS patients: a critical appraisal. HIV/AIDS - Research and Palliative Care 3: 19_33.
- 11) Shinozaki M, Okubo Y, Sasai D, Nakayama H, Murayama SY, Ide T, Wakayama M, Hiruta N, Shibuya K. (2011) Identification of Fusarium species in formalin-fixed and paraffin-embedded sections by in situ hybridization using peptide nucleic acid probes. J Clin Microbiol. 49(3):808-813.
- 12) Satoh K, Maeda M, Umeda Y, Miyajima Y, Makimura K: Detection and identification of probable endemic fungal pathogen, *Cryptococcus gattii*, and worldwide pathogen, *Cryptococcus neoformans*, by real-time PCR. Microbiol Immunol, Jun; 55(6): 379-457, 2011.
- 13) 佐藤一朗、槙村浩一：クリプトコックス症起因菌の検出方法と検出キット、特願2011-046592
- 14) Uemura N, Makimura K, Onozaki M, Otsuka Y, Shibuya Y, Yazaki H, Kikuchi Y, Abe S, Kudoh S: Development of loop-mediated isothermal amplification method for diagnosing Pneumocystis pneumonia. Journal of Medical Microbiologyy 57(1):50-7, 2008.
- 15) PubMLST <http://pubmlst.org/> 2012 年
4月8日接続

Genome based diagnosis for fungal infections

Koichi MAKIMURA

【Summary】 The current status of molecular biological methods to control mycoses was described. New tools for detecting of specific fungal DNA by reaction at a constant temperature with Loop-mediated isothermal amplification of DNA (©LAMP, Eiken Chemical Co., Ltd.), and for strain typing by multilocus sequence typing (MLST) will greatly aid in managing complex fungal infection.

〈シンポジウムⅠ〉ゲノムから見た感染症

脳膿瘍のゲノム診断

斎藤奈穂子¹、林 哲也²、辻 省次¹

【要旨】 脳膿瘍は、脳実質内の巣状の化膿性病変であり、臨床症状や血液・髄液検査所見は早期には非特異的なことが多く、血液培養も陰性であることが多い。治療は抗菌薬による化学療法を基盤とし、起炎菌の薬剤感受性に対する適切な抗菌薬の選択が求められる。しかし、実際の臨床では、起炎菌が同定できず適切な抗菌薬の選択が困難な場合がある。抗菌薬開始後の脳膿瘍の検体において培養は陰性であったが16S rRNA遺伝子解析により起炎菌の同定が可能であった自験例について報告するとともに、脳膿瘍におけるゲノム医学の発展の臨床応用に関して解説する。

Key words: 脳膿瘍 -Streptococcus intermedius-Streptococcus anginosus group-16S rRNA

はじめに

脳膿瘍は、脳実質内の巣状の化膿性病変であり、発症頻度は年間10万人に1人と言われている。治療には起炎菌の同定、適切な抗菌薬の使用が望ましい。しかし実際には、脳膿瘍が疑われた時点でエンピリカルな抗菌薬治療が開始され、膿瘍穿刺のタイミングが抗菌薬開始後となることが多い。この場合、培養による起炎菌同定が困難となり抗菌薬の選択に苦慮する場合がある。16S rRNA遺伝子解析は、細菌類に共通した普遍領域に対しPCR增幅用プライマーを設定して細菌特異的16S rRNA遺伝子増幅を行い、菌種により配列の異なる可変領域の塩基配列を決定することで菌種の同定が可能になる。この手法を用いて細菌の特異的16S rRNA遺伝子を増幅、解析することにより診断に至り、適切な治療を行える可能性が高くなる。

脳膿瘍について

感染経路は、耳鼻科・顎歯科領域の感染巣や外傷・脳外科領域術後の直達性と他臓器感染巣からの血行性伝播がある。直達感染の場合、膿瘍は単発となることが多い一方で、血行性伝播では多発性に膿瘍形成しやすい。その原因としては肺化膿症、皮

膚感染症、骨盤内感染症、腹腔内感染症、感染性心内膜炎、先天性心疾患、肺動静脈瘻などがある。また、20-30%は原因不明である¹⁾。病因は、細菌のほか免疫不全状態である場合、トキソプラズマ、リストリア、ノカルジア、真菌(アスペルギルス、クリプトコックス、カンジダ)、結核などによる日和見感染症も念頭におく必要がある²⁾。また、海外渡航歴がある場合、寄生虫感染症も考えられる。有鉤囊虫はブタの生食により感染し、メキシコでの脳膿瘍の85%の原因微生物である。他に赤痢アーベ、日本住血吸虫症、肺吸虫症なども報告されている。

脳膿瘍の原因となる細菌の頻度について Carpenterらは2000年から2004年に英国の Atkinson Morley Hospitalで脳膿瘍と診断された49例について起炎菌を含めた検討をしており、 Streptococcus milleri groupが最多であった³⁾。

臨床症状は、頭痛、発熱、髄膜刺激徵候、嘔吐、意識障害、痙攣やなど早期には特に非特異的であり、そのためにしばしば診断が遅れることがある。膿瘍の局在により失語、麻痺といった巣症状も呈する。臨床症状や身体所見と同様に、血液検査でも特異的な所見に乏しい。血液検査ではWBC、CRP、ESRの上昇など炎症反応を認める例が多く、髄液検査では圧上昇、軽度細胞数・蛋白增加を呈することがある。

1: 東京大学医学部附属病院 神経内科 (〒113-8655 東京都文京区本郷7-3-1)

2: 宮崎大学フロンティア科学実験総合センター・生命科学研究部門・生命環境科学分野

脳膿瘍の診断は膿瘍内容物の培養により起炎菌の同定が可能となる。検体はグラム染色、好気・嫌気的培養、結核菌、真菌培養が行われる。血液培養や髄液培養は陰性であることが多いが、起炎菌や薬剤感受性が判明することもある。また、他臓器にも感染巣がある場合、その内容物の培養も必要である。

画像上は頭部CT・MRIでリング状の造影効果を有する結節影を認める。このような画像所見を呈する疾患として脳腫瘍もあるが、頭部MRIで膿瘍は拡散強調像で高信号、拡散係数画像で低信号を呈し、腫瘍は拡散強調像で低信号、拡散係数画像で高信号を呈することで鑑別可能である⁴⁾。

治療は抗菌薬による化学療法を基盤とする。感染経路や起炎菌を想定しエンピリカルに治療を開始し、培養による薬剤感受性を確認のうえ適切な抗菌薬に変更する。治療期間は6-8週間だが、臨床症状や画像経過で改善を認めるまでは抗菌薬投与を継続する。また、適応に従って穿刺吸引や開頭ドレナージといった脳外科的治療を併用する。脳浮腫や痙攣に対しての対症療法が必要となることもある。

理想的な経過としては、症状、検査所見から脳膿瘍が疑われたら、抗菌薬投与前に血液培養、髄液培養とともに膿瘍穿刺液の採取を行い、エンピリカルな治療を開始する。検体からのグラム染色の結果や、培養の結果、薬剤感受性の判明によりde-escalationが可能となる。しかし実際には、脳膿瘍が疑われた時点でエンピリカルな抗菌薬治療が開始され、膿瘍穿刺のタイミングが抗菌薬開始後となることが多い。この場合、培養による起炎菌同定が困難となり、エンピリカルな治療を継続せざるを得ない。

感染症のゲノム診断

膿瘍穿刺が抗菌薬開始後でも、検体のゲノム診断を行うことにより、培養では陰性でも起炎菌同定が可能になることがある。感染症のゲノム診断の目的は臨床材料から直接、病原体に関わる遺伝子領域、病原因子に関わる遺伝子を検出することだが、以下のような方法が挙げられる。ブロード・レンジPCR法では細菌/真菌に共通な16S rRNA/18S rRNA領域の増幅を行い、1組のプライマーで多種類の細菌や真菌を検出することができる。マルチプレックスPCR法は1回の反応チューブに2組以上のプライマーを組むことで複数の病原体検出可能であり、菌種の同定と耐性遺伝子の同時検出も可能である。リアルタイムPCR法はPCR増幅産物をリアル

タイムに検出して遺伝子の定量が可能であり、潜伏感染するウイルスの病態把握に用いられる。メタゲノム解析は、臨床検体中の核酸を次世代シーケンサーを用いて網羅的に解読し、病原体由来核酸配列を相同性検索により同定する。

16S rRNA遺伝子には、細菌類に共通した普遍領域(C1-9)と菌種により配列の異なる可変領域(V1-9)が存在するため、普遍領域に対しPCR増幅用プライマーを設定することにより細菌特異的核酸の増幅が可能となる。得られた特異的16S rRNA遺伝子増幅産物の塩基配列を決定し、解析することにより菌種が同定される⁵⁾(図1)。

症例

脳膿瘍においてゲノム診断が有用であった自験例を提示する。

症 例：70歳女性。

主 訴：頭痛、右上肢筋力低下。

既往歴：特記事項なし。

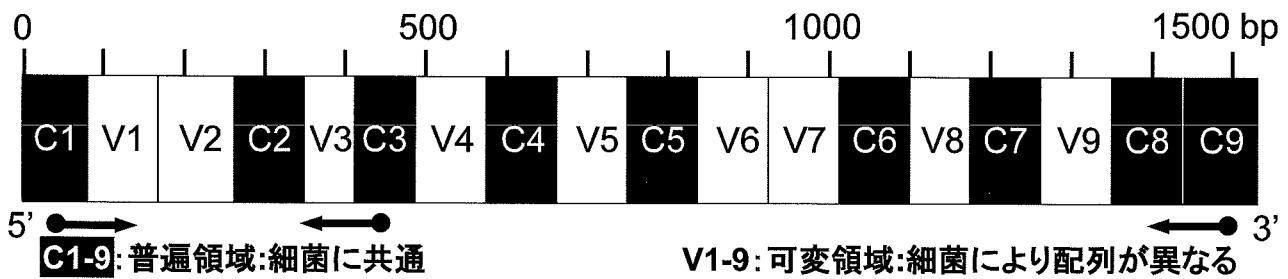
生活歴：喫煙歴なし、機会飲酒、入院約1か月前に韓国旅行。

現病歴：生来健康で■年2月頭部MRIを含めた人間ドックでは異常を指摘されなかった。受診数週間前の11月下旬から時折頭痛を自覚するようになり、12月某日、前頭部の疼痛を自覚し翌日朝、右上肢の上がりにくさを自覚し同日当院脳神経外科を受診した。診察上#運動性優位の失語、#右上肢筋力低下(MMT2/5レベル)を認め、頭部CTにて多発する低吸収域を認め当科コンサルトとなった。頭部造影CTではリング状増強効果を呈する腫瘍が多発し、頭部MRIで、CTでの病変部位に一致し拡散強調像で高信号、ADC mapで低信号を認め、多発脳膿瘍が疑われ、精査加療目的に当科転科となった(図2)。

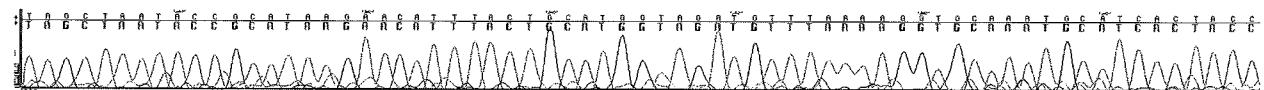
入院時現症：体温37.6℃と発熱を認めた。血圧114/62 mmHg、脈拍88/分・整、頭頸胸腹部異常所見を認めなかつた。神経学的所見は、運動性優位の失語、右上肢の不全麻痺を認めた。

入院時検査所見：白血球19000 /µL、CRP 10.48 mg/dLと上昇、血沈86 mmと亢進しており炎症所見を認めた。髄液は細胞数49個(単球40%、好中球60%)で好中球優位に増加しており、蛋白59 mg/dLと上昇を認めた。髄液の培養、塗抹ともに陰性であった。感染症検査は、真菌抗原、赤痢アメーバ、トキソプラズマ、寄生虫抗体はすべて陰性であった。入院第3、4病日で計5回施行

①普遍領域に設定したプライマーでPCR



②PCR産物の直接塩基配列決定



③配列の解析

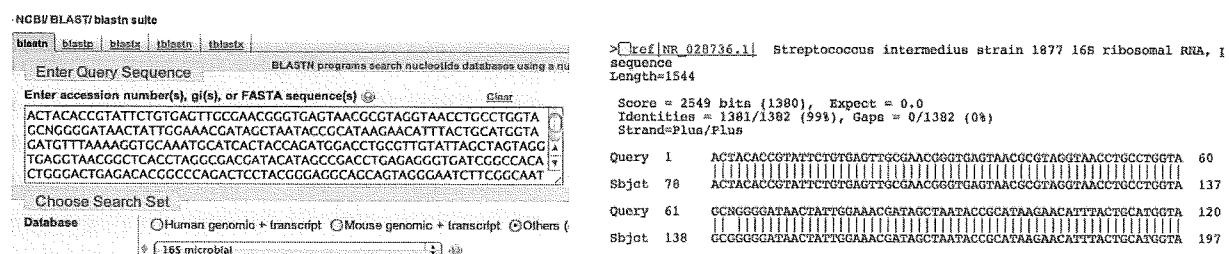


図1 16S rRNA遺伝子解析

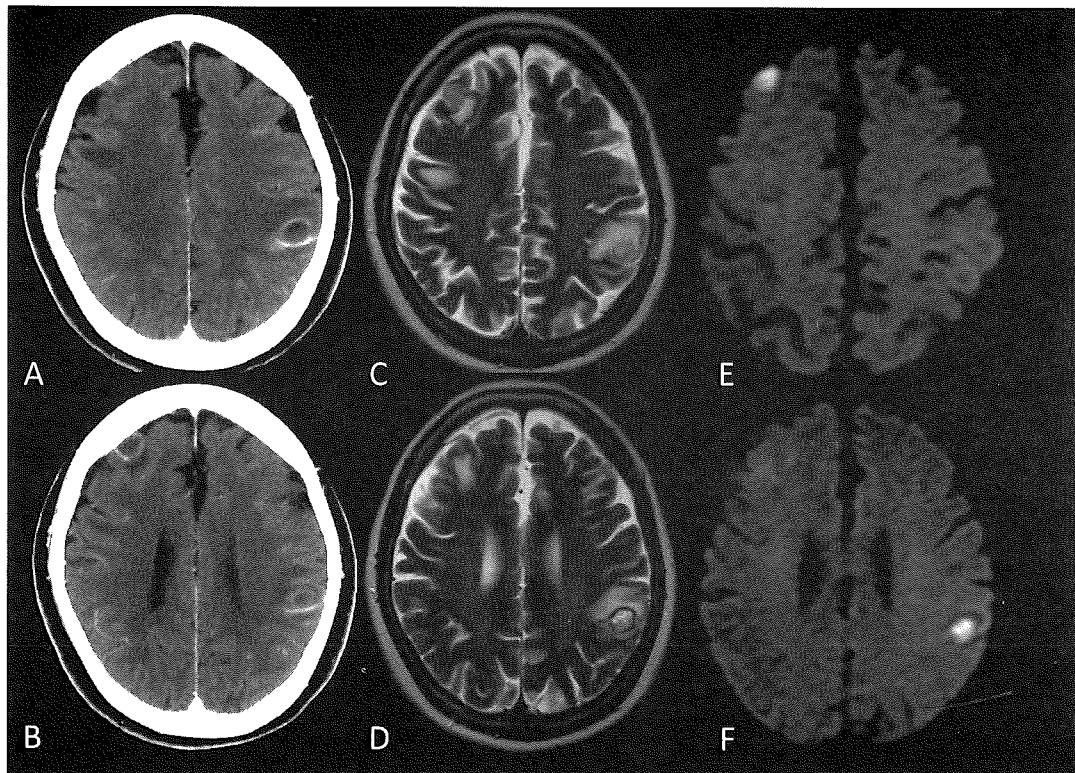


図2 入院時画像所見

A, B: 造影CTにて右中前頭回 左縁状回にリング状造影効果を認める。

C, D: MRI T2強調像で辺縁に低信号の被膜状構造を有する不均一な高信号の結節を認める。

E, F: MRI 拡散強調像にて腫瘍の部位に一致した高信号域を認める。

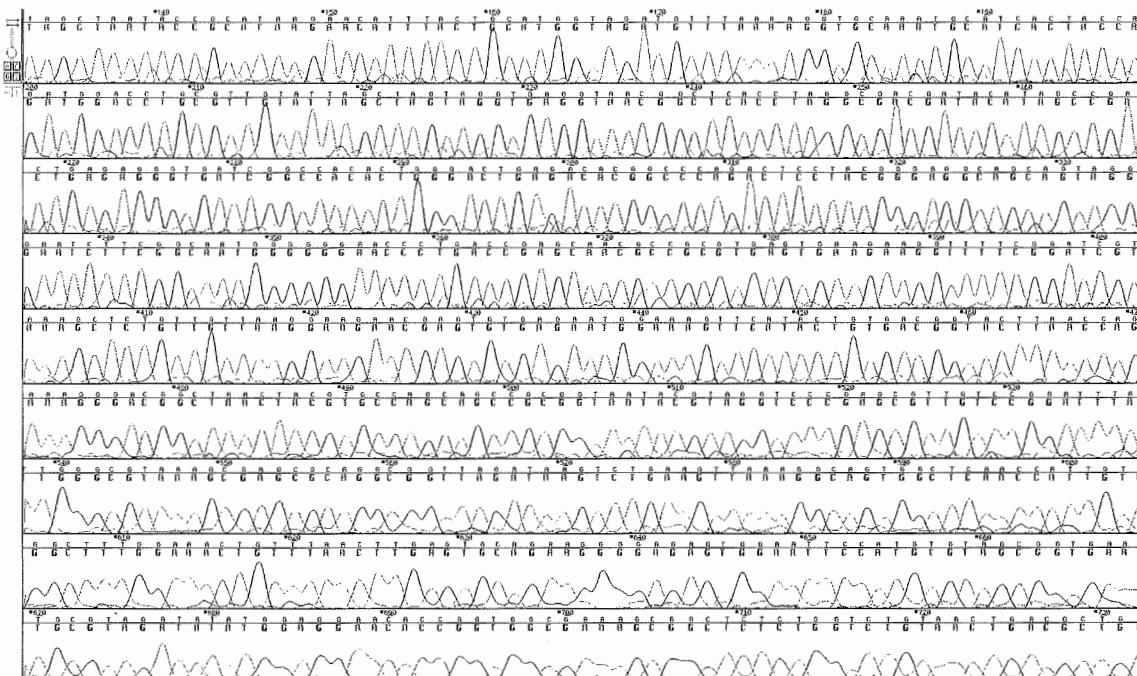
した血液培養検査は全て陰性であった。

入院後経過：右上肢筋力低下、失語は入院翌日より改善した。入院第3病日に血液培養、髄液採取のうえ meropenem(MEPM) 6 g/日、vancomycin(VCM) 2 g/日投与を開始した。しかし、肝機能障害のためMEPMは4 g/日に減量、VCMは薬疹のため投与中止となった。入院2週間後頃より失行、見当識障害が出現し、画像上も結節影の増加、周囲の浮腫の増悪を認めた。検体採取の目的で4週間後に左頭頂葉病変より膿瘍ドレナージ術を施行し、検体の培養、16S rRNA遺伝子解析を行った。外科的に採取した検体からDNAを抽出し、PCRにて27F、1429R universal primers⁶⁾を使用し16S rRNAの增幅を行った。精製後、遺伝子解析装置により16S rRNAの塩基配列を読み取り、BLAST (basic local alignment search tool)⁷⁾のデータベースを用いて相同性を検索したところ、約1.4 kb の長さの単一DNAバンドを認め、*S. intermedius* 株 F0413 (accession no. HM596275) と100%一致する配列が得られた(図3)。当初は培養が陰性であったが、16S rRNA遺伝子解析により起炎菌が*S. intermedius*と判明し、抗菌薬をceftriaxone(CTRX) 4 g/日に変更した。細菌の増殖しやすいthioglycollate培地での培養を行ったところ、同菌が陽性とな

り、薬剤感受性も判明した。入院第7週頃より好酸球增多を認めたため、薬剤感受性を確認のうえ ampicillin(ABPC) 8 g/日に抗菌薬を変更したところ好酸球增多は改善した。10週間後に levofloxacin (LVFX) 500mg / 日内服に変更し、4週間継続し後遺症を残さず退院となった(図4)。

*Streptococcus intermedius*による脳膿瘍

S.intermedius は、*S. anginosus*、*S. cosellatus*と共に *Streptococcus milleri* group を構成する口腔内常在菌であり、膿瘍を形成しやすいことで知られ、特に脳、肝臓で膿瘍が好発する。今回、自験例を含み、過去の報告における *S. intermedius* による脳膿瘍の18例について臨床的特徴を検討した。18例のうち、平均年齢は 34.9 ± 13.8 SD 歳 (6~70歳)、15歳以下の小児が3例、男性12例 (67 %)、女性6例 (33 %) であった。全18例において脳膿瘍からの検体採取が行われ、培養による起炎菌同定可能であったのは10例 (56 %) であった。また2008年以降の6例で 16S rRNA 遺伝子解析が施行されており、いずれも脳膿瘍の培養開始前に抗菌薬が開始され、脳膿瘍からの培養では同定には至っておらず、16S rRNA 遺伝子解析にて起炎菌同定が可能となつた(表1)。



HM596275 (*Streptococcus intermedius* strain F0413) と 100%一致する配列

図3 PCR product の直接塩基配列解析結果

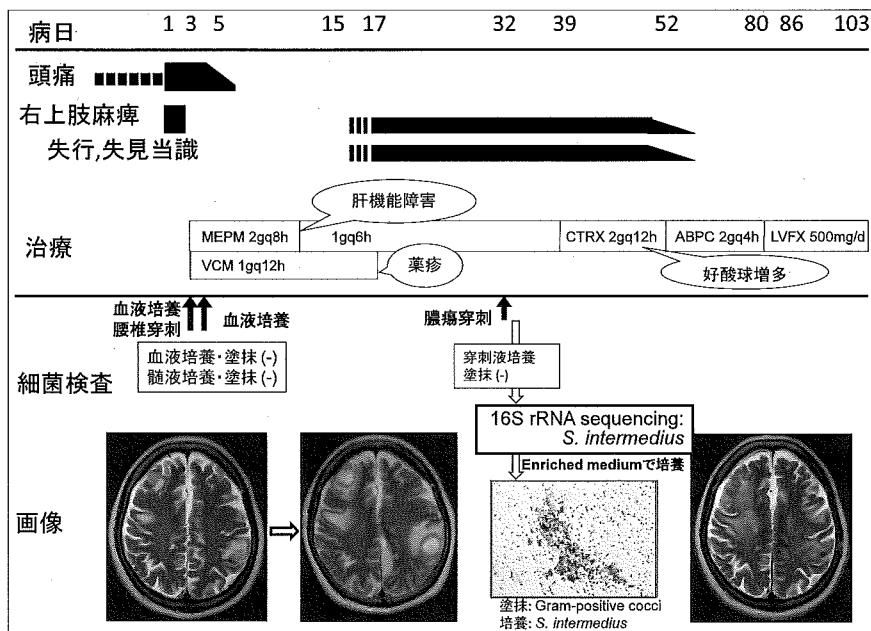


図4 経過

表1

Patient no.	Age, gender	Underlying condition	Location	Blood culture	Brain abcess culture	16S rRNA sequencing	Antibiotics before culture	Autor	Year
1	70 F	none	multifocal	negative	negative	<i>S. intermedius</i>	+	This case	2010
2	61 M	none	multifocal	negative	negative	<i>S. intermedius</i>	+	Erne BV et al. ⁸	2010
3	16 F	chronic sinusitis	lt. frontal lobe	-	<i>S. viridans group</i>	<i>S. intermedius</i>	+	Tran MP et al. ⁹	2008
4	6 M	Ebstein anomaly	multifocal	negative	gram-positive cocci	<i>S. intermedius</i>	+	Petti CA et al. ¹⁰	2008
5	21 M	chronic sinusitis	multifocal	histoplasma titer	gram-positive cocci	<i>S. intermedius</i>	+	Petti CA et al. ¹⁰	2008
6	16 M	none	multifocal	negative	gram-positive cocci	<i>S. intermedius</i> <i>S. constellatus</i>	+	Petti CA et al. ¹⁰	2008
7	63 F	PFO	cerebellum	-	<i>S. intermedius</i>	-	?	LaBarbera M et al. ¹¹	2006
8	43 F	PFO	cerebellum	-	<i>S. intermedius</i>	-	-	LaBarbera M et al. ¹¹	2006
9	39 M	oral infection	multifocal	<i>S. intermedius</i>	-	-	+	Wagner KW et al. ¹²	2006
10	14 F	sinusitis	lt. frontal lobe	-	<i>S. intermedius</i> <i>S. intermedius</i>	-	+	Feison NJ. ¹³	2006
11	25 F	cyanotic congenital heart disease	lt.parietal lobe	-	<i>Actinomyces spp.</i> <i>Capnocytophaga spp.</i>	-	-	Engelhardt K et al. ¹⁴	2002
12	55 M	alcoholic cirrhosis chronic	multifocal	(lung biopsy <i>S. intermedius</i>)	gram-positive cocci	-	+	Khatib R et al. ¹⁵	2000
13	20 M	granulomatous disease	lt.parietal lobe	-	<i>S. intermedius</i>	-	+	Nagatomo T et al. ¹⁶	1999
14	13 M	chronic sinusitis	rt.frontal lobe	negative	<i>S. intermedius</i>	-	-	Yamamoto M et al. ¹⁷	1999
15	52 M	none	rt.frontal lobe	negative	<i>S. intermedius</i>	-	-	Yamamoto M et al. ¹⁷	1999
16	69 M	arteriosclerotic disease	lt.occipital lobe	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	-	+	Melo JC et al. ¹⁸	1978
17	27 M	none	lt.occipital lobe	negative	<i>S. intermedius</i>	-	-	Melo JC et al. ¹⁸	1978
18	18 M	none	multifocal	negative	<i>S. intermedius</i>	-	+	Melo JC et al. ¹⁸	1978

結語

16S rRNA遺伝子解析では、細菌に共通な16S rRNA領域の増幅を行い、配列の解析により細菌の同定が可能となる。脳膿瘍の診断において、培養で起炎菌の同定が困難な場合でも16S rRNA遺伝子解析を行うことにより診断の確定に有用であると考えられた。また、16S rRNA遺伝子解析で菌種が同定されると、抗菌薬の選択に反映でき、臨床に際し有効な手段と考えられる。今後、脳膿瘍の診断において、16S rRNA遺伝子解析は、研究レベルを超えて、臨床の場で実用されることが望ましい。

References

- 1) Mathisen GE, Johnson JP :Brain abscess. Clin Infect Dis 25(4):763-779, 1997.
- 2) Guppy, KH, Thomas C, Thomas K et al: Cerebral fungal infections in the immunocompromised host: a literature review and a new pathogen—*Chaetomium atrobrunneum*: case report. Neurosurgery 1998; 43:1463.
- 3) Carpenter J, Stapleton S Holliman R: Retrospective analysis of 49 cases of intracerebral abscess and review of the literature. Eur J ClinMicrobiol Infect Dis 26:1-11, 2007.
- 4) Reiche W, Schuchardt V, Hagen T et al: Differential diagnosis of intracranial ring enhancing cystic mass lesions--role of diffusion-weighted imaging (DWI) and diffusion-tensor imaging (DTI). Clin Neurol Neurosurg. 112(3):218-25, 2010.
- 5) Petrosino JF, Highlander S, Luna RA, et al: Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. ClinChem 55(5):856-866, 2009.
- 6) Yano T, Moe KK, Yamazaki K, et al: Identification of candidate pathogens of papillomatous digital dermatitis in dairy cattle from quantitative 16S rRNA clonal analysis. Vet Microbiol 143:352-362, 2010.
- 7) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>
- 8) Erne BV, Exner C, Frauenfelder T, et al: A curious case of convulsion. Lancet. 375(9730):2050, 2010.
- 9) Tran MP, Caldwell-Mcmillan M, Khalife W, et al: *Streptococcus intermedius* causing infective endocarditis and abscesses: a report of three cases and review of the literature. BMC Infect Dis. 8:154. 2009.
- 10) Petti CA, Simmon KE, Bender J, et al: Culture-Negative intracerebral abscesses in children and adolescents from *Streptococcus anginosus* group infection: a case series. Clin Infect Dis. 46(10):1578-80, 2008.
- 11) LaBarbera M, Berkowitz MJ, Shah A, et al: Percutaneous PFO closure for the prevention of recurrent brain abscess. Catheter Cardiovasc Interv. 68(6):957-60, 2006.
- 12) Wagner KW, Schon R, Schumacher M, et al: Case report: brain and liver abscesses caused by oral infection with *Streptococcus intermedius*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 102(4): e21-e23, 2006.
- 13) Feison NJ: Case of the month. Brain abscess. JAAPA. 19(5):82, 2006.
- 14) Engelhardt K, Kampfl A, Spiegel M, et al: Brain abscess due to *Capnocytophaga* species, *Actinomyces* species, and *Streptococcus intermedius* in a patient with cyanotic congenital heart disease. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 21(3):236-7, 2002.
- 15) Khatib R, Ranmanathan J, Baran J Jr: *Streptococcus intermedius*: A cause of lobar pneumonia with meningitis and brain abscesses. Clin Infect Dis. 30(2):396-7, 2000.
- 16) Nagatomo T, Ohga S, Saito M et al: *Streptococcus intermedius*-brain abscess in chronic granulomatous disease. Eur J Pediatr. 158(10):872-3, 1999.
- 17) Yamamoto M, Fukushima T, Ohshiro S, et al: Brain abscess caused by *Streptococcus intermedius*: two case reports. Surg Neurol. 51(2):219-22, 1999.
- 18) Melo JC, Raff MJ: Brain abscess due to *Streptococcus MG-intermedius* (*Streptococcus milleri*). J Clin Microbiol. 7(6):529-32, 1978.

Genomic diagnosis of brain abscess

[Abstract] Brain abscess is a focal, intracerebral infection that begins as a localized area of cerebritis and develops into a collection of pus surrounded by a well-vascularized capsule. Clinical symptoms or blood and cerebrospinal fluid findings in early stage are often nonspecific and blood cultures are often negative. Careful culturing of abscess material provides the best opportunity to make a microbiological diagnosis. However, in a previously published series, 20-28% of all intracerebral abscesses reported have been shown to produce negative culture results, presumably owing to concurrent antibacterial therapy. We report the case of a 70-year-old woman with brain abscess caused by *Streptococcus intermedius* and review the literature describing cases of brain abscess caused by *S. intermedius*. In the present case, the pathogen was identified by the nucleotide sequence analysis of the 16S ribosomal RNA (rRNA) gene from a specimen obtained by the surgical aspiration of the abscess, the culture of which initially tested negative. The 16S rRNA gene in bacteria consists of conserved sequences interspersed with variable sequences that include 9 hypervariable regions. These hypervariable regions range from approximately 50 to 100 bases in length and are useful for universal microbial identification. Here, after the pathogen was identified, *S. intermedius* was cultured using a medium enriched with dehydrated thioglycollate, which enabled us to determine the sensitivities of the pathogen to various antibiotics. *S. intermedius* is a member of the *Streptococcus anginosus* group (SAG), together with *S. anginosus* and *S. constellatus*, which are the most common pathogens associated with bacterial intracerebral abscess. We reviewed the literature on the clinical characteristics of the patients with brain abscess caused by *S. intermedius*. Eighteen patients were included in this study, including 12 (67%) males and 6 (33%) females (ratio 2.0:1), of whom 3 children were <15 years of age. The mean age of the patients was 34.9 ± 13.8 SD (range, 6-70 years). In 6 patients (including the present case), direct nucleotide sequence analysis of 16S rRNA was performed, which detected *S. intermedius* in all of them. These cases had been started antibiotics before specimen collection and causative bacteria were not identified from brain abscess culture. We emphasize the efficacy and usefulness of the 16S rRNA gene analysis of clinical specimens from patients with negative culture results, for whom bacterial infection is suggested by clinical observations.

〈シンポジウムⅡ〉ワクチン接種後脳症について

日本のワクチン政策の問題点

中山哲夫

【要旨】 感染症対策にワクチンの果たしてきた役割は大きく、ワクチンで予防できる疾患はワクチンで予防する基本的な方針で欧米は積極的にワクチン政策をすすめてきた。一方、我が国では種痘禍、ジフテリア・百日咳・破傷風(DPT)の事故、麻疹・風疹・ムンプス(MMR)スキャンダルと予防接種に関する訴訟が続き積極的な予防接種政策を執ることはなく、最近になってインフルエンザ桿菌ワクチン(Hib)、結合型肺炎球菌ワクチン(PCV)、ヒトパピローマワクチン(HPV)が使用できる様になった。我が国の予防接種政策が立ち遅れた原因は何か、そしてワクチンの品目は揃いこれらを利用してゆくこれからの予防接種政策について考えてみたい。

Key words: 予防接種、ACIP、予防接種政策

Immunization, ACIP, Immunization strategy

1. はじめに

2007/08年の麻疹の流行、百日咳の大学キャンパスでの流行、2009年H1N1パンデミックと毎年感染症は世間を震撼させ、感染症に対するワクチンへの期待は高まっている。こうした古くからある感染症に対してワクチンが開発されてきたが、ワクチンで制御できた感染症は天然痘だけである。天然痘の撲滅は有効なワクチンがあれば感染症は撲滅可能であると錯覚を与えた。ワクチンで感染症に入始めると同じ感染症でも昔の病態とは変化し感染症・ワクチンに対する考え方も変わってくる。麻疹は終生免疫でワクチン接種後も長期間免疫効果が持続すると考えられてきたが、幼児期1回接種の免疫効果は減弱することから2回接種が必要であることは1989年のアメリカでの流行から知られていた¹⁾。我が国では2006年から2回接種になりすべての学童が2回の接種機会を得るように5年間の補足接種キャンペーンが2008年からはじまった²⁾。百日咳も同様に初回免疫を受けていれば罹患することはないと考えられてきたがワクチンの免疫持続期間は5年程度で大学での流行、成人の百日咳から新生児への感染が増え死亡例も増えている。欧米と比較

すると百日咳の成分の入ったワクチンの接種回数が2回少ないとからも対応を早期に考える必要がある³⁾。このように、有効なワクチンがあっても流行状況、国の状況、社会背景により感染症は様変わりする。感染症の動向を把握し、その対策にワクチンが必要なものにはワクチン開発を積極的に支援し、ワクチンがある疾患においても今までの接種方法で対処できるのか、接種方法を修正すべきなのか議論を尽くして柔軟に対応すべきであるが我が国は予防接種法として一度決めたらそれに固執し変更、改変するのは多大な労力が強いられる国で、ワクチン対策は常に後手に回っている。我が国の予防接種政策を海外と比較すると立ち遅れていることは周知の事実で、今、その原因がどこにあるのかを分析し対処する方策を執らなければワクチン後進国のまま更に取り残されることになる。

2. 予防接種法の変遷

牛痘に罹患すると天然痘から免れるという民間伝承を科学的に体系化した予防接種はジェンナーの種痘法に始まる。1796年5月14日に種痘が最初に実施され、我が国にはシーポルトにより紹介され牛痘

痘苗種が日本に入ってきたのが1849年のことである。種痘の瘡蓋を日本に持ってくる提案をしたのが鍋島藩の榎林宗建先生で19世紀にわずか50年で英国から東洋のはてにまで普及し更に1876年(明治9年)には種痘制度として「すべての日本人が必ず種痘を受けるように」と方針が示され、1910年(明治43年)には種痘法として公布された。我が先人達は進取の気概にあふれた民族であったはずである。予防接種法の変遷の概要を表1に示した。1948年(昭和23年)に予防接種法が公布され大きな変化は1976年(昭和51年)に健康被害の法的救済制度がもりこまれ、1994年(平成6年)には現行の基本となる個別接種に移行した⁴⁾⁵⁾。こうした背景には種痘禍(1968)、DPT禍(1974/75)、MMRスキャンダル(1989-1993)等の副反応に関する問題があり、集団訴訟に対して1992年の東京高等裁判所の二審判決の考え方

- 1) 国は予防接種を義務として強制してきた。
- 2) にもかかわらず、予防接種の効果や副反応についての十分な情報を国民に周知していなかった。
- 3) 接種担当医への情報も不十分で、禁忌事項を見逃して禁忌に当たるものに接種したので重篤な健康被害を生じた。

というものが判決の主旨で国に責任があるというものであった。予防接種との因果関係も科学的な確固たる証拠がなくても時間的に高度の蓋然性があれば因果関係が有りと考え、被告となった国や医師は過失がないことを証明する必要がある。

控訴しても国民に説明義務を果たしていないことが過失となり控訴を断念した。健康被害を手厚く救済することには異存はないが、予防接種との因果関係については時間的蓋然性という曖昧な判定ではなく科学的な根拠に基づくことが必要である。しかしながら、多くの副反応症例について科学的に判定すると因果関係に関しては「否定できない。」ことになり因果関係と救済は別の次元で考える必要がある。救済された副反応はすべて予防接種が原因であるという誤解を生じ、こうした問題に対する厚生労働省の対応が一般の人々にワクチンに対する不信感を抱かせてきたことが積極的なワクチン政策を執れなかつた原因ともなっている。

集団接種の中でこうした問題が起きたため、問診をつくし子供達をいつも診ている「かかりつけ医」が接種する個別接種へと移行した。国として強く接種を勧める勧奨接種のワクチンと接種努力義務となる任意接種の枠組みができた。

表1 予防接種法の変遷

明治43年(1910) : 種痘法施行
昭和23年(1948) : 予防接種法公布
【痘瘡、ジフテリア、腸チフス、パラチフス、百日咳、結核、発疹チフス、ペスト、コレラ、猩紅熱、インフルエンザ、ワイル病】
昭和26年(1951) : 結核予防法施行 【予防接種法から結核を削除】
昭和36年(1961) : ポリオワクチンの追加
昭和45年(1970) : 腸チフス、パラチフスを定期接種対象ワクチンから削除
昭和51年(1976) : 健康被害の法的救済制度、定期接種 【痘瘡、ジフテリア、百日咳、ポリオの4疾患】
昭和52年(1977) : 定期接種に風疹を追加
昭和53年(1978) : 定期接種に麻疹を追加
昭和55年(1980) : 定期接種から痘瘡を削除
平成6年(1994) : 個別接種化、勧奨接種【DPT、ポリオ、麻疹、風疹、日本脳炎】
任意接種【インフルエンザ、水痘、ムンプス】
平成13年(2001) : 65歳以上の高齢者を対象にインフルエンザワクチンを追加
平成16年(2004) : 中学1年、小学1年のBCGを中止
平成17年(2005) : ツバキを省略しBCG接種を0-6ヶ月に
平成17年(2005) : 日本脳炎ワクチンの積極的勧奨の中止、第III期接種の廃止
平成18年(2006) : 麻疹・風疹混合ワクチンを2回接種に
MMRスキャンダル1993
JEV-ADEM 2005
ワクチンに対する不信感

3. 定期折衝と任意接種

定期接種のワクチンは任意接種のワクチンと比較すると高い接種率であるが、法に基づかない任意接種のワクチンは有料で接種率があがらない。諸外国

ではワクチンはすべて定期接種で曖昧な任意接種といった考え方ではない。予防接種の実施主体は地方自治体で必要な予算は国から地方自治体に託されているものの、地方自治体によっては他の優先事項に経費を回して定期接種のワクチンとはいっても一部個

人負担になることもある。経済的に困窮している自治体では個人負担額が多くなり接種率に影響し国民の健康に地域格差が生じている。こうした予防接種制度の見直しについての提言を行う組織として厚生労働省の中に厚生科学審議会 予防接種部会が組織化され、成人百日咳、導入の遅れている不活化ポリオワクチン、任意接種のワクチンであるムンプス、水痘、B型肝炎ワクチン、Hib、PCV、ヒトパピローマワクチン(HPV)を評価し定期接種のワクチンに向けて疾患の disease burden とワクチンの対費用効果をワクチン毎に総合的に評価する作業部会が作られ、その組織と役割を図1に示した。ワクチンの評価、位置づけについて素案を小委員会に報告し、小委員会はその考え方をとりまとめて部会に報告す

る手順としている。2010年に Hib, PCV7, HPV が暫定的に予算化されて定期接種化されたことは高く評価されるものの2年間の期限付きであることや、その急な決定の過程には誰もが疑問を抱いている。作業部会からの答申報告はファクトシートとして公表されているがその後の決定のいきさつにはどういう議論がなされたのか明らかにされていない。政策決定権を持つ厚生労働省の中にその方針を議論し提言する組織があることは不透明感を払拭できない。日本小児科学会、ワクチン学会、感染症学会等の関連学会からなる日本予防接種専門協議会が組織された。学術団体からの意見を提言する機能を目指している⁵⁾。

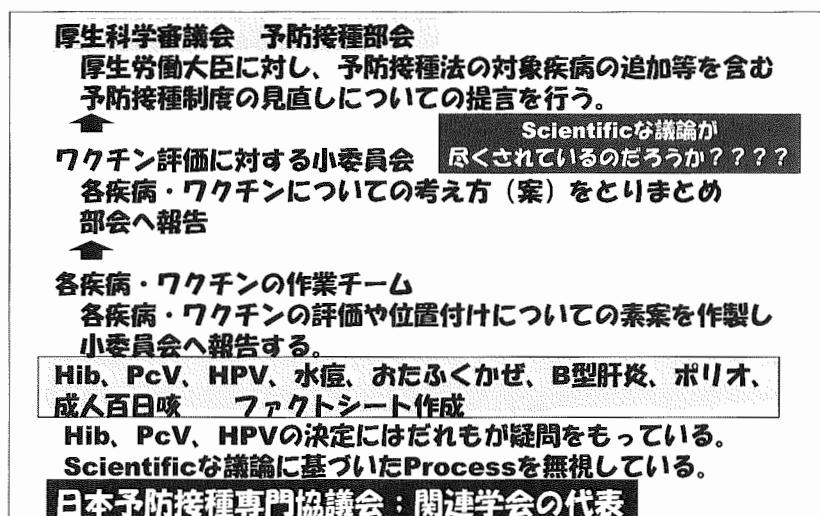


図1 予防接種部会と予防接種専門協議会

4. これから的问题点

予防接種部会、予防接種専門協議会ができただけで、ワクチン政策を長期的に考える Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) の設立が我が国でも熱望されており、これから的问题点を表2に示した。アメリカを含めたヨーロッパ先進諸国だけでなく多くの国にこうした機能を持つ組織が運営されている⁶⁾⁷⁾。ACIPはワクチン毎に設置された Working group からのエビデンスに基づいた報告書をもとに審議し定期接種に組み込むかどうか判断し政府機関に提言する組織である。その提言には重みがあり政府は recommendation として公布する。今、我が国において ACIP を組織しても予防接種に関する厚生労働省の中で法的決定権が分散しており機能しない危険性があり、行政側にレセプターがなければ机上の空論となる。ワクチンの審

査、許認可、予防接種法の運用などのワクチンに関するすべての関連部署を一元化し日本版ACIPの提言を反映する組織が必要である。

現在の予防接種の費用は国で予算化されているが、Hib, PCV, HPV の接種も暫定予算でスタートしており、現在財政面で困窮はしているが、予防接種は明らかに医療経済効率が高くすべてのワクチンを定期接種化しても4000億と試算され、継続かどうかが議論されている子ども手当の2兆3000億円よりはるかに実りの多い子供達へのプレゼントになる。

我が国の予防接種政策の中でかけているものは罹患率が把握できることにある。感染症サーベイランスは全国の小児科定点からの自主報告に基づくもので感染症の流行の傾向は把握することはできるがその disease burden を知るために人口に基づいた罹患率がわかるようなサーベイランスシステムが

表2 ワクチンに関する問題点

1. 行政の責任
厚生労働省のなかで分権化:審査管理課、結核感染症課、血液対策課 予防接種法の改正(事前周知なくいつも突然に) 実施主体が地方自治体、地域格差の拡大(責任の転嫁)
Recommendation without responsibility
2. ワクチンの許認可(医薬品医療機器総合機構)
審査にかかる時間、審査の遅延、 統一の治験ガイドラインの作成……
3. ワクチン開発研究(ワクチンメーカー)
新規ワクチン開発がない(国の方針がはっきりしない。)
4. 臨床医と基礎研究者の連携
臨床、基礎、疫学の共同でおこなった質の高い共同研究ができなかった。 ワクチン臨床研究は軽くみられている。
5. 正しい知識の普及 マスコミ対策 教育と啓発
副反応に偏った報道、正しい知識の普及

必要である。人口10万あたり何人発症し、入院が何例、死亡が何例といった疾患サーベイランスが必要でやっと麻疹が全数把握の疾患となり人口100万あたり3.5例と麻疹排除の目標である100万あたり1例以下に近づいている。同時に副反応の出現をモニタリングするシステムを確立し疾患のインパクトとワクチンの副反応のバランスを明確に示すことが感染症制御のための基本データとなる。発症例の多い疾患に対して全国サーベイランスはできなくても、いくつかの地域限定で実施し人口10万あたり何人といった罹患頻度ができる様なシステムが必要と思われる。

先般のワクチン同時接種後の事故のようなセン

セーショナルな話題は報道されるがワクチンの果たしてきた役割については知らされていない。「予防接種で感染症の死亡が激減した。」当たり前じゃないの。ワクチンだから。当たり前のことは耳目を引かない。報道されない。学校でも教わったことないし……ワクチンの果たしてきた役割はワクチンがなかった1950年頃の死亡者数を減らしたことにある(表3)。一般市民、保護者は偏った情報に晒されており、感染症、ワクチンの果たしてきた役割、副反応、効果についての正しい知識の普及を怠ってきた責任があり、偏ったマスコミ報道の責任のみならず小中学校の学校教育、保護者、これから臨床医の教育を考えていく必要がある。

表3

ワクチンがなかった時代 1950年代 ワクチンの果たしてきた役割

罹患届け出数	死者数 1950年 (最近数年)
百日咳 50,000～150,000人	10,000～17,000人 (0～5人)
ジフテリア 10,000～50,000人	2,000～3,800人 (0人)
破傷風 2,000人	2,000人 (10～15人)
ポリオ 2,000～5,600人	数百から1,000人 (0人)
麻疹 200,000人	数千～20,000人 (10人以下)
風疹 先天性風疹症候群403例 (1964-65:沖縄)	
日本脳炎 1,000～5,000人	2,000人前後 (0～2人)

文献

- 1) American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases: Age for routine administration of the second dose of Measles-Mumps-Rubella vaccine. *Pediatrics* 101: 129-133, 1998.
- 2) 岡部信彦: 2012年 麻疹排除に向けて 最近の国内外における麻疹の疫学状況と麻疹排除の動き. *臨床と微生物* 35: 3-9, 2008.
- 3) Okada K, Komiya T, Yamamoto A, et al: Safe and effective booster immunization using DTaP in teenagers. *Vaccine* 28: 7626-7633, 2010.
- 4) 神谷 齊: 日本のワクチンの現状と今後の戦略. *感染・炎症・免疫* 36: 311-325, 2006.
- 5) 神谷 齊: 新時代のワクチン戦略について考える ワクチン行政の過去と将来展望 *臨床検査* 54: 1213-1319, 2010.
- 6) 神谷 元、神谷 齊: 米国のワクチン行政に学ぶ *日本臨床* 66: 1858-1864, 2008.
- 7) 神谷 元: ACIPとは 小児内科42: 1921-1924, 2010.

〈シンポジウムII〉ワクチン接種後脳症について

ワクチン接種後脳炎・脳症について

栗山 勝¹、濱野忠則²

【要旨】 ワクチン接種後の副反応として中枢神経症状が起こることがある。病型としては、脳炎・脳症、無菌性髄膜炎、急性散在性脳脊髄炎、急性小脳失調症、急性片麻痺、後部可逆性脳症症候群(PRES)などが多く知られている。出現頻度に関しては、ワクチンごとに異なるが、総じて自然感染における合併症より少ない。発生機序は、EAE(experimental allergic encephalitis)様の機序、ウイルスそのものによる感染に付随して起こる機序、ワクチン中の添加物による副作用、ワクチン接種後の発熱に起因した熱性けいれん、vasogenic edemaやcytotoxic edemaが関与したPRESなどが推測されている。HBVワクチンやアルツハイマー病ワクチン接種後に関連した中枢神経症状に関するものも述べた。

Key words: ワクチン、副作用、脳炎・脳症

1. はじめに

ワクチンの予防接種は、小児科領域の問題と考えやすいが、小児だけの問題ではない。数年前、日本では麻疹の流行が青年層に流行し、麻疹ワクチンの問題が大きく取り上げられた。また新型インフルエンザの流行は世界中の恐怖であり、ワクチンの供給不足で問題になった。季節型、新型を問わずインフルエンザワクチンや、B型肝炎(HBV)ワクチン、あるいは海外渡航に対するトラベラーズワクチンこれらはすべて、主として対象者は成人が多い。また、感染症ではないがアルツハイマー病に対するワクチン療法が市場に出つつある状況であり、当然ながらこれも成人特に高齢者が対象である。よって、これらワクチンをより安全に使用するためにもワクチン接種後の副作用としての脳炎・脳症に関して知ることは非常に重要である。

2. 病型¹⁻⁴⁾

- 1) 脳炎・脳症 (Encephalitis/encephalopathy)
ワクチン接種後、数日以内に起こることが多

い。臨床症状は、精神症状、髄膜刺激症状、錐体路徵候、痙攣・意識障害などが出現する。病理像は、感染後脳炎と類似した所見であり、脳実質の炎症、脱髓病巣、炎症細胞の浸潤、特に血管周囲のperivascular cuffingなどがみられる。しかしながら、ほとんどの症例では、髄膜脳炎、脳脊髄炎、あるいは急性散在性脳脊髄炎(ADEM)の病態が重複してみられることが多い。

- 2) 無菌性髄膜炎 (aseptic meningitis)
症状は、一般的にみられる無菌性髄膜炎と変わらない。特に、ムンプスワクチンで高頻度に起こる。またMMR(measles/mumps/rubella)ワクチンでも頻度が高く、特にウラベ株で高率に出現した⁵⁾。
- 3) 急性散在性脳脊髄炎 (ADEM)
これに関しては、別稿に記載される。
- 4) 急性小脳失調症 (acute cerebellar ataxia)
ワクチン接種後に急性に出現する小脳失調症状である。多くは無いが、症例報告として水痘、B型肝炎、風疹、日本脳炎、インフルエンザのワクチンで報告されている。
- 5) その他

1: 脳神経センター大田記念病院(福井大学名誉教授) (〒720-0825 広島県福山市沖野上町3-6-28)

2: 福井大学医学部第二内科(神経内科)

急性片麻痺 (acute hemiplegia)、後部可逆性脳症症候群 (Posterior Reversible Encephalopathy Syndrome、PRES) などが症例報告されている。

3. 各ワクチンにおける神経合併症と頻度

1) MMR(measles/mumps/rubella) ワクチン

Measles (麻疹)、mumps (ムンプス)、rubella (風疹) の3種混合のワクチンである。本邦では、ワクチン施行により、無菌性髄膜炎が多発し、1993年にMMRワクチンの施行が中止され、1994年に予防接種法の改定が行なわれ、MMRワクチンは個別接種化となった経緯がある。その結果、その後2000年頃から、ワクチンを受けなかった日本の青年層の若者における麻疹の大流行が起こった。米国からは日本は“Measleを輸出している”とまで言われた^{6) 7)}。MMRワクチンと自閉症の関連がLancetに報告され、防腐剤のチメロサールが原因として疑われたが⁸⁾、現在は否定的とされている。

2) 麻疹ワクチン

ワクチン接種後1~2週間で、麻疹そのものが発症することがある。また発熱後に熱性けいれんが起こることがあるが、重篤なものではない。亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) の発症がみられる事もあり、頻度は0.7人/100万回接種の頻度であるが、自然感染では8.5人/100万人と言われており、自然感染の場合より低頻度である⁹⁾。脳炎/脳症は1人/100万回接種、あるいは北里研究所の発売後調査では2例/364万本であり¹⁰⁾、自然感染の場合は1人/2000人と試算されており、ワクチン接種で低頻度である⁹⁾。

3) ムンプスワクチン

無菌性髄膜炎髄膜炎の頻度が高く、1人/2100人あるいは北里研究所の報告では、無菌性髄膜炎134例/153万本である¹⁰⁾。ムンプスウイルスでは自然感染では永井らによる試算では1人/80人であり¹¹⁾、このウイルスそのものが、髄膜向性が強いウイルスと思われる。その他、北里研究所から脳炎が1例報告されているが、これはその後の解析でエンテロウイルス感染によるものである可能性が高いとされている。また急性小脳失調も1例報告されている¹⁰⁾。

4) 風疹ワクチン

北里研究所の報告では、400万本の接種で脳炎、ADEMが各々1例報告されている¹⁰⁾。

5) DPT(diphtheria,Pertussis,tetanus) ワクチン

Diphtheria (ジフテリア)、pertussis (百日咳)、tetanus (破傷風) の3種混合ワクチンである。発熱に伴う、熱性けいれん以外に、突然の脱力、意識混迷、反応性低下、顔面蒼白をきたすhypotonic/hyporesponsive/episode (HHE) の発症が知られている。これは接種後48時間以内に起こることが多いが、詳細は不明である。また、本邦では1056万本の接種で脳炎が、1例報告されている¹⁰⁾。

6) ポリオワクチン

経口ポリオ生ワクチンによるポリオ感染で、300万人で1人の割合で接種後4~30日に弛緩性麻痺がおこることがある⁹⁾。欧米諸国では不活化ワクチンが主流であり、その導入に向けて、運動が起こっている。神奈川県では不活化ワクチンの独自の導入を決定し、特例承認医薬品として厚労省に申請しているが、許可されていない。

7) 狂犬病ワクチン

ワクチンに混入した神経組織に起因するADEMは代表的で、脱髓の免疫学的研究の出発点ともなった。1987年、タイでヒツジ脳を用いて製造されたSemple型ワクチンで1.1万接種あたり50例 (0.45%) の神経合併症が生じ、死亡が17%に及んだ。髄膜脳脊髄炎が6例、髄膜脳炎2例、脳炎4例、脊髄炎7例、髄膜炎13例、ギランバレー症候群 (GBS) 4例などが報告されている¹²⁾。日本においても1947年から1950年にかけてウサギ脊髄を用いた弱毒生ワクチンを接種して、神経合併症が0.57%に生じた。直ちに変更され現在はニワトリ胚細胞を持ちて製造されており、重篤な副作用は出現していない。

8) 日本脳炎ワクチン

厚労省の平成6年~16年間の予防接種後副反応調査報告では、脳炎/脳症32例 (ADEM 21例)、けいれん45例、意識消失3例、運動障害 3例、一過性痺れ7例、視神経炎 1例、顔面神経麻痺2例、末梢神経麻痺 4例、無菌性髄膜炎1例である¹³⁾。また、北里研究所の販売後調査報告では945万本で、脳炎 1例、ADEM 2例が報告されており、ワクチン中のマウス脳組織の混入による、myelin basic protein (MBP) による免疫反応によるとされている¹⁰⁾。

9) インフルエンザワクチン

1976年、米国においてワクチン接種後、10万人当たり1人にGBSが多発し、注目された。原因に関しては明確には解明されなかつたが、特殊なウイルス株であった可能性が推測されている¹⁴⁾。

日本では、医薬品医療機器総合情報機構の報告で、平成18年に1877万本接種され、107人に副作用が出現しており、ADEMが20例、発熱11例、けいれん6例、GBS4例などが報告されている。北里研究所の販売後調査報告では、3802万本の接種で、無菌性髄膜炎1例、ADEM3例、GBS9例が報告されている¹⁰⁾。また症例報告としては、Fisher症候群1例、辺縁系脳炎2例、多発性硬化症1例などが報告されている。宮本雅之らは、1972年～1996年までの、インフルエンザHAワクチン接種後の神経合併症を報告しており、中枢神経障害が47例に認められ、その内訳は脳炎・脳症20例、てんかん・熱性けいれん9例、ADEM8例、メニンギスム・無菌性髄膜炎3例、急性小児片麻痺2例、多発性硬化症1例、急性小脳失調症1例、脊髄炎2例、脳幹腫瘍1例などである。また末梢神経障害もGBS16例を含め26例に認められている¹⁵⁾。厚労省は、新型インフルエンザワクチンの重篤副反応の報告を行なっている。約123万回の接種で副反応は1272人(0.006%)、重篤例は157例(0.0007%)うち死亡例が3例であった。さらに季節性インフルエンザワクチン(2006年～2009年の3年間)と新型A型インフルエンザH1N1ワクチン(2009年10月～2010年3月の約1年間)とを比較しており、表1のごとであり、ADEMの合併は少ないが、痙攣は頻度が高い。今後とも分析が必要である。

表1

インフルエンザワクチンの重篤副反応(厚生労働省) 神経・筋骨格系障害

	季節性	新型
脳梗塞	0	2
脳炎	5	3
脳血管炎	3	0
脳症	6	6
ADEM	41	6
PRES	1	0
痙攣	17	24
脊髄炎	2	0
顔面神経麻痺	8	2
GBS	23	8
筋炎	1	1
横紋筋融解	2	0

(件数)

季節性:季節性インフルエンザワクチン
(2006年～2009年の3年間)

新型:A型インフルエンザH1N1ワクチン
(2009年10月～2010年3月の約1年間)

4. ワクチン後脳症・脳炎の発症機序

1) EAE (experimental allergic encephalitis) 様の機序

1987年、タイで Semple 型狂犬病ワクチンによるADEM発症が多発し、その機序として脳性分の混入のためMBPあるいはウイルスのMBP類似成分による自己免疫応答により脱髓をきたすと推測されており¹²⁾、accidental allergic encephalitisとも呼ばれている。その他のワクチンによる発症も同様な機序が推測されている。

2) ウィルスそのものによる感染

特に、ポリオ生ワクチンのような弱毒生ワクチンの場合、ウィルスそのものが感染し脳症/脳炎が発症することがある。その他、MMRワクチン中のムンプスウラベ株や麻疹ワクチンの場合も推測されている。

3) ワクチン中の添加物による副作用

DPTワクチンやMMRワクチンの場合、添加物としてのウシゼラチンによりアナフィラキシー反応が起こり得る¹⁶⁾。またMMRワクチンの添加物であるワクチン保存剤としての抗菌剤メチロサール(水銀が主成分)で自閉症が起こるとLancetに報告され問題となったが⁸⁾、最近これは否定され、Lancetの論文も正式に削除された。またウシ由来成分の場合BSE発症も危惧されている¹⁶⁾。

4) ワクチン接種後けいれん

接種後のけいれんに関しては、多くの場合は発熱に起因した熱性けいれんと考えられている。2006年に大矢達男ら、1995年～2004年の厚労省予防接種後副反応調査から各種ワクチン別の神経系副反応を報告している¹⁷⁾。表2にみられるようにけいれんが最も多く171例であり、多くは発熱を伴う熱性けいれんとしている。しかしながら、高橋幸利らによると、1次性ウイルス脳炎、2次性自己免疫性ウイルス脳炎、亜急性硬化性全脳炎、Rasmussen症候群などが可能性として考えられ、サイトカインや多種の免疫機序が関連すると述べている¹⁸⁾。

表2

予防接種後副反応調査からみた各種ワクチン別の神経系副反応（1995年10月1日～2004年3月31日）

	DPT	麻疹	風疹	日本脳炎	ポリオ	BCG	インフルエンザ	合計
脳炎・脳症	6	5	1	27	0	0	3	42
けいれん	56	67	10	38	0	0	0	171
運動障害	0	0	1	3	13	0	1	18
その他の神経障害	10	4	8	20	0	0	9	51
合 計	72	76	20	88	13	0	13	282

5) 後部可逆性脳症症候群 (PRES)

近年、この病態と Reversible Cerebral Vasoconstriction Syndrome (RCVS)との関連が整理されつつある。すなわち、高血圧（血圧変動）、妊娠出産、血管作動性薬剤、あるいはワクチン接種により、サイトカインが変動し、その後交感神経興奮による血管攣縮と虚血、あるいは血液脳関門の破綻が生じ浮腫の発生する病態が生ずる。その程度の差によって vasogenic edema が強い時には PRES が生じ、 cytotoxic edema が強い時には RCVS が生ずるのではないかと推測されている¹⁹⁾。ワクチン接種後生じた症例が報告されており注意が必要である²⁰⁾。

5. HBVワクチンと多発性硬化症 (MS)

1991年～1999年にかけてフランスにおいて、HBVワクチン接種後に、数百人が急性中枢性脱髓性疾患を発症し検討されたが、明確な因果関係は示されなかった²¹⁾²²⁾²³⁾。しかしながら、HBVウイルス蛋白と中枢神経蛋白との分子相同性が検討され、HBV polymerase (HBV-pol) が、ヒトやウサギのMBPと相同性のあるアミノ酸モチーフが4か所で認められ、B型肝炎感染後あるいはワクチン接種後に中枢神経に脱髓が起こり得る可能性が示唆されている²¹⁾。さらに興味あることに、1985年に Fujinami & Oldstone により HBV-pol のペプタイドでウサギに EAE を作製しているが、そのペプタイド内に6個のアミノ酸が上記 MBP2 の6つのアミノ酸 (-YGLSPQ-) であり、ウサギのMBPの脳炎誘発部位 (encepalitogenic site) である事も判明している²⁴⁾。さらに、近年 Lewis ラットの EAE 起部位でもあることも報告されている。このように、分子相同性の観点からは、HBV-pol 蛋白はヒトの MS ないし ADEM の発症との関連で非常に興味深い²⁵⁾。一方、リコンビナント HB ワクチンの

GenHevacB は HBV-pol の遺伝子フラグメントを含むが、RecombitaxHB と EngerixHB は含有しない。そのため HBV-pol の遺伝子フラグメントを含まない HB ワクチンを使用した場合には、ワクチン接種後の脱髓疾患の発症には関与しないと考えられるが、さらに詳細な検討が必要である。

6. アルツハイマー病ワクチン

感染症予防のためのワクチンではないが、現在アルツハイマー病の新規の治療法としてワクチン療法が考案され、ヒトにおいても治験が進んでいる。このワクチン接種において重篤な副反応が発生した経緯があり、詳細を知ることはワクチン全般を知る上で意義深い。

Elan 社の開発した AN1792 は凝集アミロイド β 蛋白 (A β 42) とアジュバントとして精製サポニン (QS-21) を用いている筋注ワクチンである。2001年に始まった第2相ワクチンの接種で副反応として髄膜脳炎が298人中18例（約6%）に認められ、1名の死亡例も報告され、2002年1月に中止された²⁶⁾。臨床的には意識障害を伴う多発性巣状を示し、MRI では白質、灰白質、髄膜などに多巣性、びまん性の高信号が認められた。死亡例で詳細な病理組織学的な検討がされ、髄膜脳炎と大脳白質にマクロファージの浸潤を伴う所見であった。髄膜脳炎の所見は髄膜、髄膜血管周囲、大脳皮質へ T 細胞浸潤がみられ、T 細胞は Th1 型 CD 4 $^{+}$ 陽性 (CD 3 $^{+}$ CD 4 $^{+}$ CD 45 RO $^{+}$)、CD 8 $^{+}$ 陰性であり、A β に反応する T ヘルパー細胞を介する自己免疫性脳炎、EAE に一致する所見であった²⁷⁾。現在は、より安全なアデノ随伴ウイルスベクターを用いた経口ワクチンの開発がすすめられており、腸管免疫を利用したもので、臨床応用が期待されている²⁸⁾。

参考文献

- 1) Patel H & Garg BP. : Neurological complications of immunization. Roos KL ed. Principles of neurologic infectious diseases. McGraw-Hill Medical Publishing Division. New York. 2005. pp 523-544.
- 2) 濱野忠則、栗山勝：ワクチン接種後脳症、神経治療26：39 - 45、2009
- 3) Fenichel GM. Neurological complications of immunization. Ann Neurol. 12:119-128. 1982
- 4) 田辺卓也、玉井浩：予防接種後脳症を含む神経合併症、小児内科 36：1179 - 1182、2004
- 5) Ueda K, Miyazaki C, Hidaka Y, et al : Aseptic meningitis caused measles-mumps- rubella vaccine in Japan. Lancet. ;346: 9701-9702. 1995
- 6) Gomi H, Takahashi H. : Why is measles still endemic in Japan? Lancet. 364: 328-329. 2004
- 7) Takahashi H, Saito H. : Measles exportation from Japan to the United States, 1994 to 2006. J Travel Med. 15:82-86. 2008
- 8) Taylor B, Miller E, Farrington CP, et al : Autism and measles, mumps, and rubella vaccine: no epidemiological evidence for a causal association. Lancet. 353:2026-2029, 1999
- 9) 永井利三郎、沖永剛志：予防接種と神経副反応、小児科49：455 - 462、2008
- 10) Nakayama T, Onoda K. : Vaccine adverse events reported in post-marketing study of the Kitasato Institute from 1994 to 2004. Vaccine 25 : 570-576. 2007
- 11) 永井崇雄、中山哲夫：ムンプスワクチン、特集ワクチンのすべて。小児診療67：1868 - 1873、2004
- 12) Hemachudha T, Phanuphak P, Johnson RT, et al : Neurologic complications of Semple-type rabies vaccine: clinical and immunologic studies. Neurology37 : 550-556. 1987
- 13) 大矢達男：原行日本脳炎ワクチンと神経系副反応。小児科47 : 445 - 454、2006
- 14) Schonberger LB, Bregman DJ, Sullivan-Bolyai JZ, et al : Guillain-Barre syndrome following vaccination in the National Influenza Immunization Program, United States, 1976--1977. Am J Epidemiol 110 : 105-23. 1979
- 15) 宮本雅之、片山宗一、宮本智之ら：インフルエンザワクチン接種後に発症した急性散在性脳脊髄炎。神経内科44 : 179 - 182、1996
- 16) 城野洋一郎： ワクチン添加物の除去。総合臨床53 : 1850 - 1852、2004
- 17) 大矢達男：予防接種の副反応。(加藤達夫、編)。改訂版 予防接種マニュアル、新興医学出版、2006、pp 63 - 73
- 18) Takahashi Y. Infections as causative epilepsy. Future Neurology 1 : 291-302, 2006
- 19) Chen SP, Fuh JL, Wang SJ. Reversible cerebral vasoconstriction syndrome: an under-recognized clinical emergency. Ther Adv Neurol Disord.3:161-71. 2010
- 20) Hamano T, Takeda T, Morita H, et al : Posterior reversible encephalopathy syndrome following measles vaccination. J Neurol Sci. 298 : 124-6. 2010
- 21) Faure E. : Multiple sclerosis and hepatitis B vaccination: could minute contamination of the vaccine by partial hepatitis B virus polymerase play a role through molecular mimicry? Med Hypotheses.;65:509-520. 2005
- 22) Schattner A. Consequence or coincidence? The occurrence, pathogenesis and significance of autoimmune manifestations after viral vaccines. Vaccine. 23:3876-86. 2005
- 23) DeStefano F, Verstraeten T, Chen RT. : Hepatitis B vaccine and risk of multiple sclerosis. Expert Rev Vaccines. 1:461-466. 2002
- 24) Fujinami RS, Oldstone MB. : Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. Science.230:1043-1045. 1985
- 25) Mannie MD, Paterson PY, U'Prichard DC,et al : Induction of experimental

- allergic encephalomyelitis in Lewis rats with purified synthetic peptides: delineation of antigenic determinants for encephalitogenicity, in vitro activation of cellular transfer, and proliferation of lymphocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 82:5515-5519. 1985
- 26) Orgogozo JM, Gilman S, Dartigues JF, et al : Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization. Neurology. 61 :46-54. 2003
- 27) Nicoll JA, Wilkinson D, Holmes C, et al : Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report. Nat Med. 9:448-52. 2003
- 28) Mouri A, Noda Y, Hara H, et al : Oral vaccination with a viral vector containing Abeta cDNA attenuates age-related Abeta accumulation and memory deficits without causing inflammation in a mouse Alzheimer model. FASEB J. 21 :2135-2148. 2007

〈シンポジウムII〉ワクチン接種後脳症について

ワクチン接種と副反応の現状

永井利三郎

【要旨】我が国の予防接種は、戦後にワクチンへの様々な改良を加えながら実施されてきた。しかしMMRワクチンの実施後に多数の髄膜炎合併が認められ、健康被害認定と副反応の報告集計が行われてきた。副反応報告に基づく重篤な神経合併症の報告(平成14年～21年)によれば、MRで5例、日脳ワクチンで5例、ADEMが13例である。予防接種との関連が考えにくい症例での自然発生率の調査では、同等かむしろ多い発症が見られている。今後この因果関係を明らかにしていくためには、神経疾患のより詳細な調査が必要であると思われる。

Key words: 予防接種、副反応、神経

1. 我が国の予防接種の現状¹⁾

我が国の予防接種は、1948年に予防接種法が制定され、種痘、ジフテリア、腸チフス、パラチフス、発疹チフス、コレラがスタートした。1950年に百日咳ワクチンが開始、1951年に結核予防法の制定、1954年に日本脳炎ワクチンが開始され、予防接種が本格的に実施されるようになった。1958年には、インフルエンザワクチン、1960年にはポリオ生ワクチン、1968年にはDPTワクチンが開始されている。その後、ワクチン接種に伴う様々な副反応が問題となり、ワクチンの様々な改良がおこなわれ、特に百日咳ワクチンの精製は、副反応の大幅な減少をもたらした。しかし種痘後脳炎の問題により救済制度が発足した。

1989年に開始されたMMRワクチンの実施に伴う髄膜炎などの神経合併症の多発があり、これらの予防接種健康被害に対する集団訴訟に国が敗訴したことを踏まえて、平成6年の予防接種法には大幅な改正が行われた。この中で、接種が不適当な対象を見逃したためではないかという裁判所の判断に対し、国は予診の徹底を勧奨するとともに、てんかんや重症心身障害児は、予防接種が制限される対象から、接種要注意者となり、接種に向けて接種医や保護者に対し、予防接種上の注意点がわかりやすいよ

うに、予防接種ガイドラインが作成された。

平成6年の予防接種法改正の要点は、「①集団接種から個別接種へ→保健所から診療所、②健康被害救済の充実→被害者救済は手厚く、③対象疾病の見直し、④予診の強化→予防接種を行ってはならないものを識別する、⑤情報提供の徹底→予防接種ガイドライン、予防接種と子どもの健康に明記、⑥健康被害が生じた場合の速やかな情報収集を行う、⑦予防接種副反応報告の制度化→半期ごとに集計、⑧接種注意者の設定：重症心身障害児、けいれん性疾患児、アレルギー疾患、などである。この平成6年の改正において、予防接種は強制的なものではなくなったが、予防接種の重要性に鑑み、健康被害救済の制度は強化して存続することとなった。

表1に、重症例についての予防接種副反応報告を文献1より転載した。

その後、平成13年の改正においてインフルエンザの高齢者への接種が予防接種法で行われるようになり、その後も、日本脳炎ワクチンに伴う散在性脳脊髄炎の問題による接種勧奨の中止があったが、高齢者へのインフルエンザワクチン予防接種の公費負担(平成13年)、小1、中1生へのツ反、BCGのが接種中止となり(平成18年)、MRワクチンの2回接種(平成18年)と中高生への追加接種(平成20年)が実施されるようになった。

表1

ワクチン	接種数 (100万)	アナフィラキシー	脳炎・脳症	ADEM	その他
DPT・DT	3700	21	1		ACA 1
風しん	470	4 (0.001)			
麻しん	580	3	0		
MR	815	6	5	1	ACA 1
日脳(旧)	1530	28	5 (0.0096)		
ポリオ	1530	—	—		麻痺17※ (0.011)
BCG	970	—	—		

()内は対100万接種、ACA：急性小脳失調症、※2次性を含む

平成23年度からは、髄膜炎菌ワクチン、肺炎球菌ワクチン、子宮頸癌ワクチンがスタートし、市町村単位の事業としてワクチン費用の公費負担が行われているため、新たな状況になっている。

2. 予防接種健康被害救済制度

予防接種法に基づく定期接種に関連した健康被害は、厚生労働省が設置する疾病障害認定審査会の中の予防接種健康被害認定審査会で行われている。一方ポリオワクチンに基づく健康被害は、ポリオ生ワクチン2次感染症者対策検討会で、インフルエンザワクチンは、新型インフルエンザ予防接種健康被害調査部会で行われている。

健康被害の認定は、ワクチンとの因果関係が、「確実」から「疑わしいが否定できない」まで、確実さの程度を分けて判定されるが、「否定的である」と判断される場合を除いて、「否定できない」事例まではすべて、補償の対象になる。因果関係の強さによって、補償の差は設けられていない。

健康被害の申告は、市町村の予防接種担当課を通じて、厚生労働省健康局結核感染症課に進達され、疾病・障害認定審査会で審査され、給付の有無と内容が決定される。給付の内容は、医療費、医療手当が支給されるとともに、障害が残った場合は、障害の程度の応じて障害児養育年金、障害年金が、死亡した場合は死亡一時金、葬祭料が、状況によって遺族年金や遺族一時金が支給される。

3. 予防接種注意者への予防接種

我々はこれまで、予防接種注意者に対する予防接種の状況に関する様々な調査をおこなってきた。²⁾

田辺らは、少しの発熱でけいれんがおこりやすいけいれんが乳児重症ミオクロニーてんかん(SMEI)児への予防接種と感染症罹患時の状況について田辺らが報告している³⁾。これは、SMEI、58例について359回の予防接種を検討したものである。それによれば、多くの保護者は SMEI 発症後も積極的に予防接種を行っていた。予防接種後の発熱は26例にみられ、うちけいれんの増悪が18例にみられたが、特に重篤なものは見られなかった。一方自然罹患は、麻疹による意識障害など重篤例が2例、発熱に伴うけいれん増が悪6例、水痘による意識障害1例、けいれん増悪9例、風疹によるけいれん増悪3例、ムンプスによるけいれん増悪2例、インフルエンザによる脳症発症1例などの重篤例が多数見られた。SMEIにおけるけいれん重積のコントロールは困難であり、これらの結果は、予防接種が神経系の基礎疾患の児においても重要であることを示している。

4. 予防接種後の副反応

平成14年4月から21年3月までの7年間に予防接種副反応報告により把握されている重症例を表1にしました。含まれる疾患は、脳炎・脳症14例、ADEM14例である。これらの発生数は予防接種に実

施数、500万～1500万接種の中での発生数である。

一方これらの疾患は予防接種と関連なしにみられる、有病率に関しては、我が国では公的な絶対数の把握は行われていないため、実態の把握が困難であるが、Torisuらが福岡での調査結果を報告している。それによれば、ADEMの発症は対小児人口10万人に対して0.64人、うち予防接種関連が0.1人であったとしている⁴⁾。

神経合併症が予防接種に関連して発症したかどうかの判断は、主に接種から発症までの時期から推測して判断されている。臨床的に予防接種後の髄膜炎と判断された症例においても、髄液の検査結果、他のウイルスの感染が髄液中に証明された報告がある。また感染の既往がはっきりしない例においても ADEMが認められる例があり、予防接種が実際に直接ADEMの発症に関連しているのかについては、実証することが難しい状況がある。

一方ワクチン後の脳炎脳症症例の検討から、SCN1A遺伝子の異常が見られたという報告⁵⁾があり、個別の症例における遺伝子異常との関連が注目されている。しかし同じ遺伝子異常との関連のある SMEIに関する我々の検討では、ワクチンでの発熱時やけいれん発生時も脳症などの発現はなく、自然感染での脳症が見られていることから、本遺伝子との関連については慎重である必要があると考える。

予防接種の神経合併症が、直接予防接種が起因するかについては、今後、合併症例のより詳細な病歴の把握と、脳炎脳症やADEMの発症率に関する詳細な症例の把握が必要であると思われる。

文献

- 1) 平山宗宏 編集 予防接種実施者のための予防接種必携、 予防接種リサーチセンター、 2011年
- 2) 永井利三郎 沖永剛志 予防接種と神経副反応 小児科 49 : 455 - 462、 2008
- 3) 田辺卓也 他7人 乳児重症ミオクロニーてんかん (SMEI) 症例のワクチン接種状況調査 脳と発達 36 : 318 - 323
- 4) H.Torisu et. al. Clinical study of childhood acute disseminated encephalitis, multiple sclerosis, and acute transverse myelitis in Fukuoka Prefecture, Japan. Brain & Development 32 : 454-462. 2010
- 5) Belcovic et. al De Novo mutations of the sodium channel gene SCN1A in alleged

vaccine encephalopathy: a retrospective study. Lancet Neural 4: 488-492, 2006

〈シンポジウムⅡ〉ワクチン接種後脳症について

ワクチン接種後脳症について:ADEM

岸 崇之、伊藤 康、大澤真木子

【要旨】急性散在性脳脊髄炎 (acute disseminated encephalomyelitis: ADEM) は脳脊髄の散在性多巣性病変に基づく神経症状を示し、炎症所見を伴う単相性の中枢神経系脱髓疾患である。麻疹や水痘などの感染後やワクチン接種後に発症することが多い。ワクチン接種後ADEMの発症機序は、弱毒生ワクチンでは自然感染後と同様の機序で発生すると考えられ、不活化ワクチンではウイルス成分自体や混入した神経組織成分に対する免疫反応などの機序が推定されている。近年のワクチン改良により、ワクチン接種後ADEMの頻度は非常に低い。また自然感染後のADEMの頻度と比較すると、ワクチン接種はADEMの発症を劇的に低下させている。ADEMを含めた重篤な合併症予防のため、ワクチン接種は積極的に勧奨していく必要がある。

Key words: 急性散在性脳脊髄炎、ワクチン接種、ワクチン接種後脳症、小児

1. ADEM

急性散在性脳脊髄炎 (acute disseminated encephalomyelitis: ADEM) は急性から亜急性に発症し、脳脊髄における散在性多巣性病変に基づく神経症状を示し、意識障害や行動異常などの脳症症状が中核である。発熱、髄液細胞增多などの炎症所見を呈し、単相性またはまれに多相性の病変を白質主体に認める中枢神経系脱髓疾患である¹⁾。小児に多く発症し、やや男児に多い傾向を示す。感染症罹患後やワクチン接種後に発症することが多く、先行感染として代表的なものは麻疹、水痘などの発疹性ウイルス感染症である。同様の中枢神経脱髓病変を示す多発性硬化症 (multiple sclerosis: MS) の初発例 clinically isolated syndrome (CIS) との異同、鑑別は問題となるが、初回の脱髓事象では複数の中枢神経部位による症状を呈し脳症症状を伴うものをADEMとし、伴わないものはCISとしている。また單一の中枢神経部位による症状であればCISとしている。CISのうち、脱髓の再発または発症後3ヵ月以降に新しいMRI所見を呈するものをMSと診断する(図1)。通常、MSは思春期女性に多く、脳症症状は病初期にはまれであるといった特徴を示し、髄液細

胞数の増加を示すことは少なく、4週以上あけて繰り返すイベントなどの特徴がADEMとの相違点である²⁾。

本邦における小児ADEMの疫学的特徴として、平成17年度の厚労省研究班の報告によると、一定の季節性は認めず、平均発症年齢は5歳11ヵ月（0歳ー14歳、中央値6歳）、罹患率は小児人口10万人に対し0.38人（年間約60人）と推計されている。また全体の85%（全治19%、軽快66%）は予後良好と考えられるが、8%に後遺症が残る³⁾。

海外での疫学的調査では、平均発症年齢は5.3-9.8歳、罹患率は0.4人/10万人年であり、3週間以内の先行感染を46-100%に認めるなど国内のデータと大差はない。神経学的後遺症は4-30%、再発は2-33%に認める報告されている⁴⁾。

頭部MRI画像所見は特徴的で診断に有用である。発症時よりT2強調画像またはFLAIR画像で境界不明瞭で不均一な高信号として描出される。比較的大きな病巣が、非対称性に皮質下、中心灰白質境界部、大脑半球、小脳、脳幹、脊髄に多発する。視床や基底核の深部灰白質ではしばしば病巣が対称性に認められるが、これはADEMに特徴的な所見である。脳室周囲白質にも30-60%に認めるが、脳梁病変は少

ない。病変は単相性であり、ほぼ同時期に出現し経過により完全または部分的に消退する。MRIが正常化してからさらに2回、または5年間経過観察したほうがよいとされる⁵⁾。病理組織学的には、血管周囲のリンパ球浸潤と白質の血管周囲脱髓を特徴とする。この所見は実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis :EAE) モデルと類似している。ADEMの発症機序はEAEに関連付けられ、髓鞘蛋白に対するT細胞を介した自己免疫と推定されている。直接的機序として感染微生物抗原と宿主抗原の間に構造の類似性が存在するという分子相同性 (molecular mimicry) により、自己反応性T細胞を介した髓鞘蛋白に対する自己免疫反応が生じると考えられている⁶⁾。また、感染後のウイルス特異的T細胞による免疫反応やウイルスによる組織障害がおこり、自己抗原の放出による自己応答性T細胞の新たな活性化 (epitope spreading)、もしくは炎症

によりサイトカイン産生の結果、周辺組織に生じる免疫反応の賦活 (bystander activation) が間接的機序として考えられている¹⁾。

治療は急性期の第1選択は、methylprednisolone (mPSL) のパルス療法であり、経過により1-2ヶ月反復投与する。重症、難治例では、血漿交換療法あるいはγグロブリン大量静注療法が推奨される。予後は概ね良好だが、失調や片麻痺など種々の程度の神経学的後遺症を残す例もある。また、ADEMは通常単相性だが、ADEMの後に、新たに異なる部位に脱髓が出現し、最初の事象とは異なる神経学的症状を伴うmultiphasic ADEMや、最初のADEM発症から少なくとも3ヶ月かそれ以降に同じ病巣部位に再発するrecurrent ADEMがある（図1）。回復後は感染を契機とした再発に注意するとともに、不活化ワクチンを含めてワクチン接種は一定の期間（6ヶ月間）は避けるべきである。

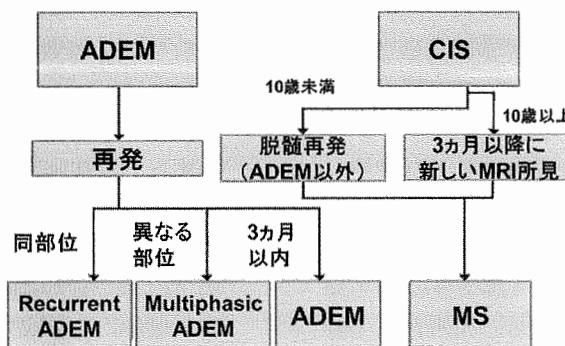


図1 ADEMとCISの転帰（文献2より）

初回の脱髓事象では複数の中権神経部位による症状を呈し脳症症状を伴うものをADEMとし、伴わないものはCISとしている。また単一の中権神経部位による症状であればCISとしている。CISのうち、脱髓の再発または発症後3ヶ月以降に新しいMRI所見を呈するものをMSと診断する。ADEMは通常単相性だが、ADEMの後に、新たに異なる部位に脱髓が出現し、最初の事象とは異なる神経学的症状を伴うmultiphasic ADEMや、最初のADEM発症から少なくとも3ヶ月かそれ以降に同じ病巣部位に再発するrecurrent ADEMがある。

2. ワクチン接種後ADEM

ADEMのうち、ワクチン接種後に生じるものは約5%とされている。発症までの期間はWHOでは接種後3ヶ月とみなしているが、実際には1-3週間での発症が多い。文献的にはさまざまな感染症に対するワクチンで生じると記載されている。2009年の全国調査では18%がワクチン後のADEMであり、我が国での小児のワクチン後ADEMの罹患率は年間100万人に約1人と推定されている⁷⁾。ADEMはワクチ

ン接種の重大な副作用の一つではあるが、他の副作用の頻度と比較して高いわけではない。

ワクチン接種後ADEMの発症機序はワクチンの種類によって異なる。麻疹などの弱毒生ワクチンでは自然感染後と同様の機序で発生すると考えられ、不活化ワクチンではワクチンに含まれるトキシンの作用、ウイルス成分自体やワクチンに混入した神経組織成分に対する免疫反応などの機序が推定されている。現在は使用されていないSemple型の狂犬病ワクチンはヒツジ脳がウイルス基盤として用いられており、高頻度の発症を認め、病理学的にもADEM発

症との因果関係がはつきりしていたが、他のワクチンに関しては因果関係がはつきりしない場合もある。インフルエンザワクチンとの関連では、アメリカでは2003年から2005年の経鼻インフルエンザワクチンの副作用報告460例のなか、10例に神経学的合併症を認め、うち1例がADEMであったという報告⁸⁾が、日本では1994年から2004年の市販後調査で3800万回の接種のなかADEMを3例に認めたという報告がある⁹⁾。

日本脳炎ワクチンに関しては、1954年に開発されたマウス脳をウイルス増殖基材とする不活化日本脳炎ワクチンで、第3期の定期接種後の重症ADEM症例が2005年5月に予防接種法による健康被害認定を受けた直後、国は積極的勧奨を差し控え、第3期接種を中止した。マウス脳成分はngレベル以下まで高度に精製されていたのでADEMの原因になりうるという根拠は薄く、その後の調査によるリスクの推計では他のワクチンと比べとくにリスクが高いとはいえないかった。2009年6月に、マウス脳を用いないVero細胞培養由来の乾燥細胞培養日本脳炎ワクチンが市販され、定期接種のワクチンとして位置づけられた¹⁰⁾。

このように近年のワクチン改良により、ワクチン接種後ADEMの頻度は非常に低い。(表1) また、麻疹生ワクチン接種後のADEMは100万接種に1-2例の頻度で発症するが、麻疹ウイルス感染後のADEMは1000例に1例という頻度で起こると報告されており、むしろワクチン接種はADEMの発症頻度を劇的に低下させている¹¹⁾。

表1 ワクチン後ADEMの頻度 (文献4より)

麻疹 生ワクチン	1-2/1,000,000
狂犬病	
Semple型	1/300-1/7,000,
胚細胞ワクチン	1/25,000,
ヒト2倍体細胞ワクチン	<1/75,000
日本脳炎(マウス脳)	0.2/100,000 (日本) 0/813,000 (USA)
水痘	3/665,000
DPT	0.9/100,000
B型肝炎	10週以内の中枢神経感染症8例 3ヶ月以内の神經炎4例

近年の新規ワクチンの増加により、接種回数や同時接種が増加している。免疫を賦活化する回数が増加することによるADEM発症の増加の可能性に関しては今後の経過を待つ必要がある。しかし、以前より多種のワクチン接種を行っていた欧米でのADEM発症率に差がないため⁴⁾、接種回数の増加や同時接種に関して問題はないと考えられる。

平成15年から16年の全国調査ではADEM報告101例中、1ヵ月以内にワクチン接種歴があった例は15例（インフルエンザ9例、日本脳炎4例、風疹、ポリオが各1例）だった。平均発症年齢は6.7歳(1-15歳)、男児は7例(47%)、ワクチン接種から、発症までの期間は平均17.5日、後遺症遺残は2例(13%)であった。しかし、この15例中10例に先行する感染症症状を認めている¹²⁾こともあり、ワクチンとADEM発症との因果関係を特定するのは非常に困難といえる。

3. 症例

症例1 (ADEM)

けいれん発作を主訴に来院した3歳男児。家族歴は特記事項なく、既往歴には気管支喘息があった。日本脳炎ワクチン接種11日後に発熱し、3日間で軽快した。30日後に全身性強直間代けいれんを2回認め、頭痛、排尿障害、下肢の脱力があり入院した。意識は傾眠傾向にあった。血液検査では白血球22,520 / μl、CRP 3.14 mg/dlと炎症反応の上昇を認めた。尿検査に異常はなかった。髄液検査では細胞数96 / μl、蛋白33 mg/dl、MBP 348 pg/mlと上昇、オリゴクローナルバンド(OCB)は陰性であった。頭部MRIでT2強調像、FLAIR像で両側皮質下白質、側脳室周囲、右視床、右大脳脚に高信号域を認め(図2)、ADEMと診断した。mPSLパルス療法を2クール施行後、症状改善した。以降、再発なく経過しているが、注意欠陥・多動性障害で外来通院中である。

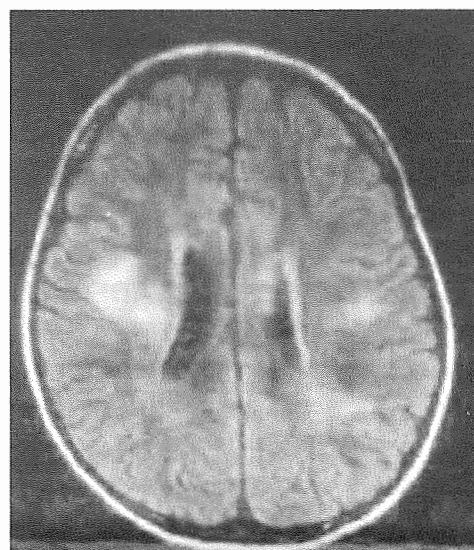


図2 頭部MRI 水平面(FLAIR像)：症例1
両側皮質下白質、側脳室周囲、右視床、右大脳脚に高信号域を認める。

症例2（視神経炎）

右視力低下で発症した7歳男児。家族歴および既往歴は特記することなし。MRワクチン接種約30日後より頭痛、嘔吐あり、40日後より右眼霧視、羞明を自覚していた。我慢していたが、55日後によく親に症状を訴え、近医眼科受診し、右眼の視力低下を認め、当院紹介入院となった。対光反射は右で鈍、視力は右0.08/左1.5、上下方向の視野欠損を認めた。他の神経学的異常所見は認めなかった。血液・尿検査は異常所見なく、髄液検査でも細胞数22 / μ l、蛋白11 mg/dl、糖54 mg/dl、MBP陰性、OCB陰性。IgGインデックスは0.46と異常はなかった。フラッシュVEP（右眼刺激）でN75のみ同定可能であったが、潜時は+3.8SDと延長していた。頭部MRIのT2強調像、脂肪抑制像で右視神経は腫脹し、軽度高信号を呈した（図3）。以上より右視神経炎と診断しmPSLパルス療法を2クール施行した。視力、視野障害は覚解し、以後再発なく経過している。

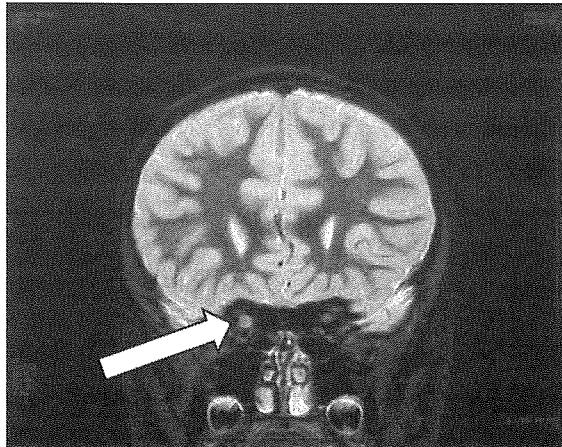


図3 頭部MRI冠状断(T2強調像)：症例2
右視神経の腫脹を認める。

症例3（脊髄炎）

下肢のしびれ、疼痛で発症した6歳女児。家族歴として両親、兄に気管支喘息と花粉症があり、既往歴として気管支喘息あり。MRワクチン接種90日後、40℃の発熱、頭痛、嘔吐および左足の疼痛が出現した。歩行困難となり近医受診し、細菌性髄膜炎の診断でdexamethasone、meropenem、ceftriaxoneが投与された。炎症反応は陰性化せず、下肢のしびれ、疼痛は強く、100日後より上肢のしびれも出現したため110日後当科に転院した。来院時、自立歩行はかろうじて可能であった。両側下肢腱反射亢進、Babinski反射、Chaddock反射陽性と錐体路徴候を認めた。

左下腿に疼痛を認めた。他の神経学的異常所見は認めなかった。血液検査で白血球11,140 / μ l、CRP 2.66 mg/dl、ESR 75 mm/hrと炎症反応上昇を認めた。尿検査は異常なかった。髄液検査では細胞数316 / μ l（多核球67%）と上昇しており、蛋白は54 mg/dl、MBP陰性、OCB陰性だった。IgGインデックスは2.8と上昇していた。頭部MRIは異常所見を認めなかつたが、脊髄MRIのT2強調像で頸髄（C2-C6）レベルで脊髄は紡錘状に腫脹し、内部に高信号域が散在していた（図4）。以上より脊髄炎と診断した。mPSLパルス療法を2クール施行後、下肢の疼痛、歩行障害は覚解し、以後再発なく経過している。

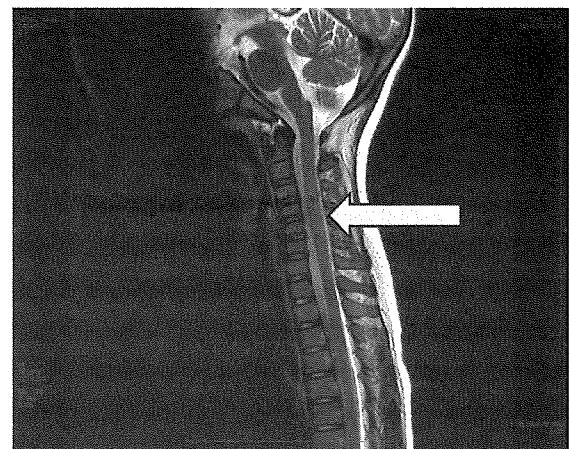


図4 脊髄MRI 矢状断(T2強調像)：症例3
頸髄C2-C6レベルに紡錘状の脊髄腫脹あり、
やや高信号域が散在する。

症例からのメッセージ

症状の訴えが乏しい例、発熱を伴わない例、意識障害が軽度の例、無菌性髄膜炎と考えられた例などでは、診断が遅れることがある。ADEMとしての治療開始が遅れることがある。ワクチン接種の既往が直近にあり、脳症症状を認めた場合、早期に頭部MRIで評価することが重要である。

また症例1では発症前に発熱した期間があり、先行感染の存在が考えられる。症例2、3はワクチン接種30日後、90日後の発症である。先行する感染症症状や、ワクチン接種から発症までの期間が長いと、ワクチンとADEM発症との因果関係を特定するのはやはり困難といえる。

4. 結語

近年のワクチン改良により、ワクチン接種後ADEM発症の頻度は非常に低いといえる。また麻疹

生ワクチン接種後のADEMは100万接種に1-2例の頻度で発症するが、麻疹ウイルス感染後のADEMは1,000例に1例と報告されており、ワクチン接種はADEMの発症頻度を劇的に低下させている。今後も重篤な脳炎やADEMの発症を予防するためにも、我々医師は、患者がワクチン接種を差し控えることのないように積極的に勧奨していく必要がある。

文献

- 1) 平野幸子：急性散在性脳脊髄炎 小児内科 vol38. 増刊号: 688-689, 2006.
- 2) Krupp LB, Banwell B, Tenembaum S: Consensus definitions proposed for pediatric multiple sclerosis and related disorders. Neurology 68:S7-12, 2007.
- 3) 宮崎千明、植田浩司、岡田賢司：AND7調査におけるADEMの特徴、厚労科学研究「ワクチンの安全性向上のための品質確保の方策に関する研究」，平成17年度研究報告書（平成18年3月）215-219.
- 4) Tenembaum S, Chitnis T, Ness J, et al: Acute disseminated encephalomyelitis. Neurology 68:S23-36, 2007.
- 5) 平野幸子：脳・神経系の画像診断 ADEM、多発性硬化症 小児科診療 第72巻:515-522, 2009.
- 6) Menge T, Kieseier BC, Nessler S, et al.: Acute disseminated encephalomyelitis: an acute hit against the brain. Curr Opin Neurol.20: 247-54, 2007.
- 7) 鳥巢浩幸、原寿郎：多発性硬化症と急性散在性脳脊髄炎 小児科 vol51: 1775-1785, 2010.
- 8) Izurieta HS, Haber P, Wise RP, et al: Adverse events reported following live, cold adapted, intranasal influenza vaccine. JAMA 294: 2720-2725, 2005.
- 9) Nakayama T, Onoda K: Vaccine adverse events reported in post-marketing study of the Kitasato Institute from 1994 to 2004. Vaccine.25: 570-576, 2007.
- 10) 宮崎千明：予防接種後神経合併症 小児科臨床ピクシス28 急性脳炎・急性脳症（五十嵐隆、塩見正司編） 中山書店、東京2011, 126-129.
- 11) Huynh W, Cordato DJ, Kehdi E, et al: Post-vaccination encephalomyelitis: literature review and illustrative case. J Clin Neurosci. 12:1315-22, 2008.
- 12) 宮崎千明、多屋馨子、岡部信彦：小児の急性散在性脳脊髄炎の疫学に関する研究、厚労科学研究「水痘、流行性耳下腺炎、肺炎球菌による肺炎等の今後の感染症対策に必要な予防接種に関する研究」、平成17年度研究報告書（平成19年3月） 185-188.

Vaccine-associated encephalitis: ADEM

TAKAYUKI KISHI, YASUSHI ITO, MAKIKO OSAWA

Acute disseminated encephalomyelitis (ADEM) is an immune-mediated demyelinating disease of the central nervous system characterized by widespread demyelination that predominantly involves the white matter of the brain and spinal cord. ADEM usually develops one to three weeks after the prior viral infection or vaccination. Viral exanthema such as measles and chicken pox are among the more common triggering factors. ADEM most often occurs in children, with an estimated annual incidence of 0.38/100,000 in Japan. The mean age at onset is 5.9 years. A male predominance has been described. Molecular mimicry is a widely accepted mechanism for the demyelination in ADEM, by which T-cell mediated autoimmunity break myelin components, such as myelin basic protein.

The characteristic MRI finding is a high signal intensity area on T2-weighted images and fluid-attenuated inversion recovery (FLAIR) images in the deep and subcortical white matter, cerebellum, brainstem and spinal cord. The typical lesions associated with ADEM are bilateral but may be asymmetrical. Diagnostic differentiation from clinically isolated syndrome (CIS), which contains the first episode of multiple sclerosis, may be difficult. CIS is defined as either a monofocal or multifocal demyelinating event in the absence of fever or symptoms of encephalopathy, and differs clinically from ADEM. Although ADEM usually has a monophasic course, recurrent or multiphasic course have been reported.

Five percent of ADEM occurs 1 to 3 weeks after vaccinations. Various preventive vaccines have been reported as a cause of vaccine-associated ADEM. The pathogenesis of attenuated vaccine-associated ADEM is thought to the same as that of ADEM after a wild-type viral infection. The pathogenesis of ADEM following inoculation with an inactivated vaccine is considered to be an immune reaction against the presence of a foreign factor such as a toxin in the vaccine. It is difficult to prove a correlation between ADEM and vaccinations when the patient had an antecedent infection or a long latency period from the vaccination to the onset of ADEM. In recent years, with the ongoing development of higher quality vaccines, the incidence of vaccine-associated ADEM has become very low. The incidence of measles vaccination-associated ADEM is about 0.1/100,000, and is thus considerably lower than the incidence of ADEM after wild-type measles encephalitis. Vaccination has dramatically reduced the incidence of ADEM. Thus, we believe that vaccination play important role in preventing the development of ADEM.

Key words: acute disseminated encephalomyelitis, vaccination,
vaccine-associated encephalitis, childhood

〈シンポジウムⅢ〉震災と感染症

東日本大震災と感染症－その概要と問題点

賀来満夫

【要旨】 2011年3月11日の地震（マグニチュード9.0）そして、その後に発生した巨大津波は、我が国の歴史上かつてなかった規模の未曾有の災害をもたらした。今回の震災によって、一次医療システムが崩壊した地域も多く、診療体制が完全には復旧しておらず、今なお、多数の住民の健康管理が不十分となりやすい状況が続いている。

発災後、1週間以降、初期の外傷に引き続き、環境からヒトへ伝播する環境微生物が原因となる破傷風やレジオネラ感染症などの発生がみられたことに加え、多数の人々が狭い空間のなかで生活を余儀なくされていた避難所などでは、インフルエンザやノロ感染症など高率にヒト-ヒト伝播する微生物が原因となった外因性感染症が発生し、規模の大きな避難所ではインフルエンザのアウトブレイクの発生がみられた。さらに、避難所では、周囲の衛生環境が悪いことに加え、水や電気などのライフラインが途絶していたため、寒さや栄養不足などからの基礎疾患の悪化に伴う続発性の感染症や不十分な口腔衛生・誤嚥などが原因となった肺炎症例などが増加し、拠点病院に搬送される患者が急増した。発災以降、大学に搬送されてきた感染症罹患者の解析では、呼吸器感染症が約7割を占め、高齢者の誤嚥性肺炎や慢性閉塞性肺疾患の急性増悪症例、肺炎球菌が原因となった細菌性肺炎症例などが多く認められた。

今回の震災は規模や被害があまりにも甚大で、被災地域が広域に及んでおり、本来、地域の一次医療を支えていた地域のクリニックや診療所などの医療施設に加え、二次医療を担当していた拠点病院も甚大な被害を受けるなど、まさに地域医療そのものが崩壊した状態となった。さらに、従来から、東北大学では大学および地域における感染症診療・感染症対策の連携をMissionとした地域感染対策ネットワークの構築に努め、感染症診療支援および感染症対策支援を実践してきたものの、被災初期には、電話やインターネットなどが全く使用できず、被災地で何が起こっているのか全く分からない状況、上下水道が使えないため、手洗いや排泄物の処理が十分に出来ない状況、電気が使えないため検査機器が使用できず、十分な検査が実施できない状況、などこれまで経験したことがない状況の中での感染症対応は困難を極めた。

今後、次第に寒さが厳しくなっていく季節を迎える中で、被災地域の環境の衛生管理、医療体制がどのような状況になっていくのか、いまだに予断をゆるさない状況にあるが、ここでは、震災時における感染症の概要について述べると共に、震災発生以後、私共が実践してきた感染症予防・診療活動、さらに今回、明らかとなってきた震災時における感染症診療、感染症対策の問題点や課題について言及を加えたい。

〈シンポジウムⅢ〉震災と感染症

東日本大震災における破傷風症例7例の検討

森野一真¹、山内 聰²、小林道生³、久志本成樹²、
山田裕彦⁴、辻本雄太¹、井上潤一⁵

【要旨】東日本大震災の津波への曝露が発生原因と考えられる破傷風は9例で、宮城県が7例、岩手県が2例であった。一つの都道府県において約一ヶ月間に7例という頻度での報告はなく、津波による増加が考えられた。本研究では9例のうち7例を詳細に検討した。平均年齢は67歳と高く、破傷風免疫歴は無いかまたは不明であった。我が国では破傷風による死亡は減少しているが、死亡の大半は70歳以上の高齢者である。破傷風はワクチンが有効な感染症であり、地震や津波による破傷風の増加が明らかである以上、これらの災害を免れることのできない我が国では抗体価の低下している30歳以上の成人、特に高齢者の免疫獲得を積極的に推進すべきである。

Key words: 破傷風、地震、津波、破傷風ワクチン

はじめに

破傷風は偏性嫌気性のグラム染色陽性の桿菌である破傷風菌 (*Clostridium tetani*) による感染症である¹⁾。端在性芽胞は熱や酸素のみならず化学物質に耐性を示す。破傷風菌は広く土壤中に常在し、家畜の腸内や糞中にも生息する。予防接種により感染予防が可能であり、1953年の破傷風トキソイド任意接種の導入、そして1968年の感染症法施行によるジフテリア百日せき破傷風混合ワクチン (DPT) 定期予防接種が開始されてからは患者数、死亡者数とも減少し、感染症発生動向調査によれば年間患者報告数は100人前後で推移している。

自然災害における破傷風の増加は海外で報告されており²⁾³⁾⁴⁾、2011年の東日本大震災においても津波への曝露が原因と考えられる破傷風が9例報告されている。このうち検討が可能であった7例について報告する。

目的

2011年の東日本大震災において津波への曝露が

原因と考えられる破傷風症例検討し、自然災害における破傷風の発症について検討するとともに、災害時における破傷風への対応のあり方について考察する。

対象と方法

対象は2011年の東日本大震災において津波への曝露が原因と考えられる破傷風症例9例のうち、演者ならびに共同演者の施設において、受診または入院治療を受けた7例である。

検討項目は年齢、性別、症状発現日、症状発現までの日数、症状、破傷風治療目的の受診日、受傷機転、創傷の有無、創傷部位、汚染創の有無、初回創処置日、*Clostridium*属、検出の有無、過去の免疫の有無、破傷風トキソイド投与と投与日、破傷風人免疫グロブリン製剤 (Tetanus Immunoglobulin、以下TIG) 投与の有無、投与開始日、投与量、Mg 製剤使用の有無、人工呼吸期間と気管切開の有無、治療内容、転機である。また、破傷風の報告件数や死者数に関しては感染症発生動向調査 (2009年2月14日現在)、厚生労働省大臣官房統計情報部「人

1：山形県立中央病院救命救急センター (〒990-2292 山形市大字青柳1800番地)

2：東北大学病院高度救命救急センター 3：石巻赤十字病院救命救急センター

4：岩手医科大学医学部救急医学講座

5：国立病院機構災害医療センター

表1 破傷風7例の内訳

	症例1	症例2	症例3	症例4	症例5	症例6	症例7
年齢	50代	60代	70代	50代	80代	60代	70代
性別	男	女	女	女	女	女	男
受傷から症状発現までの日数	8	11	11	8	11	14	20
症状	開口障害	開口障害	開口障害	開口障害	開口障害、嚥下障害、喀出困難	開口障害、発語障害	開口障害、痙攣様顔貌、軽度嚥下障害、発語障害
発語障害	開口障害、痙攣様顔貌、軽度嚥下障害	1	7	2	3	1	5
発語障害	津波	津波	津網	津波	津波の後、泥の中を歩いた	津波	津波
症状発現から治療までの日数	0	1	7	2	3	1	5
受傷機転	津波	津波	津網	津波	津波の後、泥の中を歩いた	津波	津波
創傷の有無	あり	あり	不明	あり	あり	不明	あり
創傷部位	右手指	右膝上。受傷当時は打撲痕程度のよう	足の創傷を前医で指摘されていたが受診時は不明瞭	右下腿	両側足趾にひび割れ	下肢に傷、打撲痕を認めたが、受診時には治癒	両下肢、膝蓋に挫創。周囲に腫脹あるが発赤なし
汚染創の有無	あり	あり	なし	あり	不明	なし	不明
初回創処置日	受傷翌日	受傷翌日	不明	受傷当日	不明	不明	不明
Clostridium属検出の有無	あり	なし	なし	あり	不明	不明	不明
過去の免疫	なし	不詳	不詳	なし	不明	不明	不明
破傷風ワクチン	あり	あり	あり	あり	あり	あり	あり
破傷風ワクチン投与日(受傷後)	1日目	1日目	18日目	8日目	11日目	14日目	26日目
TIG使用	あり	あり	あり	あり	あり	あり	あり
TIG投与日(受傷後)	1日目	12日目	18日目	9日目	11日目	14日目	26日目
TIG使用量(単位)	500	1500	4500(3日間)	21250(8日間)	4500	4500	4500
Mg製剤使用	不明	あり	あり	不明	あり	あり	あり
人工呼吸期間(日)	21	21	不明	24	7	なし	なし
気管切開の有無	不明	あり	あり	不明	あり	なし	なし
転機	生存	生存	生存	生存	生存	生存	生存

* TIG=Tetanus Immunoglobulin (破傷風人免疫グロブリン)

口動態統計」、厚生労働省／国立感染症研究所の感染症動向調査週報を参照した。今回、機能予後に関する検討はなされていない。

結果(表1)

症例の平均年齢は67歳(59~83歳)で、男性2例、女性5例であった。受傷機転はすべてが災害発生当日に津波に巻き込まれての受傷であった。症状発現までの期間は平均12日(8~20日)、症状発現から医療機関受診まで平均2.7日(当日~7日)であった。症状として開口障害をすべての症例に認めた。創傷部位は推定も含め下肢が6例、上肢1例で、明らかな汚染創は3名に認めたが、汚染創無し2例、不明2例であった。受傷時の創管理や薬剤投与に関しては明確な病歴の把握が困難であった。過去の破

傷風の予防接種歴なし2例、不明が5例であった。全例に破傷風トキソイドならびにTIGが使用されていた。TIGの投与量は治療期間により異なっていた。4名に人工呼吸管理がなされ、うち3例は気管切開を必要とした。硫酸マグネシウムの使用を5例に認めた。抗菌薬はペニシリンが用いられ、メトロニダゾールの使用はなかった。死亡例は報告されていない。

考察

破傷風は破傷風菌による感染症であるが、人から人への感染は認めず、ワクチンによる感染防御が可能な疾患である。破傷風菌の胞子は生体内に侵入の後に成菌となり、メタロプロテアーゼ(metalloprotease)、テタノスパスマシン(tetanospasmin)を産生する。

テタノスパスマシンは神経軸索を逆行し、脊髄や脳の神経伝達物質受容体に結合し、神経伝達を阻害する⁵⁾。

世界で年間約100万人が罹患し、特に開発途上国では新生児破傷風が問題となっている⁶⁾。ナイジェリアの病院（研修機関）における死亡率は約37%⁷⁾、インドでは約50%と依然として高いが、先進国では20%未満という報告⁸⁾があり、これらの報告ではワクチン接種率と集中治療の普及の程度、気管切開の受け入れに対する国民性などを指摘している。

1999年以降の我が国の破傷風の年間発生数は100人前後を推移し、2002年から2008年の間での死亡率は4.2%から13.2%である（表2）。また、2009年2月14日現在の感染症発生動向調査の報告数によれば、2004年から2008年にかけての死亡者の大半は70歳以上の高齢者であった。1994年から1995年に行われた年齢別抗破傷風毒素抗体保有に関する高橋らの報告⁹⁾によれば、感染防御に必要とされる0.01PAU/mlを超える抗体価を有する年齢が30歳を超えると著しく低下し、抗体陽性率が20%を下回っていた。1996年の岡田らの報告¹⁰⁾でも同様の傾向を示し、47歳以上の抗体陽性率（0.01 IU/ml以上）は10.5%と低い。一方、米国において

も65歳以上の高齢者においては50%から70%は十分な抗体価を有しないという報告¹¹⁾があり、加齢とともに抗体価は低下するため、追加免疫の重要が指摘されている。破傷風に対する能動免疫としてTIGの使用があり、対象において全例使用されていた。しかしながら、その投与量に関する基準は明確ではなく、施設間において異なっており、検討をすると思われる。Rheeら¹²⁾によれば追加免疫までの期間が10年を超える、すなわち抗体価の低下している状態である場合は創の重症度に関わらずTIGを投与すべきとされている。しかしながら災害時の被災地の状況を考慮するとTIGの十分な供給は困難であり、やはり日頃から可能なワクチン接種を積極的に推進すべきであろう。

地震や津波による災害では破傷風の発生頻度が増加する事が知られている²⁾。2004年インドネシア大津波におけるAceh州の106例の報告^{3,4)}によれば、発症時期の最頻値は災害発生後約2週で、ピーク時は1週間に10例の発症を認めている。死亡は20例（18.7%）であった。破傷風の発生頻度の増加は津波により汚染された土壤と接触する機会の増加が一因であると思われる。厚生労働省／国立感染症研究所感染症情報センターによる感染症発生動向調査をもとに検討したところ、東日本大震災において発生した9症例の居住地の内訳は宮城県7例、岩手県2例、本研究における対象は宮城県5例、岩手県2例である。過去の感染症動向調査では全国の一ヶ月の発生報告件数として7例を超える場合はあるものの、一つの都道府県において約一ヶ月間に7例の報告という頻度は見当たらず、津波により発生数が増加したものと考えられた。

症状発現の最頻値は受傷後11日（3例）であり、Aceh州に似た傾向を認めたが、死亡例は無かった。症状発現から治療のための医療機関受診までに平均2.7日を要しており、最長は7日であった。患者自身が破傷風の症状として自覚できずに医療機関への受診が遅れる可能性はあるものの、災害時の医療機関への受診が困難となることに起因している可能性もある。破傷風は受傷から発病までの期間と症状発現から筋強直までの期間が短い程予後が不良とされており¹³⁾、発症からすみやかに治療が開始されるべきである。救護班による巡回診療等において、破傷風を疑う症状のスクリーニングや避難所への啓蒙も考慮すべきであろう。

今回の対象症例では過去の破傷風の予防接種歴が無いかまたは不明で、かつ感染症法による定期予防接種施行前に生まれた高齢者に多く発症しているこ

表2 年別破傷風報告件数と死者数

年	報告件数	死者数	死亡率(%)
1999	65	10	15.4
2000	91	10	11
2001	80	12	15
2002	106	9	8.4
2003	73	7	9.6
2004	101	9	8.9
2005	115	7	6
2006	117	5	4.2
2007	89	7	7.9
2008	124	7	5.6
2009	113	9	8.0
2010	106	14	13.2
2011	111	Unknown	ND

(注)以下の3つの統計をもとに作成

感染症発生動向調査：2009年2月14日現在
厚生労働省大臣官房統計情報部「人口動態統計」
厚生労働省／国立感染症研究所 感染症動向調査週報
1999年の症例数は4月から12月の間、2008年の死亡者数は1月から9月の間の統計資料。

とから抗破傷風毒素抗体陽性とされる0.01IU/ml未満の抗体価であった可能性が高い。我が国は今後も地震や津波を免れることはあり得ない。よって感染症法による定期予防接種施行前に生まれた年代、特に死亡者の大半を占める70歳以上の高齢者、次いで抗体価の低下する30歳以上の成人に対し、破傷風ワクチン接種による積極的な免疫獲得政策を実行することは自然災害における破傷風の予防に繋がることは間違いない。

7例の創傷部位は推定も含め下肢が6例と多く、浸水の影響を受けやすい部位からの破傷風菌の侵入が推測された。破傷風に罹患しやすい創傷は組織の低酸素をきたす創傷で、挫滅創、壊死創、土砂や鋸による汚染創、解放骨折、穿刺創、膿瘍などが挙げられるが、今回の症例には汚染創の無い症例や受診時に創傷の特定が難しい症例も存在し、破傷風の発症因子は創傷の重症度のみではないというRhee¹²⁾らの勧告を支持するものであった。受傷時の初診医療機関あるいは救護所での創管理の詳細は不明であるが、十分な洗浄等を行える環境ではなかった可能性が高く、災害時の適切な創傷管理の難しさがうかがわれる。細菌学的検討ではClostridium属の検出を2例に認めたが、Clostridium tetaniの同定には至っていない。

病型と臨床経過に関する検討は十分とはいえないが、人工呼吸を要した症例が5例ということから、全身型が5例、局所型が2例と考えられる。人工呼吸を要した5例のうち3例は気管切開が行われている。Thiagoら¹⁴⁾やHsuら¹⁵⁾によれば気管挿管は喉頭ならびに全身の痙攣の増悪を招くため、早期の気管切開による気道確保を勧めている。

本研究での対象症例は破傷風ワクチンとTIGの投与、外的刺激の回避（照明や騒音の制御）、適切な呼吸管理、鎮静、筋弛緩等の一般的な破傷風に対する治療がなされ、集中治療を要した症例においても循環動態維持や自律神経機能維持に難渋した症例は幸い報告されていない。近年、破傷風による自律神経障害に対し、硫酸マグネシウム^{16,17)}が使用されることが多いが、対象の5例に使用され、治療に難渋する症例が無かった事から有用である可能性がある。一方、破傷風に対する抗菌薬の第一選択とされるメトロニダゾール¹⁸⁾は使用されず、ペニシリン製剤が用いられていた。メトロニダゾールの静注用製剤の未承認の影響と考えられる。

結語

東日本大震災の津波への曝露により破傷風の発生数は増加した。我が国では破傷風による死者数は減少しているが、死亡の大半は70歳以上の高齢者である。破傷風はワクチンが有効な感染症であり、地震や津波を免れることのできない我が国では抗体価の低下する30歳以上の成人、特に高齢者の免疫獲得を積極的に推進すべきである。

参考文献

- Cook T, Protheroe R, Handel J : Tetanus: a review of the literature. BJA 87:477-487, 2001.
- Programme on Disease Control in Humanitarian Emergencies Communicable Diseases Cluster by WHO : Communicable diseases following natural disasters Risk assessment and priority interventions. : 8, 2006.
- Aceh epidemiology group : Outbreak of tetanus cases following the tsunami in Aceh province Indonesia. Global Public Health 1:173-177, 2006.
- Responding to Communicable Diseases following the Tsunami in South-East Asia by WHO : 15-16, 2005.
- Burtis DB, Dobbs MR : Tetanus toxin. Clinical Neurotoxicology, MR Dobbs(ed) Saunders Elsivier, Philadelphia, 2009, pp427-435
- Pascual FB, McGinley EL, Zanardi LR, et al : Tetanus surveillance—United States, 1998-2000. MMWR Surveill Summ. 52 : 1-8, 2003.
- Ojini FI, Danesi MA : Mortality of tetanus at the Lagos University Teaching Hospital, Nigeria. Trop Doct 35 : 178-81, 2005.
- Oladiran I, Meier DE, Ojelade AA, et al : Tetanus: continuing problem in the developing world. World J Surg. 26 : 1282-12855, 2002.
- Takahashi M, Komiya T, Fukuda T et al : A comparison of young and aged populations for the diphtheria and

- tetanus antitoxin titers in Japan. Jpn. J. Med. Sci. Biol. 50 : 87-95, 1997.
- 10) Okada K, Ueda K, Morokuma, et al: Seroepidemiologic Study on Pertussis, Diphteria, and Tetanus in the Fukuoka Area of Southern Japan: Seroprevalence among Persons 0-80 Years Old Vaccination Program. Jpn J Infect Dis 57: 67-71, 2004.
- 11) Alagappan K, Rennie W, Narang V, et al : Immunologic response to tetanus toxoid in geriatric patients. Ann Emerg Med 30 : 459-462, 1997.
- 12) Rhee P, Nunley MK, Demetriades D et al: Tetanus and trauma: a review and recommendations. J Trauma 58 : 1082-1088, 2005.
- 13) Farrar JJ, Yen LM, Cook T, et al : Tetanus. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 69:292-301, 2000.
- 14) Thiago L, Yeh-Li H, Gustavo THF, et al : Guidelines for the management of accidental tetanus in adult patients. Rev Bras Ter Intensiva. 23(4):394-409, 2011.
- 15) Hsu SS, Groleau G : Tetanus in the emergency department: a current review. J Emerg Med. 20 : 357-65, 2001.
- 16) Lipman J, James MF, Erskine J, et al: Autonomic dysfunction in severe tetanus: magnesium sulfate as an adjunct to deep sedation. Crit Care Med 15:987-988, 1987.
- 17) Thwaites CL, Yen LM, Loan HT, et al: Magnesium sulfate for treatment of severe tetanus: a randomised controlled trial. Lancet 368:1436-1443, 2006.
- 18) Ahmadsyah I, Salim A: Treatment of tetanus: an open study to compare the efficacy of procaine penicillin and metronidazole. Br Med J(Clin Res Ed) 291:648-650, 1985.

The analysis of seven tetanus cases in the 2011 Tohoku earthquake and tsunami

Kazuma Morino¹, Satoshi Yamanouchi²,
Michio Kobayashi³, Shigeki Kushimoto²,
Yasuhiko Yamada⁴, Yuta tsujimoto¹, Junichi Inoue⁵

[Summary] We had nine tetanus cases by the exposure to the 2011 Tohoku earthquake and tsunami. Miyagi prefecture had seven patients, Iwate prefecture had two. As for seven cases in Miyagi, the increase of tetanus was caused by the tsunami because this is the biggest number in one metropolis during a month until now. We analyzed seven of nine cases. The average age was 67 years old and they had no tetanus immunization history or unclear. The deaths due to tetanus had decreased in Japan, but most of death is an elderly person 70 years or older. Our country will not be able to avoid an earthquake and the tsunami and we have the fact that tetanus increase caused by these disasters. Tetanus is the infectious disease that vaccine is effective. So 30 years or older adults beginning to fall

Key words: tetanus, earthquake, tsunami, tetanus vaccine

1 : Yamagata Prefectural Medical Center for Emergency
(1800 Aoyagi Yamagata City Zip 990-8520)

2 : Tohoku University School of Medicine, Division of Emergency Medicine

3 : Ishinomaki Red Cross Hospital Emergency Medical Center

4 : Iwate Medical University, Division of Emergency Medicine

5 : National Disaster Medical Center

〈シンポジウムⅢ〉震災と感染症

震災時の感染症対策 ～スマトラの経験を東日本大震災に生かす～

加來浩器

【要旨】 東日本大震災では、避難所での感染症の早期発見が極めて重要であった。著者は、2004年のスマトラ島津波災害での国際緊急援助活動の経験から、岩手県でスマートフォン端末を用いた症候群サーベイランスを提案し、岩手医大が中心となった感染制御活動 (ICAT) の支援を行った。迅速性と品質管理のために集計データを一日に3回アップデートさせ、前回よりも異常の数値が報告されるとICATを通じて現地担当者に確認してもらった。サーベイランス結果は、その日のうちにインターネット上のグーグルマップで確認できるので、自施設のみならず近接施設の状況も把握できる。またICATの活動場所を直接・間接的に誘導することも可能である。

Key words: 東日本大震災、症候群サーベイランス、スマートフォン

近年、世界各地で発生している自然災害は、その規模及び頻度とともに増大傾向にあるが、2011年3月11日に東北3県の沿岸部に発生した東日本大震災は、死者・行方不明者の合計が19,000名（2012年3月警察庁発表）、避難者総数が30～40万人という未曾有の大災害となった。発災直後から全国からの精力的な医療支援が行われたが、阪神淡路大震災の教訓により発足したDMATによる救急救命医療よりはむしろ、破壊された医療の補填が求められた。学校、体育館、集会所などでの避難生活は、劣悪な環境下での集団生活となるため、ひとたび感染症が発生するとそのコントロールが困難となることが予測された。またこれらの感染症の一部は、他の地域へと伝播・拡大することも懸念されるため、感染症の発生を的確に把握するシステムの構築が重要となる。

世界保健機関 (WHO) は、21世紀の新しい感染症対策の一環としてGOARN (Global Outbreak Alert Response Network) を構築して、SARSや新型インフルエンザなど新興・再興感染症へ適切に対応できるような体制をすすめているが、近年ではバイオテロや大規模自然災害後の感染症への対応に応用されるようになった。2004年12月に発生したスマトラ島沖地震・津波災害では、破傷風、コレラ、赤痢、麻疹、マラリア、髄膜炎等の流行が懸念され

たことから、WHOがインドネシアの公衆衛生当局をサポートして症候群サーベイランスを行った。このサーベイランスの目的は、公衆衛生的対応を必要とするようなアウトブレイクを早期に発見し、かつ現地での諸活動を評価するためであり、登録された医療チームが1週間分の診療実績を紙又はメールで報告すると、その結果を週2回開催されるミーティング時にグラフとマップで公表するというものである。当地では、公衆衛生に係る情報が乏しいなか、唯一有用な情報であることから、日本からの派遣団体である陸上自衛隊及びJICAの国際緊急援助隊も本システムに協力した（図1）。ただしこれらのデータを解釈する際には、①医療チームの数や活動性の影響を受ける、②VIPの来訪やマスコミ取材が行われると報告数が増える、③報告遅れが起こる、④避難者の移住によって地域別発生状況が変化する、⑤1人の患者が複数の施設を渡り歩くいわゆる“ドクターショッピング”的実態がある、⑥住民の中にはある程度症状が進展しないと受診しない者がいる、などの影響を考慮する必要があり、そのままのデータから真のアウトブレイクを探知することは困難である（表1）。

このスマトラでの経験から、アウトブレイクの早期発見のためには、(1) 診療実績の解析でなく避難所

  疾病発生・死亡者統計週報 Outpatient Mortality and Morbidity Weekly Surveillance	
・目的 アチエ州14地区からの疾病発生・死亡者統計を解析し、公衆衛生的対応を必要とするようなアウトブレイクの早期発見、諸活動評価の資とする。	
・サーベイランスの対象疾患 (症候群サーベイランス+疾患サーベイランス)	
<ul style="list-style-type: none"> - 急性水様性下痢 - 血性下痢 - マラリア(確定例) - 38°C以上のその他の発熱 	<ul style="list-style-type: none"> - 麻疹(疑い例を含む) - 急性呼吸器感染症 - 急性黄疸症候群 - 髄膜炎
・報告 <ul style="list-style-type: none"> - ペーパー又はメール - 前週の月曜から日曜までのデータを毎週月曜日 - 事前に登録された、医療機関(国内外のNGO、国際機関など) 	

図1 WHO主導で行われた感染症サーベイランス

表1 データ解析時の留意事項

- | |
|---|
| ・医療支援チーム側 <ul style="list-style-type: none"> ・医療チームの数・活動場所/期間/内容が変化 ・VIPの来訪やマスコミ取材等に影響 ・しばしば報告遅れ |
| ・被災民側 <ul style="list-style-type: none"> ・避難者の移住によって地域別発生状況が変化 ・“ドクター・ショッピング” ・ある程度症状が進展しないと受診しない |

で直接健康状態を把握すべきである、(2)週報よりも日報にすべきである、の教訓を得ることができた。サーベイランスに従事するボランティアの参画意欲を高い状態に維持するためには、データを即日に還元することや、介入が必要なときには迅速な対応することが重要であろう。

そこで著者は、東日本大震災における岩手県に対して、避難所での症候群サーベイランス(DSOD: Daily Surveillance for Outbreak Detecting)を提案し、岩手医大の櫻井滋医師が中心となって進めていたいわて感染症制御支援チーム(ICAT: Infection Control Assistance Team of Iwate)による感染制御活動を支援することになった。

DSOSは、東北地方(場所)、季節性(時)、津波被災(ヒト)の特性を考慮し、8つの症候群(①胃腸症状、②呼吸器症状、③発疹・粘膜症状、④神経・筋症状、⑤皮膚・軟部組織感染、⑥黄疸、⑦インフルエンザ様症状、⑧死亡)を避難所毎に把握するものである。NTTドコモから提供を受けたスマートフォン端末から各症候群の発生数を入力すると、集

計結果をインターネット上のグーグルマップ(地図情報)で確認できるもので、世界初のITを駆使した産官学共同のシステムと言える(図2、図3)。迅速性と品質管理のために、データを一日に3回アップデートすることに留意し、集計の段階で異常が判明するとICATに通報し、現地のボランティア担当者に確認してもらった。インターネットを用いることで、自施設のみならず、近接施設の状況が把握できる、ICATの活動を直接・間接的に支援できる、ICATの活動成果等を県対策本部のホームページで公開できる等の利点が得られた。

DSODは、2011年4月13日から大規模避難所が閉鎖された同年8月16日までの127日間に、延べ1661施設(延べ232,149名)のサーベイランスを行い、ICATは延べ200施設への定期巡回指導等を行った。この期間、岩手県全体として30人規模のインフルエンザ等の小流行が2回起きたが、大規模なものに至らずに済んだことに、DSODとICATの活動が少なからず寄与できたものと考えている。

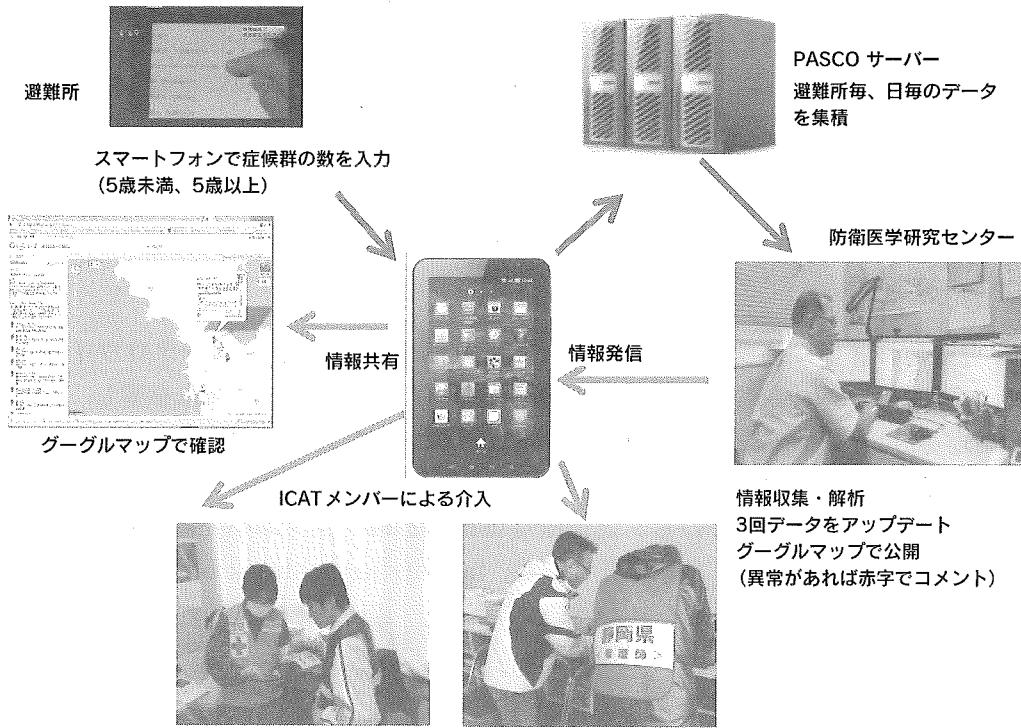
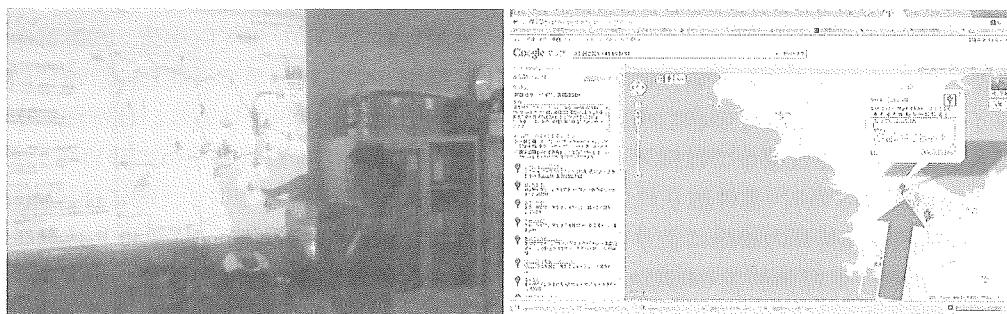


図2 スマートフォンを活用した感染症サーベイランスと感染制御活動



- 1 集計の段階で異常を検知し赤文字でコメント
- 2 自施設のみならず、近隣施設の状況が把握できる
- 3 ICATの活動を直接的・間接的に支援できる
- 4 活動内容・成果を県対策本部ホームページで公開

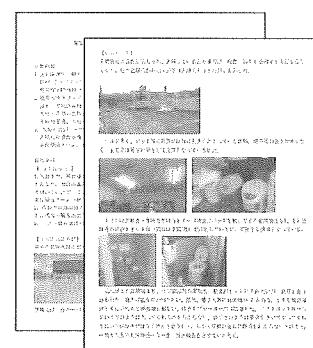


図3 インターネットを活用した情報発信・情報共有

〈シンポジウムIV〉 急性脳炎・脳症

小児の脳炎・脳症

塩見正司

【要旨】 小児の急性脳炎にはウイルス性脳炎として単純ヘルペス脳炎、エンテロウイルス71脳炎などがあり、マイコプラズマ脳炎は急性散在性脳脊髄炎(ADEM)に似た画像を呈し、免疫介在性脳炎が疑われる。免疫介在性脳炎ではADEMが多いが10代にはNMDA受容体脳炎も多い。わが国で1980年代から難治頻回部分発作重積型脳炎(AERRPS)が知られていた。AERRPSは感染後脳炎であり、成人例もみられると考えている。急性脳症は日本と東アジアの小児に多く、欧米の報告は少ない。けいれん重積型急性脳症、急性壊死性脳症、hemorrhagic shock and encephalopathy、急性脳腫脹型などに分類される。

1.はじめに

小児の急性脳炎・急性脳症は「脳炎・脳症」という表現で区別ができない病気としてとらえられてきた。しかし、インフルエンザ脳症など、日本の小児にウイルス感染に合併する急性脳症が多発することから急性脳症の研究がすすみ、MRIの撮像法の進歩などにより、急性脳症に複数の病型が見出されてきた。その結果として、インフルエンザ脳症研究班によるガイドライン第2版¹⁾では脳症の病型別診断の重要性が強調されている。急性脳炎では欧米と同じく、単純ヘルペス脳炎(HSVE)、急性散在性脳脊髄炎(ADEM)、神経細胞表面抗体の検出により明らかとなった抗NMDA(NR1)受容体脳炎(NMDARE)などが多いが、我が国的小児科医に1980年代から存在が知られていた脳炎の特殊型である難治頻回部分発作重積型脳炎(AERRPS, acute encephalitis with refractory repetitive partial seizures)については、漸く2000年以後欧米からも類似の疾患が報告されてきている²⁾。急性脳症の各病型と個々の急性脳炎の正確な診断は、病因因子の研究、治療法の研究を進める上でも基本となるものである。病歴・診察所見、MRIや血液・髄液検査、ウイルスや細菌検査、長時間脳波検査、特殊な抗体検査、有機酸分析やアシルカルニチン分析などによる代謝異常の否定、な

どの結果から、急性壊死性脳症(ANE)やADEMなどの診断に至れば、自ずと脳症と脳炎の区別が明らかとなる。地域の脳炎・脳症の主として詳細な微生物検査を実施しているカリフォルニア脳炎プロジェクト(CEP)は多数例の調査から脳炎・脳症を脳炎・脳症全体の臨床像からの分類が試みられ、限局型として、①側頭葉、②錐体外路、③小脳、④水頭症、全汎型として、⑤び慢性脳浮腫、⑥麻酔を要する難治性痙攣、⑦主に痙攣で発症し、急速に回復、⑧精神症状で発症、⑨再発性あるいは慢性の中枢神経の炎症、⑩多発する白質病変、に分けている³⁾。この中の⑥はAERRPSに類似し、⑧にはNMDAREが含まれ⁴⁾、⑤はインフルエンザやヒトメタニューモウイルスなどの感染に伴う急性脳症が推測されるが、日本の小児に多いANEやけいれん重積型急性脳症(AEFCSE)への言及はなく、大きな人種差がみられる。

小児の急性脳炎

- 1) 免疫介在性脳炎：ADEM、抗NMDA受容体脳炎、AERRPS、などが多い。
 - (1) ADEM：多発性硬化症の早期診断・治療が予後を改善することから、小児のADEM、clinically isolated syndrome(CIS)や視神経脊髄炎(neuromyelitis optica)などの鑑別が重視されている⁵⁾。脱髓病変の分布による

ADEMの分類、再発・再燃例の分類など、細かく定義されるようになった。ADEMの症例数は多く、ステロイドパルス治療、大量免疫グロブリン療法、血漿交換療法などが有効である。ADEMは感染や予防接種後に発症し、細胞性免疫の関与が推定されているが、自己抗体などの特異的なマーカーは不明であり、MRIのFLAIR画像で診断しているのが現状である。

- (2) 抗NMDA受容体脳炎(NMDARE)：亀井らが臨床的観察から独立した脳炎として提唱し

た acute juvenile female non-herpetic encephalitis (AJFNHE) は Dalmau らの細胞表面抗体である抗NMDA受容体抗体陽性の脳炎と見事に一致し⁶⁾、卵巣奇形腫を有する例が多く、日本の若年女性に多発するが、小児例も多く、小児では腫瘍の合併は少ないことが明らかとなった⁴⁾。呼吸障害や激しい不随意運動の治療に集中治療を要することが多い。大阪市立総合医療センターの小児症例を表に示す。10代の症例が多い。

- (3) 難治頻回部分発作重積型急性脳炎(Acute encephalitis with refractory, repetitive

表1 抗NMDA受容体脳炎5例と同抗体陰性卵巣奇形腫・囊腫合併脳炎1例

症例	1	2	3	4	5	6(抗体-)	まとめ (中央値)
年齢/性	16/F	14/F	14/F	13/M	13/M	14/F	M:F=2:4 14歳
年月	[REDACTED] 4	[REDACTED] 7	[REDACTED] 6	[REDACTED] 7	[REDACTED] 12	[REDACTED] 7	
先行疾患	感冒	髄膜炎	感冒	頭痛	微熱	頭痛	
神経症状発症まで	15日	9日	6日	15日	2日	4日	7.5日
精神症状	+	+	+	+	+	+	6/6
口部不随意運動	+	+	+	+	+	+	6/6
けいれん	+	+	-	+	重積	+	5/6
人工呼吸	+	+	-	+	+	-	4/6
発症から人工呼吸	16日(気切)	24日(気切)	-	8日	8日	-	
髄液ネオプテリ ンnmol/m	152.1	NT	348.1	NT	173.3	490.1	4/4
オリゴクローナルバンド	-	+	+	-	-	+	3/6
MRI	右側頭葉 左海馬	正常	正常	正常	小脳高信号 →萎縮	正常	2/6
卵巣囊腫 (腹部MRI)	+ (50月後 切除、奇形腫)	+	+ (16月後 切除、奇形腫)	NT	NT	+	4/4(女)
副腎皮質ステロイド	+	+	+	+	+	+	6/6
ガンマグロブリン	+	+	-	-	-	-	2/6
発症から退院	99日	114日	67日	74日	108日	53日	86.5日
予後	短期記憶・漢字 書字読字障害	正常	正常	正常	軽度知能 低下	正常	2/6 (後遺症)

partial seizures (AERRPS)：栗屋と福山は1986年脳炎・脳症の後遺症としてのてんかんの発症形式に2通りあり、多くは急性期から数ヶ月の間隔をおいててんかんを発症するが、一部には、急性期から、けいれんが多く、そのままてんかんに移行する症例の存在に気付き、「特異な脳炎・脳症後のてんかん」として報告した⁷⁾。われわれは急性期に部分けいれんが頻回に繰り返し、深いバルビタール昏睡を維持が必要な症例を「頻回けいれんを特

徴とする脳炎」として報告した⁸⁾。佐久間らは両者を同一疾患であるとして、AERRPSとよんだ⁹⁾。AERRPSは幼児～学童期に多いが、成人にもみられ、インフルエンザなど感染症発症後1週間前後で発症する症例があること、髄液細胞数が増加している症例があること、発熱が1カ月以上持続する例がある、髄液ネオプテリーンは著増していることから、感染後脳炎あるいは免疫介在性脳炎と考えている。急性期に頻発する難治な部分発作がそ

- のまま難治性てんかんとして持続する経過が特徴である。一部には経過中に両側の海馬、視床、島回、前障などにT2WI、FLAIRなどで高信号がみられる症例がある。2000年以降欧米から類似の報告が相次ぎ、FIRES(fever induced refractory epilepsy syndrome)などと報告されている²⁾。FIRESは学童期に多く、けいれんの経過は同様で、画像異常、軽微な髄液所見なども類似しているが、頻回にけいれんが反復する時期には発熱はないとされる。FIRESはウイルス学的検査、抗NMDAR抗体などの神経細胞抗体、いろんな自己抗体、オリゴクローナルバンドは陰性とされる。生検例や剖検例では脳に炎症所見はなく病気の本体は脳炎ではなく、発熱に伴って発症した特殊なてんかんであるとされる。髄液ネオプテリンなどのサイトカインは高値で脳に炎症が存在するが、炎症は外傷やけいれん自体でも生じることから、FIRESは非感染性、非自己免疫性の炎症で、炎症とけいれんの悪循環が存在するとする仮説がある¹¹⁾。例外もあるが、遺伝子検査では既知のてんかん関連遺伝子異常は見出されていない。最近、Suleimanらは小児のけいれん重積を伴う脳炎症例の血清中にLgi1抗体とCaspr2抗体ではないVGKC抗体が検出されるとする報告がある¹⁰⁾。成人にみられるLgi1抗体による辺縁系脳炎とは異なったVGKC抗体がAERRPS/FIRESの原因である可能性がある。本邦の過去の文献中にAERRPSの成人例が疑われる報告があり、「非ヘルペス性辺縁系脳炎」の中で早期から頻回に反復する痙攣重積症があり、バルビタール療法が必要で、海馬、島回付近に高信号がある¹²⁾¹³⁾、などの症例はAERRPS/FIRESの可能性が高いと考える。
- 2) ウィルス性脳炎：HSVEが最も多く、小児では新生児・乳幼児に多く、予後不良例が多い。手足口病の原因ウイルスであるエンテロウイルス71は乳幼児に中脳・小脳・脳幹脳炎(菱脳炎)を生じ、重症例では延髄網様体の病変と神經原性肺水腫・ショックとなり、短時間で死亡することが少なくない¹⁴⁾。日本脳炎はインドから中国にかけて多発しているが、日本では一時期予防接種の勧奨が控えられたが、現在のところ、小児例の発症はわずかである。EBウイルス、CMV、HHV6などのヘルペスウイルスは持続感

染するので髄液から検出された場合、脳炎の原因であるかどうかは、ウイルス量や病態を考慮して、慎重に判断する。例えば、HHV6は初感染時には急性脳症のAEFCSEとANEを生じることが稀でないが、この場合はウイルスDNA量は血漿中に大量、髄液中は微量である、一方、骨髓移植後に生じることの多いHHV6脳炎ではHHV6ウイルスDNAは髄液中に大量に検出される。

3) マイコプラズマ脳炎

急性マイコプラズマ感染症に伴う脳炎(ペア血清で抗体価の4倍以上の上昇、または、喀痰などからの肺炎マイコプラズマの培養または遺伝子の検出)と定義されるべきである。2010年から2011年にマクロライド耐性マイコプラズマ肺炎が流行しているが、マイコプラズマ脳炎の報告も増加しているようである。MRIでは両側視床病変を生じる症例(図2)、白質病変を生じる症例、血管炎による脳梗塞例など、多彩である¹⁵⁾。CEPはエンテロウイルスやマイコプラズマ感染¹⁶⁾に伴う脳炎について報告している。とくに後者は脳炎を合併する感染症として最も多いとするが、信頼性が低い単一血清のマイコプラズマIgM抗体陽性を診断根拠にしており、再検討が望まれる。

4) 小児急性脳炎の頻度

大阪市立総合医療センターでは2002~2008年の8年間でADEM 24例、NMDARE 5例、AERRPS 6例、単純ヘルペス脳炎 6例の入院があった。

2. 小児の急性脳症

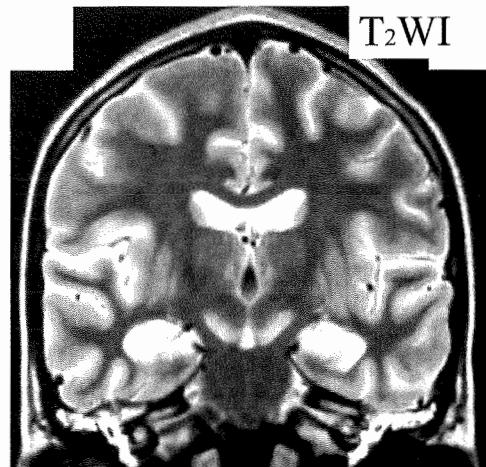


図1 インフルエンザAH1に合併した頻AERRPS(11歳、女)
両側海馬、黒質、前障に高信号をみるとめる

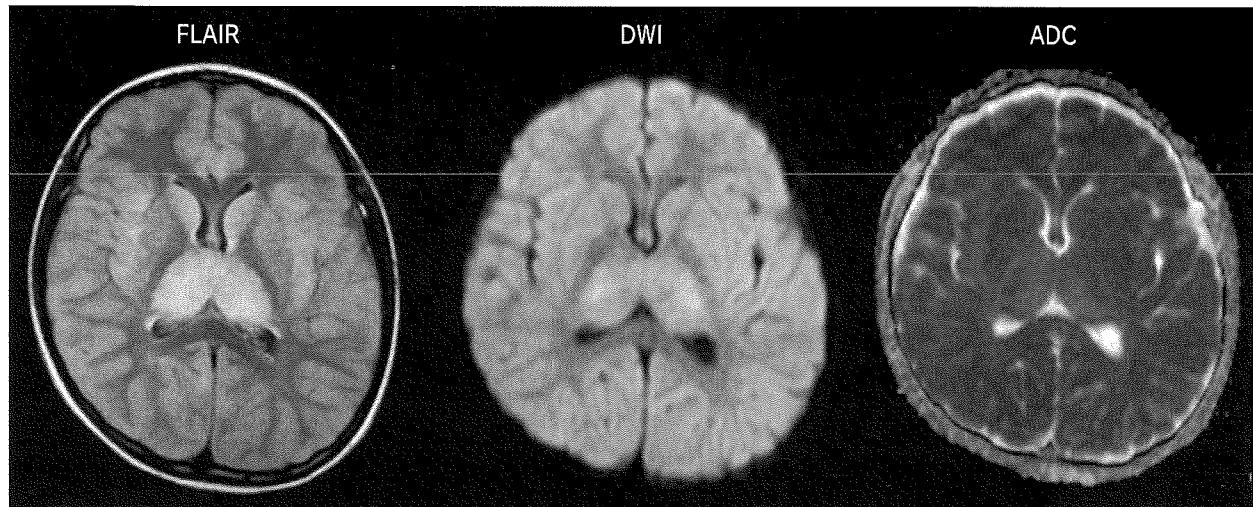


図2 マイコプラズマ脳炎 頭部MRI(第3病日) 9歳 女児
両側視床にFLAIRで高信号、DWIで一部高信号、DWIで一部低信号がみられ、治療により正常となった。

2) ウイルス感染とともに急性脳症

我々は急性脳症予後不良例について、1) Hemorrhagic shock and encephalopathy syndrome(HSES)、2) 急性壊死性脳症 (acute necrotizing encephalopathy of childhood(ANE)、3) けいれん重積型急性脳症 ((acute encephalopathy with febrile convulsive status epilepti(AEFCSE)、遅発性拡散低下をともなう脳症AESDともいう)、4) 急性脳腫脹型 (acute brain swelling) に分類している¹⁷⁾。HSES、ABSについては、研究者間での検討が必要である。ABSはインフルエンザ罹患中、入眠前は意識障害がなかったが、睡眠中に死亡し、剖検で著しい脳腫脹がみられる症例が多発したことから考え出した病型である。インフルエンザH1N1(2009)では小児の死亡41例中15例が予期せぬ急死であった。ABSは糖尿病性ケトアシドーシスなどの可逆性脳浮腫と同様に脳ヘルニアから死亡に至る場合、後遺症なく治癒する場合があると考えている。

AEFCSEは発熱を伴う持続型けいれん重積に伴うことが多い脳症である¹⁸⁾。小児ではhemiconvulsion hemiparesis (epilepsy) 症候群HHの存在が知られていたが、AEFCSEはHH症候群を包含するが、病変分布としては両側前頭葉など複数の脳葉の広がりによよそ一致する病変が特徴的である。熱性けいれんと好発年齢とインフルエンザや突発性発疹症(HHV6初感染)などの発熱原因と重なり、後遺症を遺した熱性けいれん重積症とも考えられる。海外ではHH症候群はあってもAEFCSEは日本人に特異的な脳症であるという論調が多い。AEFCSEは発熱に伴うけいれん重

積ではじまり (early seizure)、止痙後は軽微な症状が数日あり、再び数分の部分けいれんが多発し (late seizure)、神経症状が悪化するという、二相性経過をとることがおおく、MRIの拡散強調画像法(DWI)でlate seizureの時期にはじめて罹患脳葉の皮質下白質が樹枝状の高信号を呈し (図3) (bright tree appearanceBTAと呼ぶ)BTAはlate seizure出現時にみられ、数日間で不明瞭となるので、撮像時期が重要である。BTA類似の所見は新生児仮死、乳児硬膜下出血によるけいれん重積などでもみられ、不完全な虚血に伴う遅発性神経細胞死を示していると考えている。発熱時のけいれんでは神経細胞のエネルギーのdemandは増え、supplyが低下するとけいれん中の神経細胞が虚血状態になると想像される。AEFCSEは発熱と持続型けいれん重積のあとに生じるので、Dravet症候群では稀ならずみられ、他のてんかんを持つ小児でも生じことがある。テオフィリン服用中の発熱に伴うけいれん重積ではAEFCSEが生じやすく、このことから乳幼児へのテオフィリン投与は大きく制限されるようになった。テオフィリンはアデノシン受容体を介してアデノシンの止痙作用を阻害し、脳血流を低下させることが原因と思われる。成人症例の報告もある¹⁹⁾。エネルギーのsupply低下としては低血糖時のけいれん重積にAEFCSE同様の病態が生じうる。また細菌性髄膜炎に合併する脳血管炎のため血流低下が生じ、さらにけいれん重積が生じると血管分布に一致しない広範な病変が生じ、これもAEFCSE類似の病態を考えられる。すなわちAEFCSEはけいれん重積による神経細胞傷害の典型をみていると考える。

MERSは高梨らが報告した予後良好な脳炎・脳症である²⁰⁾。DWIで脳梁膨大部に高信号を生じる疾患は抗てんかん薬の副作用などがあげられていたが、高梨は予後良好な脳炎や脳症で多くみられることを報告した。インフルエンザの異常言動、細菌性髄膜炎、ブドウ球菌性 toxic shock syndrome、軽症下痢に合併するけいれん、など

でもみられ、特定の脳症とはとらえ難いが、大半が予後良好であるという点で有用な画像所見である。ロタウイルス小脳炎では初期に脳梁膨大部の高信号、数日後に小脳病変が出現するという経過が明らかとなり、MERSにも後遺症例が存在することが明らかとなつた。

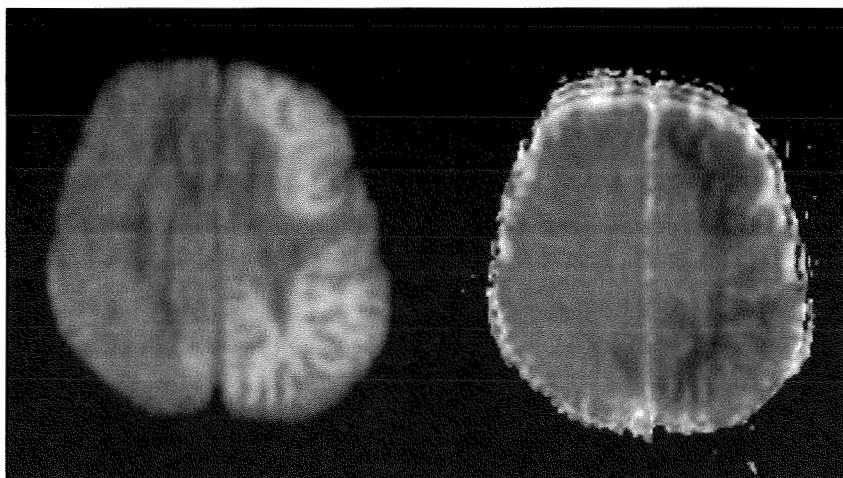


図3 けいれん重積型急性脳症 第4病日

2) 小児急性脳症の病型別、原因病原体別の頻度について

1999～2008年の10年間に大阪市立総合医療センターに入院した、予後不良な小児急性脳症80例について、検討した。HSESは22例、男性12例、年齢中央値1歳6ヶ月、慢性神経疾患が8例36%であり、10例46%は死亡した。病原体は9例で判明し、インフルエンザ、HHV6、ノロウイルスが各2例、ロタウイルス、ヒトボカウイルス、アデノウイルス3型が各1例であった。ANEは5例でインフルエンザ4例、HHV6 1例であった。AEFCSEは34例で男性22例、年齢中央値1歳4ヶ月、テオフィリン内服例10例29%、インフルエンザ7例21%、HHV6 11例32%、ロタウイルス、ヒトメタニューモウイルス、RSウイルス、インフルエンザ菌髄膜炎(Hib)各1例、不明12例であった。

3) その他の急性脳症

細菌性食中毒に伴う急性脳症として、サルモネラ感染に伴う脳症、腸管出血性大腸菌に伴う脳症(HUSを合併)、セレウス嘔吐毒(セレウリド)による脳症があり、いずれも予後不良例が少なくない。セレウス嘔吐毒(セレウリド)による脳症は、著者らがわが国ではじめて報告したが²¹⁾、ほとん

どは調理後長時間室温におかれた炒飯を原因とし、セレウリドというミトコンドリア毒による急性脳症という点でReye症候群類似の病態と考えられ、など、興味深いが、幸いにも報告数はすくない。ほかに、百日咳脳症や猫引っかき病に伴う急性脳症の報告が散見されるが、予後は良好である。

おわりに

小児で意識障害、神経症状、発熱、けいれん、などで急性発症する場合に、急性脳炎、急性脳症、細菌性髄膜炎などを鑑別し、各々に適切な治療を早期に実施することで予後が改善される。細菌性髄膜炎とHSVEは抗菌薬とアシクロビルの早期投与が必須である。ADEMはMRIで診断し、ステロイドパルスや免疫グロブリン、血漿交換が有効である。一方、CEPの調査では小児の脳炎でNMDAREはHSVEの4倍の症例数であった²²⁾。しかも、NMDAREは早期の免疫学的治療が予後を改善するので、迅速な診断を行うための検査体制が必要である。急性脳炎、急性脳症は多くは健康であった小児に発症し、予後不良例が少くないが、原因が多岐にわたり、臨床の現場では適切な対応が困難な疾患である。細菌性髄

膜炎、HSVE、インフルエンザ脳症のガイドラインは存在するが、今後、NMDAREなどを含む脳炎・脳症全般の検査体制の確立とガイドラインが望まれる²³⁾。

参考文献

- 1) 森島恒雄、水口雅、塙見正司、ほか. インフルエンザ脳症ガイドライン(改訂版). 小児感染免疫 21:421-466, 2010
- 2) Van Baalen A, Haüsler M, Boor R, et al. Febrile infection-related epilepsy syndrome (FIREs): a non specific encephalopathy in childhood. Epilepsia 2010; 51: 1323-28.
- 3) Glaser CA, et al. Beyond viruses: clinical profiles and etiologies associated with encephalitis.Clin Infect Dis. 2006 Dec 15;43:1565-77.
- 4) Gable MS, Sheriff H, Dalmau J, Tilley DH, Glaser CA. The frequency of autoimmune N-methyl-d-aspartate receptor encephalitis surpasses that of individual viral etiologies in young individuals enrolled in the California encephalitis project.Clin Infect Dis. 54:899-904. 2012
- 5) Tenembaum S, et al. .Acute disseminated encephalomyelitis.Neurology. 2007 ;68(16 Suppl 2):S23-36.
- 6) Dalmau J, et al. NMDA-receptor encephalitis: case series and analysis of the effects of antibodies.Lancet Neurol. 7:1091-8. 2008
- 7) 福山幸夫, 粟屋 豊, 林 北見, ほか. 特異な脳炎・脳症後てんかんの一群について. 厚生省神経疾患研究「難治性てんかんの予防と対策に関する研究」昭和63年報告書. 1989:131-6.
- 8) 塙見正司, 今石秀則, 杉田隆博, ほか. 難治性けいれん重積症を伴う急性脳炎の5症例. 大阪市勤務医師会研究年報. 17:165-8. 1989
- 9) Sakuma H, Shiomi M, et al. Acute encephalitis with refractory, repetitive partial seizures (AERRPS): a peculiar form of childhood encephalitis. Acta Neurol Scand. 121:251-6., 2010
- 10) Suleiman J, Brenner T, Gill D, Brilot F, Antony J, Vincent A, Lang B, Dale RC, VGKC antibodies in pediatric encephalitis presenting with status epilepticus. Neurology. 76:1252-5. 2011
- 11) Nabu R, Vezzani A, Dulac O, Chiron C. Acute encephalopathy with inflammation-mediated status epilepticus. Lancet Neurol. 10:99-108. 2011
- 12) 安井 敬三ほか. 成人発症Reye症候群の1例ー前障, 線条体, 辺縁系の画像所見と辺縁系痴呆に関する考察ー. 臨床神経, 39 : 920-924, 1999
- 13) 能登祐一ほか. MRIで経過を追った非ヘルペス性辺縁系脳炎の1例. 神経内科2008;68 :379-382
- 14) 塙見正司, 外川正生. 手足口病の最近の話題 エンテロウイルス71による神経合併症. 小児科診療.62:366-374, 1999
- 15) Narita M. Pathogenesis of neurologic manifestations of Mycoplasma pneumoniae infection. Pediatr Neurol. 41:159-66. 2009
- 16) Christie LJ, Honarmand S, Talkington DF, Gavali SS, Preas C, Pan CY, Yagi S, Glaser CA. Pediatric encephalitis: what is the role of Mycoplasma pneumoniae? Pediatrics. 120:305-13.2007
- 17) 塙見正司. インフルエンザ脳症の臨床スペクトラム. 小児内科2003;35:1676-1681
- 18) 塙見正司, ほか. けいれん重積型急性脳症の概念とtheophyllineの関与. 脳と発達40:122-127. 2008
- 19) 桑原宏哉, 野口悦正, 稲葉彰, 水澤英洋. ピタミンB6欠乏により遅発性に持続性部分てんかんを呈したテオフィリン関連痙攣の81歳女性例. 臨床神経. 48:125-129, 2008
- 20) Tada H, Takanashi J, Barkovich AJ, Oba H, Maeda M, Tsukahara H, Suzuki M, Yamamoto T, Shimono T, Ichiyama T, Taoka T, Sohma O, Yoshikawa H, Kohno Y. Clinically mild encephalitis/encephalopathy with a reversible splenial lesion. Neurology. 63:1854-8. 2004
- 21) 塙見正司, 石川順一, 山村美穂, 外川正生. 細菌性胃腸炎の合併症と治療. 小児科診療70:993-1000, 2007
- 22) Gable MS, Sheriff H, Dalmau J, Tilley DH, Glaser CA. The frequency of autoimmune N-methyl-d-aspartate receptor encephalitis

- surpasses that of individual viral etiologies in young individuals enrolled in the California Encephalitis Project. Clin Infect Dis. 54:899-904. 2012
- 23) Kneen R, Michael BD, Menson E, et al. Management of suspected viral encephalitis in children - Association of British neurologists and British paediatric allergy, immunology and infectious diseases group national guidelines. J Infect. 2011 Nov 18. [Epub ahead of print]

In Japanese children, main etiologies of viral encephalitis are herpes simplex virus type 1 and enterovirus 71. Mycoplasma encephalitis is similar to acute disseminated encephalomyelitis (ADEM) as to MR imaging. Many cases of anti NMDA receptor encephalitis are identified in teenage. Acute encephalitis with refractory repetitive partial seizures (AERRPS) was known from 1980s and the pathogenesis of AERRPS are considered to be one of the post-infectious encephalitis syndromes. Recently anti-voltage-gated potassium channel (VGKC) antibodies other than Lgi1 or Caspr2 antibodies were reported as a candidate culprit of AERRPS/FIRES. Some adult cases of AERRPS seem to be misdiagnosed as a limbic encephalitis in Japan. In Osaka City General Hospital (OCGH), tertiary pediatric emergency center of Osaka metropolitan area, during 8 years between 2002 and 2008 there are 24 cases of ADEM, 5 case of NMDA encephalitis, 6 case of AERRPS and 6 cases of HSV encephalitis of children.

The incidence of childhood acute encephalopathy is much higher in Japan and East Asia than Western hemisphere. Several types of acute encephalopathy, such as acute necrotizing encephalopathy and acute encephalopathy with convulsive status epilepticus (AEFCSE), were clarified in Japan since 1990s. In OCGH during 10 years 80 cases of acute encephalopathy with poor prognosis were admitted. The hemorrhagic shock and encephalopathy are 22 cases with 10 fatalities, median age = 18 months, and 8 cases had chronic neurological disease, viruses were 2 cases of influenza, HHV6 and norovirus and one case of rotavirus, BOCA virus and adenovirus type3. Acute necrotizing encephalopathy are 5 cases and viruses are 4 cases of influenza and one case of HHV6. AEFCSE are 34 cases, 22 cases are male, median age = 16 months, 10 cases were theophylline associated AEFCSE, viruses were 7 cases of influenza, 11 cases of HHV6 and one case of rotavirus, metapneumovirus and RS virus.

〈シンポジウムIV〉 急性脳炎脳症

脳症と代謝異常症

高柳正樹

【要旨】小児期において先天代謝異常症により引き起こされる急性脳症は数多い。

急性脳症と診断された患者は全員代謝異常症鑑別のための、システム化されたスクリーニング検査を受ける必要がある。

先天代謝異常症による急性脳症は、その発症の端緒は单一酵素の異常であり、脳症発症に至る機序のスタートラインを明確に示すことができる。このことからウイルス感染などによる急性脳症の発症機序を解明するより、より単純に機序を解明していく可能性が高い。

今回、インフルエンザ脳症と診断されている先天代謝異常症、カルニチントランスフェラーゼ2(CPT2)欠損症、Methionine adenosyltransferase I / III欠損症、生体肝移植後に大脳基底核病変を伴う急性発作を呈したメチルマロン酸血症、高アンモニア血症などを対象に、急性脳症と先天代謝異常症との関連を検討する。

Key words: 先天性代謝異常症

インフルエンザ脳症

カルニチントランスパルミトイльтランスフェラーゼ欠損症

Methionine adenosyltransferase (MAT) I / III欠損症

ミトコンドリア呼吸鎖酵素異常症

小児期において急性脳症は様々な原因により引き起こされることが知られている。Clarkeはこれら多彩な脳症の原因のなかで、先天代謝異常症により引き起こされるものも数多いことを強調している。図に各種の急性脳症を引き起こす原因の中で、先天代謝異常症が占めるポジションを示す。¹⁾

小児期における先天代謝異常症による急性脳症は以下のようない特徴を示すことがある。

- ・新生児期や小児期に健康と考えられていた児の場合、前兆がないことが多い。
- ・脳症早期のサインは軽度の行動変化のみで、気付かれないことが多い。
- ・しばしば急速に進行し、変動することが多い。
- ・限局した神経症状は呈さないことが多い。
- ・急性や断続的なataxiaは年長の小児における先天代謝異常症による、急性脳症の重要な兆候の一つである。

・ataxiaや歩行障害に嘔吐や意識の悪化を伴う場合は先天代謝異常症の関与を強く示唆する。

また先天代謝異常症の発症は疾患により年齢依存性が見られる。表1に各種疾患における好発年齢を示した。²⁾

上にあげた臨床症状のみから先天代謝異常症の存在の有無を確実に判断することは非常に難しい。これらの症状から先天代謝異常症の存在を疑った時には、次に記載するやり方で診断を進めていくことをお勧めする。

急性脳症と診断された患者には先天代謝異常症を疑い検査することが必須である。

Initial laboratory investigations

急性脳症に含まれている先天代謝異常症を見逃さないためには、Initial laboratory investigationsとして救急外来にて最初に行うべき検査項目を、あ

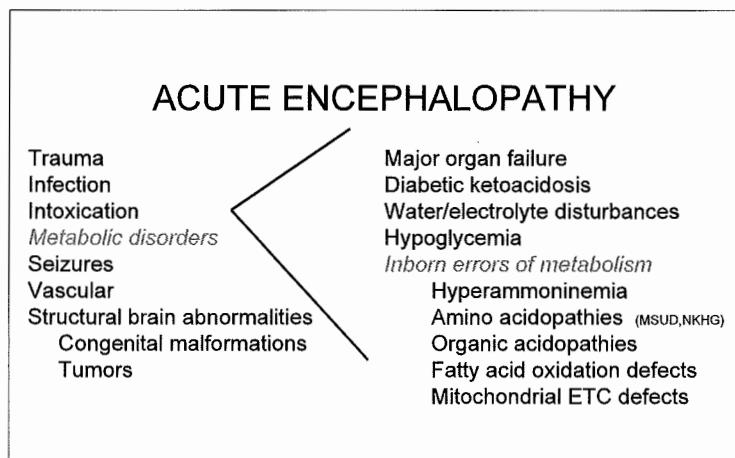


図1

急性脳症の主な成因

j. t. r. Clarke : Summary of major causes of acute encephalopathy. a clinical guide to inherited metabolic diseases, CAMBRIDGE, p54, 2006 より引用

表1

先天代謝異常症における疾患別の急性脳症発症時期について
j. t. r. Clarke . Causes of metabolic acute encephalopathy to be considered at various age . a clinical guide to inherited metabolic diseases, CAMBRIDGE, p55, 2006 より引用

Condition	Age		
	Newborn	Early childhood	Later childhood
Urea cycle defect	++++	+(girls with OTC)	(+)
NKHG	++++	0	0
Organic acidopathies	++++	+	(+)
MSUD	++++	++	++
FAOD	+	++++	?
Reye syndrome	0	++	+++
Drug ingestion	+(maternal)	+++	+++

Abbreviations:UCED, urea cycle enzyme defects; NKHG, nonketotic hyperglycinemia; MSUD, maple syrup urine disease; FAOD, fatty acid oxidation defect; OTC, ornithine transcarbamylase deficiency

表2

Initial laboratory investigationsとして救急外来にて最初に行うべき検査項目
George F. Hoffmann, et al : Metabolic Emergency. INHERITED METABOLIC DISEASES, LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, 32-88, 2002 より引用

Initial Labo Investigations

Blood: Electrolytes-bicarbonate, anion gap
Blood gases-pH, pCO₂, HCO₃, pO₂
Ammonia
Blood sugar
Lactate, Pyruvate
Calcium
3-Hydroxybutyrate
Uric acid
Creatine kinase
Complete blood count
Liver function tests
Urine: Urinalysis
Ketones

らかじめ決めておくことが最も重要と考えられる。表2にその一例を示す。これらの結果は少なくとも1時間以内にすべての結果が出るように院内の検査体制を整備しておく必要がある。これら検査の中で最も診断価値の高い検査項目は血液ガス分析とアンモニアと血糖である。

また、後日追加で検査を提出する必要が出てくることもよくあることなので、急性期の検体を適切な保存法で保存しておくことが重要である。保存法の1例を表3に示す。すぐに診断のつかない症例全例に検体保存が行なわれなくてはいけない

Secondary laboratory investigations

Initial laboratory investigationsで異常を認めた場合には引き続き Secondary laboratory investigationsを行い、鑑別を進めていく。先天代謝異常症の診断の助けとなる検査には血中・尿中アミノ酸分析、尿中有機酸分析、血中カルニチン2分画(フリー、アシル)、血中アシルカルニチンプロフィール分析などがある。

代謝救急の初動体制については著者の総説を是非一読願いたい。³⁾

表3
先天代謝異常症が考えられるときの急性期検体保存法

保存すべき検体の種類、量、保存方法

血漿または血清	
尿	最低0.5ml、できればもっと。-20度以下に
尿	最低0.5ml、できれば3-10ml以上。-20度以下に
髄液	できるだけ。-20度以下に
ガスリーろ紙に採血 少なくとも1スポット。-20度以下に	ヘパリン加全血
ヘパリン加全血	最低1ml DNA抽出用 4度で

インフルエンザ脳症と診断されている 先天代謝異常症

日本における小児期急性脳症と考えられるインフルエンザ脳症における先天代謝異常症の関与については多くの報告がある。黒田らはインフルエンザ脳症42例において先天代謝異常症の検索を行った結果、CPTII欠損症1例、グルタル酸尿症2型の2例の確定診断に至っている。⁴⁾

遠藤らは70例のインフルエンザ脳症の検索結果から有機酸代謝異常症2例、脂肪酸代謝異常症2例、糖新生系異常症1例の計5例の確定診断と脂肪酸代謝異常症4例の疑診例を報告している。⁵⁾

このほか脂肪酸代謝異常症と考えられる最近ではミトコンドリア呼吸鎖異常症との関連も指摘され、荒川らは呼吸鎖複合体I欠損によるインフルエンザ脳症の1例を報告している。⁶⁾

インフルエンザ脳症の約10%に先天代謝異常症が関与していることが明らかであり、インフルエンザ脳症を疑った時には、先天代謝異常症の検索を必ずおこなわなければならない。インフルエンザ脳症に限らず小児期の急性脳症を疑った時には先天代謝異常症のスクリーニングは必須である。

先天性代謝異常症における急性脳症の 発症機序について

急性脳症の病態についてはこれまで数多くの研究がなされている。先天代謝異常症による急性脳症は、その発症の端緒は単一酵素の異常であり、脳症発症に至る機序のスタートラインを明確に示すことができる。このことからウイルス感染などによる急性脳症の発症機序を解明するより、より単純に機序

を解明していく可能性が高い。

今回いくつかの先天代謝異常症における急性脳症（神経学的異常症）の発生機序について、これまで報告されていることや我々の知見をあげ、その一端を説明したい。

1. カルニチントランスフェラーゼ2(CPT2)欠損症

CPT2欠損症はミトコンドリアにおける長鎖脂肪酸の取り込みに関するカルニチンサイクルを構成するCPT2の欠損により、脂肪酸酸化が障害される疾患で意識障害やけいれんといった急性脳症症状を示す。インフルエンザ脳症と診断されているCPT2欠損症も多く報告されている。

この酵素の欠損により脂肪酸β酸化が障害され、エネルギー産生が十分に行われずenergy crisisが細胞に生じている。このため細胞膜の透過性の障害などが生じ細胞浮腫などが起きることが十分に予測される。

この酵素の欠損によりフリーカルニチンへのリサイクルが障害され、フリーカルニチンが枯渇していく。Coenzyme Aはフリーカルニチンといれ替わることによりレスキューアされ、重要な化学反応に利用されることができる。つまりCPT2欠損症においてはフリーカルニチンが枯渇しているので、Coenzyme A Sequestrationがおきており、このことが症状発現に大きな役割を果たしている可能性がある。⁷⁾

ミトコンドリアは大きく障害され、ミトコンドリアに局在する各種の反応系はその機能低下が生じる。ことに呼吸鎖関連の機能低下は他の先天代謝異常症においても報告されており、CPT2欠損症における脳症の病態に深くかかわっていること

が考えられる。⁸⁾

2. メチオニンアデノシルトランスフェラーゼ I / III欠損症

昭和52年より開始された新生児マスククリーニングにて、多くの高メチオニン血症が発見されている。しかしスクリーニングの目的疾患だったホモシスチン尿症はほとんど発見されず、持続する高メチオニン血症の大部分がMethionine adenosyltransferase I / III欠損症であった。このMethionine adenosyltransferase I / III欠損症の症例の中に、けいれん、軽度の知能発達遅

滞、ジストニア、MR Iにおける髓鞘化の遅延、脳波異常などを示す者が発見されてきている。⁹⁾

図2に私どもが経験した症例のMR Iを提示する。¹⁰⁾

Methionine adenosyltransferase I / III欠損症においては、最大のメチルドナーとして生体で働くSアデノシルメチオニン(SAM)の産生が減少することが考えられる。図3にメチオニン代謝経路とそれにかかわる酵素欠損症を示す。

Methionine adenosyltransferase I / IIIは肝で発現しており、脳ではMethionine adenosyltransferase

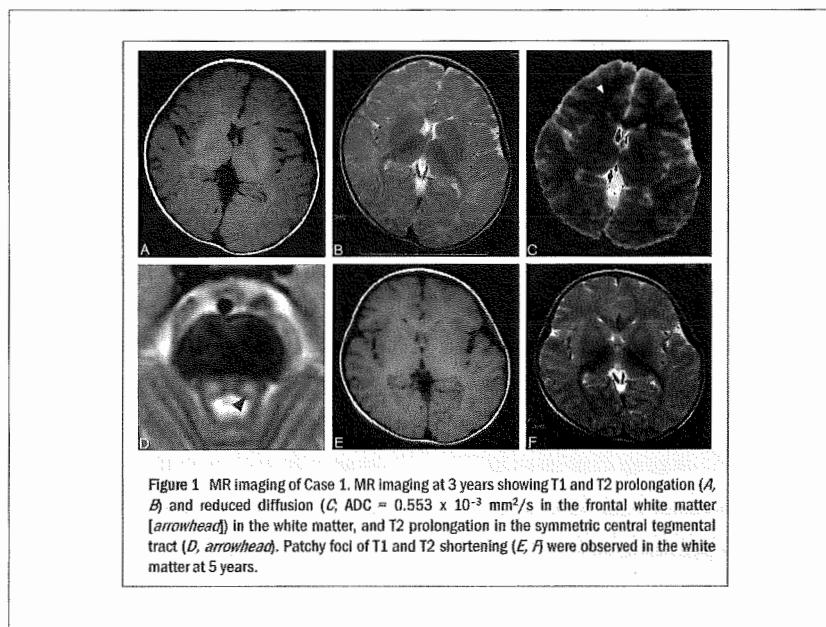


図2
Methionine adenosyltransferase I / III欠損症のMR I画像

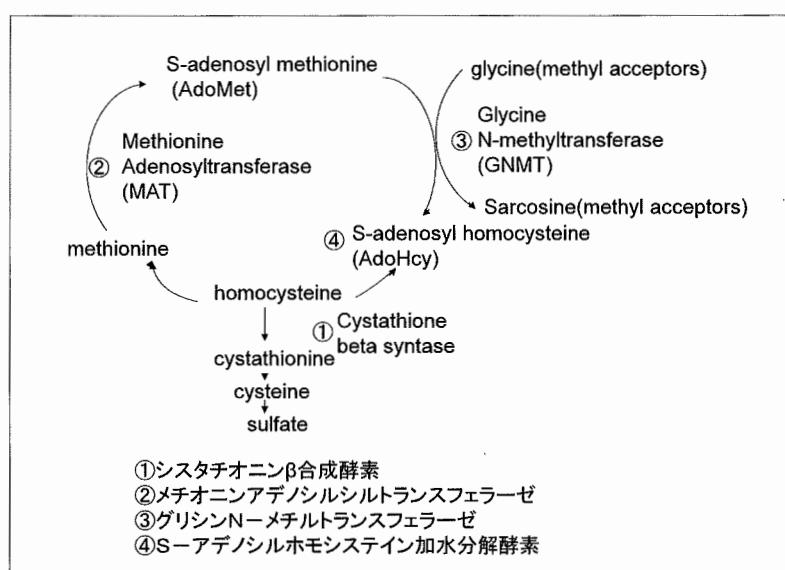


図3 メチオニン代謝経路

坂本修、大浦敏博。高メチオニン血症 小児内科 41増刊号：352-354、2009より引用

IIが発現していることが知られている。

肝におけるMethionine adenosyltransferase I / III欠損と神経症状の発現との関連を考える上で、SAMの肝から脳への移送システムの解明や、肝でSAMを利用して作られる fosfaffatidylcholine や sphingomyelin の関与に関する知識が、今後進むことが期待される。

3. 生体肝移植2年後に大脳基底核病変を伴う急性発作を呈したメチルマロン酸血症の1例

中島らは肝移植2年後に、意識障害、眼振、四肢まひ、不随意運動出現した症例を報告している。MRIにて尾状核、被核、淡蒼球にT2 High

の病変が認められ、MRSではこの病変部に乳酸のピークとNAA/CRの低下を認めた。¹¹⁾

我々はこれまでメチルマロン酸血症の移植肝を用いた検索で、これらの肝ではミトコンドリアDNAのexpression geneが抑制され、ミトコンドリアDNA枯渇症候群のような病態が作りだされていることを報告している。図4にメチルマロン酸血症における肝の呼吸鎖酵素の活性測定の結果を示した。⁸⁾

報告された症例における脳内のメチルマロニルCoAムターゼ活性は肝移植によっても、もちろん回復することはない。したがって何らかのきつ

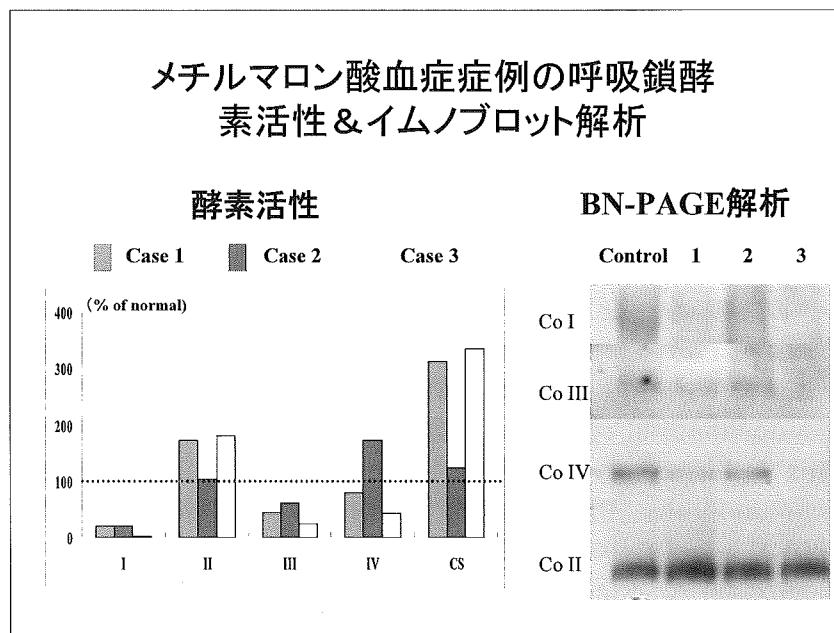


図4
メチルマロン酸血症症例の呼吸鎖酵素活性&イムノプロット解析

かけて脳内でメチルマロニルCoAを中心とする代謝不全が生じ、各種の中間代謝産物が蓄積することは予測される。この中間代謝産物がミトコンドリア呼吸鎖異常症のような病態を作り出し、最終的にEnergy crisisを基調とする症状を発現したものと考えられる。

4. 高アンモニア血症における脳症の原因

以下に記載するような機序が報告されている

- ・アンモニアの処理のためグルタミン酸が作られる。この時 α -ケトグルタル酸が消費されて減少し、オキサロ酢酸も低下し、TCA回路による NADH₂⁺生成や、呼吸鎖による ATP 生成が、停止する。
- ・さらなるアンモニア処理のために、グルタミンが合成される。グルタミンが神経伝達物質として作

用する。グルタミン酸の低下により GABA 合成が低下する

- ・グルタミン濃度の上昇は、グリア細胞 (astrocytes) の細胞内浸透圧を増加させ、脳浮腫が生じる。
- ・呼吸鎖の酵素活性が二次的に低下している。
- ・NO 産生の異常

結語

1. 脳症の中から先天代謝異常症に起因する症例を鑑別するには順序だった検査が必要である。
2. 先天代謝異常症による脳症は、脳症の病態を考える良いモデルになる。

文献

- 1) j. t. r. Clarke : Summary of major causes of acute encephalopathy. a clinical guide to inherited metabolic diseases, CAMBRIDGE, p54, 2006
- 2) j. t. r. Clarke . Causes of metabolic acute encephalopathy to be considered at various age . a clinical guide to inherited metabolic diseases, CAMBRIDGE, p55, 2006
- 3) 藤浪綾子, 高柳正樹 他 : 救急外来で見逃してはいけない先天代謝異常症, 小児科診療, 診断と治療社, 69: 1574-1578, 2006.
- 4) 黒田泰弘、山口清次、重松陽介 他。代謝異常に基づいたインフルエンザ脳症の治療/予防法 (会)。日本先天代謝異常学会雑誌 19:131,2003
- 5) 遠藤充、長谷川有紀、小林弘典 他。全国から送られたインフルエンザ脳症患者の代謝異常スクリーニングの結果 (会)。日本小児科学会雑誌 111:598,2007
- 6) Arakawa C., Endo A., Fujita Y. et al. Liver-specific mitochondrial respiratory chain complex I deficiency in fatal influenza encephalopathy. Brain Dev. 34:115-117, 2012
- 7) Mitchell A. Coenzyme A sequestration, toxicity or redistribution (CASTOR): a unifying mechanism in inborn errors of metabolism (会) . 日本先天代謝異常学会雑誌 25:47,2009
- 8) Murayama K, Ohtake A. Children's toxicology from bench to bed--Liver Injury (4): Mitochondrial respiratory chain disorder and liver disease in children. J Toxicol Sci. 34 Suppl 2:SP237-43, 2009
- 9) Chamberlin ME., Ubagai SH., Mudd Sh. et al. Demyelination of the brain is associated with methionine adenosyltransferase I/III deficiency. J Clin Invest 98:1021-7,1996
- 10) Tada H, Takanashi J, Barkovich AJ, Yamamoto S, Kohno Y. Reversible white matter lesion in methionine adenosyltransferase I/III deficiency. AJNR Am J Neuroradiol 25:1843-1845, 2004
- 11) 中島葉子、一木沙耶香、長屋嘉顕ら。生体肝移植2年後に大脳基底核病変を伴う急性発作を呈したメチルマロン酸血症の1例 (会)。日本先天代謝異常学会雑誌 25:152, 2009

Acute encephalopathy and inborn errors of metabolism

Masaki TAKAYANAGI

There are many inherited metabolic diseases which can produce acute encephalopathy in young child. We have to detect patients with acute encephalopathy according to metabolic disease screening method.

Many patients diagnosed influenza encephalopathy have been revealed as inborn errors of metabolism such as carnitine palmitoyltransferase deficiency type2(CPT2) and type1(CPT1), mitochondria respiratory chain enzymes deficiency and methylmalonic acidemia.

Pathophysiological mechanism of acute encephalopathy caused by inherited metabolic disease start from one enzyme deficiency. It is more easy to understand pathophysiological mechanism in inborn errors of metabolism than caused by some viral infection.

In CPT2 deficiency, condition of Coenzyme A sequestration, toxicity or redistribution (CASTOR) may be a important factor in pathophysiological mechanism in acute encephalopathy.

Deficiency of S-adenosyl methionine is main cause of acute encephalopathy of the patients with methionine adenosyltransferase I / III deficiency.

We reported reduction of liver enzyme activities of mitochondrial respiratory chain in patients with inborn errors of metabolism such as methylmalonic acidemia and ornithine transcarbamylase deficiency. Reduction of enzyme activities of mitochondrial respiratory chain can play important roles in pathophysiological mechanism of acute encephalopathy in such inherited metabolic diseases.

It is important to detect patients with inborn errors of metabolism among patient diagnosed acute encephalopathy.

More studies need to evaluate pathophysiological mechanisms of acute encephalopathy in young child.

Key words: Inborn errors of metabolism
influenzaa encephalopathy
Carnitine palmitoyltransferase deficiency
Methionine adenosyltransferase(MAt) I / III deficiency
Mitochondria respiratory chain enzymes deficiency

〈シンポジウムIV〉 急性脳炎脳症

脳症の臨床特徴・自己抗体(抗グルタミン酸受容体抗体) ：小児科領域

高橋幸利^{1,2}、高久保瞳¹、西村成子¹、高尾恵美子¹、
笠井理沙¹、那須裕郷¹、山口解冬¹

【要旨】 小児期脳症での抗NMDA型GluR抗体の関与を検討するために、2相性脳症(AESD)、痙攣重積で発病し単相性の経過をとる脳症(SCSE)、非ヘルペス性急性辺縁系脳炎(NHALE)について、臨床症状、髄液所見、抗NMDA型GluR抗体等を比較検討した。重積で発病する小児期脳症の中で、早期発病のAESDでは抗NMDA型GluR抗体の関与は急性期に見られないが、幼児期発病のSCSEでは抗NMDA型GluR抗体の関与する症例の存在が示唆された。抗NMDA型GluR抗体を主体とするT細胞依存性の免疫介在性病態は年齢依存性があり、AESDの好発年齢帯の2歳前後では生じにくい、あるいは他の病態が先に起こる可能性がある。

Key words: NMDA型 グルタミン酸受容体 (NMDA-type Glutamate receptor), GluR ε 2 (NR2B), GluR ζ 1 (NR1), 非ヘルペス性急性辺縁系脳炎 (non-herpetic acute limbic encephalitis), 痙攣重積型脳症

【1次性脳炎・2次性脳炎】

小児の脳炎・脳症は、代謝異常によるものもあるが、多くは感染を契機として発病する。感染に関する急性脳炎・脳症はさらに、ウィルスの中枢神経系への直接侵襲による狭義の脳炎=1次性脳炎(ヘルペス脳炎など)¹⁾と、気道感染等に伴って駆動された免疫反応によって脳炎症状が起こる2次性脳炎(脳症)に分類される(表1)²⁾。2次性脳炎(脳症)は、ウィルス感染時(あるいはその直後)に脳炎症状を示すが、髄液中のウィルスPCR検査あるいは剖検脳組織解析によりウィルスの中枢神経系直接侵襲が否定される症例である。

【免疫応答と脳炎】

ウィルス感染で必ずしも駆動される免疫は自然免疫(先天免疫)(innate immunity)で、マクロファージなどの食細胞、Natural killer cell(NK細胞)、補体などが中心的役割を担っていて、感染局

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

感染免疫の関与が示唆される2次性脳炎(脳症)をその発病ステージと症状で分類すると、①発熱などの感染症状とほぼ同時に脳炎症状が出現するもの(インフルエンザ脳症など)、②発熱などの感染症状

1：独立行政法人国立病院機構 静岡てんかん・神経医療センター(〒420-8688 静岡県静岡市葵区漆山886番地) 2：岐阜大学医学部小児病態学

とほぼ同時に痙攣重積で発病し、その後数日して発作が群発し bright tree appearance と言われるMRI所見を呈する痙攣重積型脳症(2相性脳症、AESD, Acute encephalopathy with prolonged febrile seizures and late reduced diffusion)³⁾、③発熱などの感染症状出現から数日後痙攣重積で発病するもの、④発熱などの感染症状出現から約1週

間後辺縁系症状で発病するもの(非ヘルペス性急性辺縁系脳炎(non-herpetic acute limbic encephalitis, NHALE)など)、⑤感染終息後潜伏感染し、何年も経ってから再活性化により脳炎症状が出現するもの(幹細胞移植後辺縁系脳炎など)などが知られている(図1、表1)²⁾。①②の感染症状とほぼ同時に脳炎症状が出現するものは、時期的には自然免疫の作

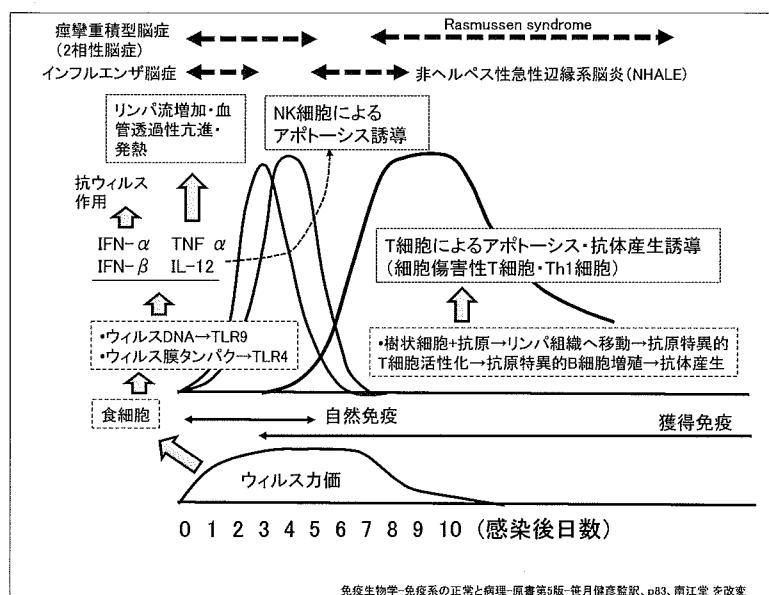


図1 ウィルス感染免疫と脳炎・脳症

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

表1 脳炎の病態分類と原因ウィルス・脳炎診断

分類	原因ウィルス・脳炎診断
1次性脳炎	
1. 血行感染	<ul style="list-style-type: none"> ● ムンプス・ポリオ・エンテロウィルスなど ● HSV(新生児)
2. 末梢神経を上行	<ul style="list-style-type: none"> ● HSV・VZV・狂犬病ウィルスなど
2次性脳炎	
1. サイトカインによる障害	<ul style="list-style-type: none"> ● インフルエンザ脳症 ● HIV脳症など ● 2相性脳症(痙攣重積型脳症)？
2. 細胞表面抗原に対する自己抗体による障害	<ul style="list-style-type: none"> ● 非ヘルペス性急性辺縁系脳炎(抗NMDA型GluR抗体、抗VGKC関連蛋白抗体など) VGKC関連蛋白: LGI-1、CASPR2など ● 卵巣奇形腫合併急性辺縁系脳炎(抗NMDA型GluR抗体など) ● Bickerstaff型脳幹脳炎(抗GQ1b抗体など) ● 傍腫瘍性辺縁系脳炎(抗AMPA型GluR抗体、抗VGKC関連蛋白抗体など) ● 橋本脳症(抗NAE抗体など)
3. 細胞内抗原に対する自己抗体による障害？	<ul style="list-style-type: none"> ● 傍腫瘍性辺縁系脳炎(抗Hu抗体など)？
4. 細胞傷害性T細胞による障害	<ul style="list-style-type: none"> ● Rasmussen症候群、傍腫瘍性辺縁系脳炎？
5. 不明、その他	<ul style="list-style-type: none"> ● ADEM

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

用する時期の発病であり、TNF α などのマクロファージ産生サイトカインやNK細胞の発病への関与が想定される。③ではNK細胞に加えてT細胞依存的な獲得免疫が駆動される時期であり、抗原特異的T細胞や特異抗体も関与する可能性がある。④のNHALEではT細胞依存的な獲得免疫が駆動される時期であり、NMDA型グルタミン酸受容体に対する抗体の関与が報告されている⁴⁻⁶⁾。

【グルタミン酸受容体】

グルタミン酸受容体 (GluR) は神經伝達物質であるグルタミン酸の受容体で、興奮性神經伝達に関与している。GluRにはイオンチャネル型と代謝型が存在、イオンチャネル型GluRは薬理学的にN-methyl-D-aspartate (NMDA) 型とnon NMDA型に分類され、後者はalpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) 型とカイニン酸型に分類される^{7,8)}。NMDA型GluRは、必須となるGluR ζ 1 (NR1) と、GluR ϵ 1-4 (NR2A-2D) あるいはGluR χ 1-2 (NR3A-3B) といったサブユニットが4つ会合した4量体(複合体)構造をとり、イオンチャネルとして機能しているが、種々のサブユニット会合パターンがあるとされている^{5,9)}。GluRの生理的機能は多岐に渡るが、中枢神經系疾患の病態にもGluRは深く関与している^{5,10)}。NMDA型GluRが中枢神經系疾患の病態に関与する機構には種々の病態が知られ、虚血性脳梗

塞などに見られる①NMDA型GluRの興奮毒性による関与、てんかんなどで見られる②NMDA型GluR発現量変化による関与、NHALEなどに見られる③NMDA型GluRに対する自己抗体による関与、Rasmussen症候群などに見られるNMDA型GluRが④細胞傷害性T細胞のターゲットとなる場合などである⁵⁾。

【抗NMDA型GluR抗体】

抗NMDA型GluR抗体は測定法により呼び方が異なり、サブユニットを抗原とする抗NR2B抗体(抗GluR ϵ 2抗体)(イムノプロット法、ELISA)、抗NR1抗体(抗GluR ζ 1抗体)(ELISA)と、NMDA型GluR複合体を抗原とする抗NMDAR抗体(抗NR複合体抗体)(cell-based assay)などがある。脳炎の抗NMDA型GluR複合体抗体は、シナプスなどのNMDAR複合体を細胞内へ内在化させることが分かっていて¹¹⁾、我々の研究ではNR1+NR2BからなるNMDA型GluR複合体のみならずNR1単独のNMDA型GluRもNHALE患者の血清で内在化が起こる¹²⁾。NMDA型GluR内在化は37度では起こるが4度では起こらない温度依存性の特徴を有している¹²⁾。抗NMDA型GluR抗体はこのように、抗NMDA型GluRを内在化させることにより、NMDA型GluR拮抗作用を示し、辺縁系症状、アポトーシス抑制などに関与する(図2)¹³⁾。

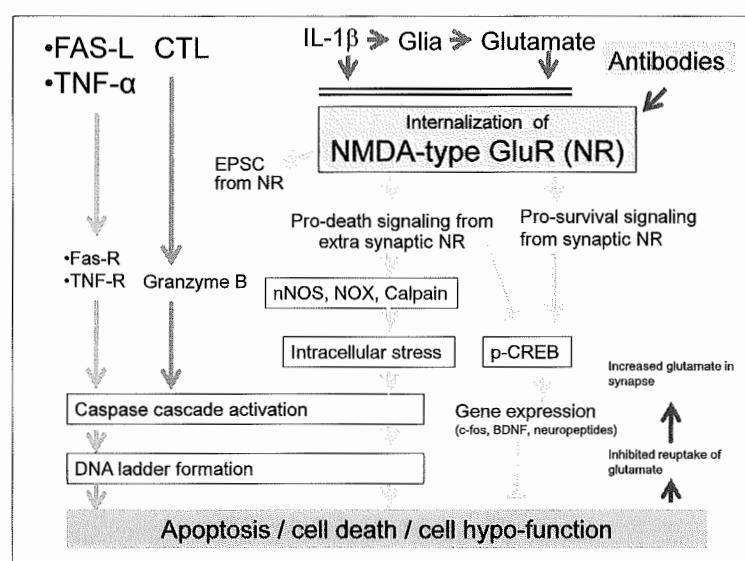


図2 NMDA型GluRを中心とした細胞死、細胞機能障害のメカニズム

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

【小児期脳症の臨床特徴と抗NMDA型GluR抗体】

小児期の脳症には様々な臨床型があり、種々の観点から命名、分類されている。病原体からの命名(インフルエンザ脳症など)、発病症状からの命名(NHALEなど)、臨床画像からの命名(AESDなど)、臨床経過からの命名(AERRPS, acute encephalitis with refractory, repetitive partial seizuresなど)、自己抗体からの命名(抗NMDAR脳炎など)などがあって、体系的な分類は難しいの

が現状で、未分類の脳症はかなり存在する。

今回、比較的臨床特徴がまとまる①痙攣重積(群発を含む)で発病し数日後に発作が群発する2相性脳症(AESD)(20例)、②痙攣重積(群発を含む)で発病し単相性の経過をとる脳症(SCSE)(インフルエンザに伴う症例などを除く)(23例)、③小児期に辺縁系症状で発病したNHALE(36例)について、臨床症状、髄液所見、抗NMDA型GluR抗体等を比較検討し、小児期脳症の臨床特徴と抗NMDA型GluR抗体の関与を考察した(図3)。

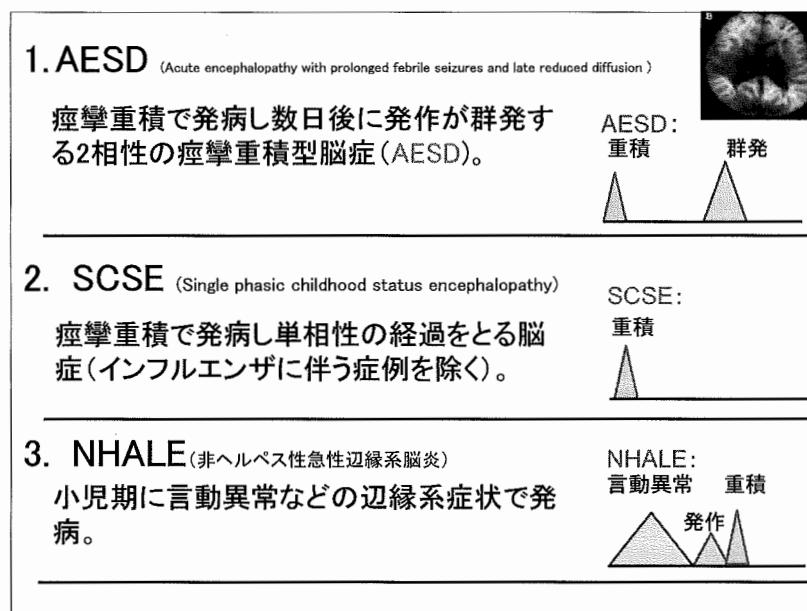


図3 小児期の急性脳症と臨床経過
検討した小児期脳症の3病型の臨床特徴を示す。

1. 臨床特徴

発病年齢(平均±SD)はAESD(2.3±1.8歳)<SCSE(6.6±4.0歳)<NHALE(9.5±3.6歳)の順で、AESDはSCSE、NHALEより有意に低年齢発病で(Mann Whitney test, p<0.0001)、SCSEはNHALEより有意に低年齢発病であった(Mann Whitney test, p<0.009)。SCSEではAESDに近い2-3歳の発病群とNHALEに近い10歳前後の群があった。

先行感染症のHHV6/7感染はAESDのみに見られ、NHALEでは先行感染症が認められない症例が、他の病型に比べて多かった。先行感染から神経症状出現までの日数(平均±SD)はAESD(0.9±1.3日)<SCSE(4.3±3.4日)<NHALE(6.0±4.0日)の順で、AESDはSCSE、NHALEより有意に日数が短かった(Mann Whitney test, p<0.0001)。SCSEではAESDに近い発熱1日後に重積で発病する症例と、発熱

5日くらいのNHALEに近い経過で発病する症例が混在していた。

初発神経症状はAESDでは90%が重積で、10%が群発、SCSEでは61%が重積で、39%が群発であった。SCSEの中にはNHALEの特徴である辺縁系症状を痙攣重積後の急性期に示す症例が7/23(39%)と、AESD(15%)より多かった。

2. 治療・予後

人工呼吸器はSCSE:10/23例、AESD:4/20例、NHALE:3/27例で発病から4日以内に使用され、パルス治療はAESD:12/17例、SCSE:17/22例、NHALE:13/22例で行われていた。ADL(Barthel score)はNHALEがAESDより有意によく(Mann Whitney test, p=0.0004)、認知機能予後もNHALEがAESDより有意によく(Mann Whitney test, p=0.005)、運動機能予後もNHALEがAESDより有意によく(Mann Whitney test, p=0.007)、急性期入院日数は

NHALEがAESDより有意に短かった (Mann Whitney test, p=0.03)。

3. 一般髄液検査

髄液細胞数 (平均±SD / μ l) (発病から5日以内)についてみると、AESD (2.9 ± 5.3) はSCSE (12.4 ± 12.2)、NHALE (12.1 ± 17.9) より有意に少なかった (Mann Whitney test, p=0.02, p=0.005)。発病6日以後NHALEでは10-20病日にかけて細胞数が高値を示す症例があった。

髄液蛋白濃度 (平均±SD mg/dl) (発病から5日以内)についてみると、AESD (18.5 ± 13.1) はSCSE (36.8 ± 19.5)、NHALE (27.8 ± 17.0) より有意に低かった (Mann Whitney test, p=0.04, p<0.05)。

髄液IgG濃度 (平均±SD mg/dl)についてみると、AESD (1.3 ± 0.8)、SCSE (4.0 ± 4.3)、NHALE (2.7 ± 1.8) で有意差はなかった。

4. 髄液抗NMDA型GluR抗体

初期のGluR ϵ 2の細胞外ドメインN末に対する

抗体 (抗NR2B-NT2抗体) (平均±SD、OD) (発病から5日以内) は、AESD (0.385 ± 0.090)、SCSE (0.567 ± 0.103)、NHALE (0.827 ± 0.352) で、NHALEではAESDに比べて有意に高値で、SCSEではAESDに比べて有意に高値であった (Mann Whitney test, p=0.03, p=0.03) (図4)。しかし経過とともに髄液抗NR2B-NT2抗体は、NHALEでは低下、AESDではわずかに上昇、SCSEではわずかに低下する特徴が推定された。初期のGluR ϵ 2の細胞内ドメインC末に対する抗体 (抗NR2B-CT1抗体) は、NHALEで高く、経過とともに低下した。SCSEでは経過とともに増加する傾向が見られた。初期のGluR ζ 1の細胞外ドメインN末に対する抗体 (抗NR1-NT抗体) は、AESD<SCSE<NHALEの順に高値で、SCSE・NHALEでは経過とともに低下する傾向が見られた。初期のGluR ζ 1の細胞内ドメインC末に対する抗体 (抗NR1-CT抗体) はNHALEで高く、経過とともに低下した。SCSEでも経過とともに低下する傾向が見られた。

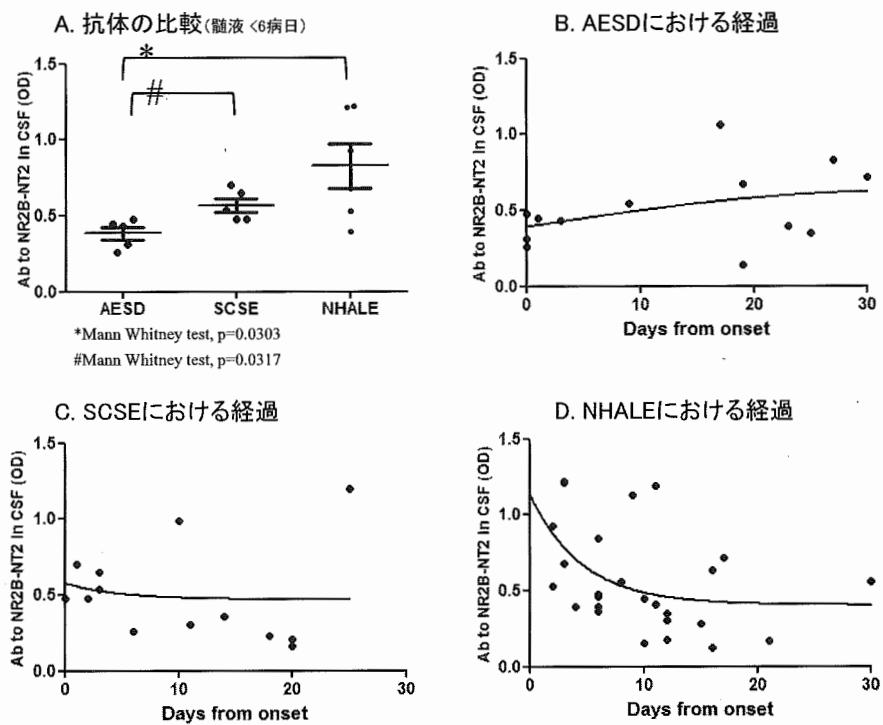


図4 髄液抗NMDA型GluR抗体

A. AESD, SCSE, NHALE症例の5病日以内の髄液中のGluR ϵ 2の細胞外ドメインN末に対する抗体 (抗NR2B-NT2抗体) (OD)。B. AESDの経過と抗NR2B-NT2抗体、C. SCSEの経過と抗NR2B-NT2抗体、D. NHALEの経過と抗NR2B-NT2抗体。
AESD、痙攣重積(群発を含む)で発病し数日後に発作が群発する2相性脳症；SCSE、痙攣重積(群発を含む)で発病し単相性の経過をとる脳症(インフルエンザに伴う症例などを除く)；NHALE、小児期に辺縁系症状で発病した脳症。

5. 考察

重積発作で発病するAESDとSCSEの特徴を、抗NMDA型GluR抗体が関与するNHALEとの比較で考察する。AESDは2歳前後に感染から1日以内に発病、NHALEに比べて長期の入院、重度後遺症を来す。発病初期の髄液細胞数、髄液蛋白濃度、髄液IgG濃度はNHALEより低く、急性期抗NMDA型GluR抗体もNHALEより低い。回復期には抗NMDA型GluR抗体が高くなる症例があった。よって急性期病態は、NHALEに見られる抗NMDA型GluR抗体+血液脳閂門破たんとは異なると推測される。AESDでは、NHALEのように抗NMDA型GluR抗体によるNMDA型GluR複合体の内在化でアポトーシスを急性期に防ぐことができず¹³⁾、重度の後遺症が起こると推測する。

SCSEは6歳前後に感染から4日程度で発病し、重積後に39%の症例でNHALEの初発症状である辺縁系症状が観察された。予後はNHALEに近く有意差はないがAESDより軽症と推測される。髄液細胞数、髄液蛋白濃度はAESDより高く、NHALEと同じレベルにあった。よってSCSEの中には、抗NMDA型GluR抗体などの自己抗体、血液脳閂門破たんが関与している症例があるものと推測される。NHALEほど急性期抗NMDA型GluR抗体が高くないために、NMDA型GluR複合体の内在化による辺縁系症状が明らかでない可能性がある。

以上より、重積で発病する小児期脳症の中でも、早期発病のAESDと幼児期発病のSCSEでは病態が異なり、後者の中には抗NMDA型GluR抗体介在性の症例の存在が示唆された。抗NMDA型GluR抗体を主体とするT細胞依存性の免疫介在性病態は年齢依存性があり、AESDの好発年齢帯の2歳前後では生じにくい、あるいは他の病態が先に起こる可能性がある。

【結語】

小児領域の2次性脳炎(脳症)の急性期病態は、発病年齢が大きく関与している可能性があり、抗NMDA型GluR抗体を主体とするT細胞依存性の免疫介在性病態は幼児期以降に成立可能なのかもしれない。今後さらなる研究が必要である。

【文献】

- 1) 小杉雅史、黒田康夫、ウィルス脳炎、Clinical Neuroscience, 23(7): 777-780, 2005.
- 2) 高橋幸利、伊藤智城、臼井大介、他、自己免疫が関わる脳炎・脳症、小児科、51(12): 1737-1748, 2010.
- 3) Takanashi J, Oba H, Barkovich AJ, et al., Diffusion MRI abnormalities after prolonged febrile seizures with encephalopathy. Neurology. 66(9): 1304-9, 2006.
- 4) 高橋幸利、久保田裕子、山崎悦子、他、ラスマッセン脳炎と非ヘルペス性急性辺縁系脳炎、臨床神経学、48: 163-172, 2008.
- 5) 高橋幸利、最上友紀子、高山留美子、他、免疫性神経疾患：最近の進歩、NMDA型グルタミン酸受容体と神経疾患、Neuroimmunology, 17(2): 245-255, 2009.
- 6) Dalmau J, Tu zu n E, Wu H, et al., Paraneoplastic Anti-N-methyl-D-aspartate Receptor Encephalitis Associated with Ovarian teratoma, Ann Neurol, 2007; 61: 25-36.
- 7) 森寿、グルタミン酸受容体チャンネルの構造と機能、生化学、2005; 77: 619-629.
- 8) Groc L, Heine M, Cousins SL, et al., NMDA receptor surface mobility depends on NR2A-2B subunits. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006; 103: 18769-18774.
- 9) 高橋幸利、最上友紀子、高山留美子、急性脳炎のグルタミン酸受容体自己免疫病態の解明、編集：鈴木則宏、他、Annual Review神経2010、p85-93、東京、中外医学社、2010年1月。
- 10) 高橋幸利、池上真理子、向田壮一、小児疾患診療のための病態生理2、てんかん、小児内科増刊号、41: 728-734, 2009.
- 11) Josep Dalmau, Eric Lancaster, Eugenia Martinez-Hernandez, et al., Clinical experience and laboratory investigations in patients with anti-NMDAR encephalitis, Lancet Neurol 10: 63-74, 2011.
- 12) Shiho Takano, Yukitoshi Takahashi, Hiroyuki Kishi, et al., Detection of autoantibody against extracellular epitopes of N-methyl-D-aspartate receptor

- by cell-based assay, Neurosci Res. 71(3):
294-302 2011.
- 13) 高橋幸利、山崎悦子、最上友紀子、他、脳炎
と興奮毒性、細胞傷害性T細胞、
Neuroinfection、16 (1) : 96-104, 2011.

〈シンポジウムIV〉 急性脳炎脳症

成人の辺縁系脳炎

亀井 聰

【要旨】 成人の辺縁系脳炎には、HSVE、HHV-6脳炎、抗NMDA受容体脳炎がある。HSVEでは多様な認知機能障害により社会復帰できない患者が多い。現在、新たな治療戦略として副腎皮質ステロイド薬併用が検討されている。HHV6脳炎では急性期に高頻度に即時記憶障害を呈する。移植後患者に認めたら、MRI上の辺縁系病巣を検索し、認めたら適切な治療が必要である。抗NMDA受容体脳炎の病態主座はNR1にあり、抗原抗体反応を基盤に発症する。受容体機能低下の機序として、内在化が想定されている。迅速に腫瘍を検索し、認めたら早期切除し、併せ副腎皮質ステロイド薬・血漿交換療法・ガンマグロブリン大量静注療法を投与する。軽快しない場合には免疫抑制剤の使用が薦められる。

Key words: 単純ヘルペス脳炎、ヒトヘルペス6型ウイルス脳炎、抗N-Methyl-d-Aspartate(NMDA)受容体脳炎、症候、治療

はじめに

脳炎の情動や記憶障害を診る場合、脳中心部を縁どる様に存在する辺縁系のネットワークが重要である。辺縁系の機能には、恐れ・怒り・喜び・悲しみといった情動や記憶をはじめ、宿主のホメオスタシスや自律神経系や内分泌機能にも関与することが知られている¹⁾。辺縁系の線維連絡として、情動に関連する回路として扁桃体・側頭葉極部・前部帯状回および前頭葉眼窩部皮質・視床背内側核をネットワークするYakovlevの回路および記憶に関連する回路として、内嗅皮質・海馬体・乳頭体・視床前核部・海馬傍回・帯状回をネットワークするPapezの回路が知られている。これらネットワークの障害により、情動や記憶障害をきたす。本稿では、辺縁系を障害し得る成人の脳炎・脳症として、単純ヘルペス脳炎、ヒトヘルペス6型ウイルス脳炎、および抗N-Methyl-d-Aspartate(NMDA)受容体脳炎について、辺縁系と症候との関連および最近の動向について概説する。

I. 単純ヘルペスウイルス脳炎 (herpes simplex virus encephalitis: HSVE)

本症の小児・成人例における発症病態を示す(図1)。三叉神経節などに潜伏感染していたウイルスが、潜伏関連転写産物 latency associated transcripts の転写から増殖感染で発現する前初期遺伝子 infected cell polypeptide 0 を介し再活性し、上行性に脳にいき脳炎を発症する。脳では脳幹から辺縁系を伝播し、そこから側頭葉や前頭葉に病巣は広がると考えられている。

本症はacyclovirの開発により死亡率は未治療における60~70%から19~28%と低下した。しかし、転帰不良率(死亡+高度後遺症)は3~5割であり、死亡は避けられても認知機能障害などの後遺症で社会復帰できない患者は多い^{2, 3)}。

自施設における本症後遺症の解析結果^{4, 5)}を示す(図2)。記憶力障害54%、認知症が約2割、前頭葉障害と考えられる自発性・集中力低下、優位半球の前頭・側頭葉皮質障害による失語、および外側側頭葉、島回、海馬傍回の障害による逆行性健忘を呈するなど多彩な認知機能障害が認められている。欧米

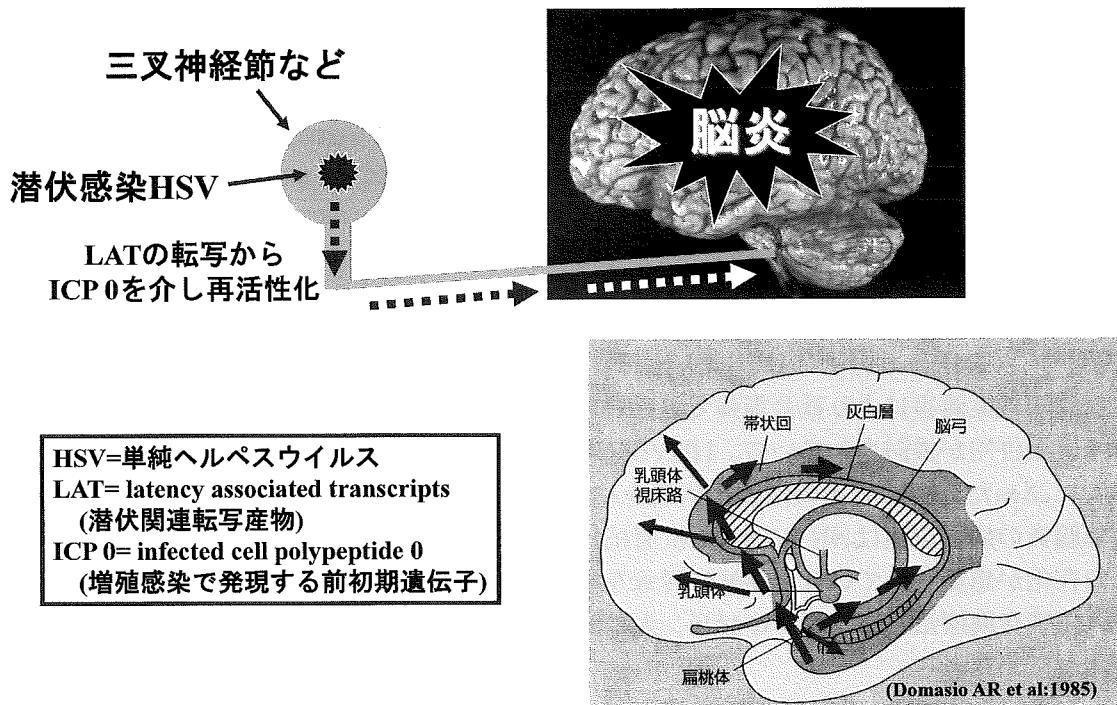


図1 HSVE小児・成人例の発症病態

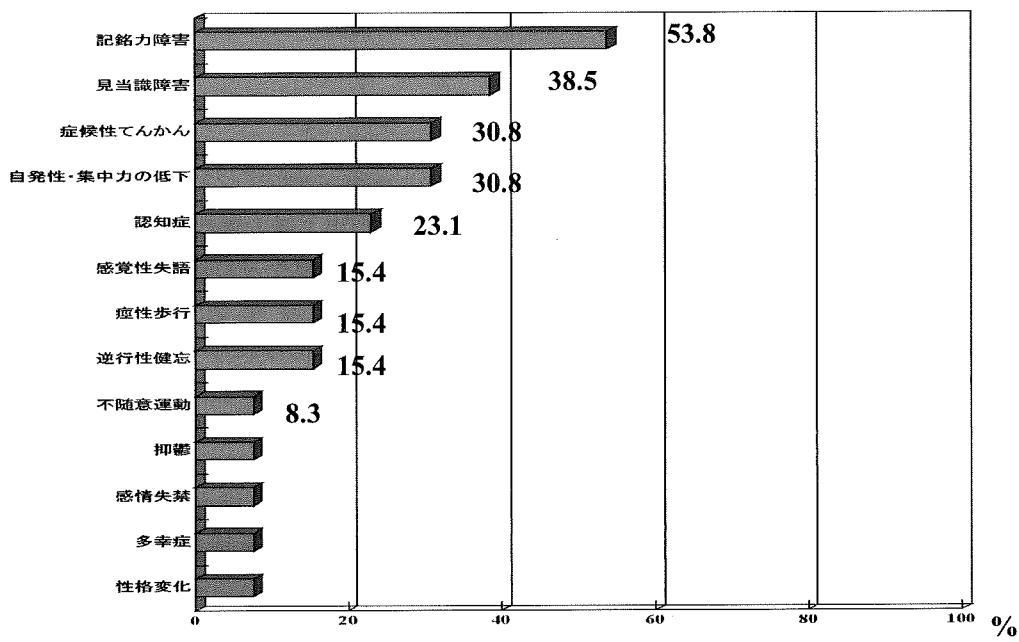


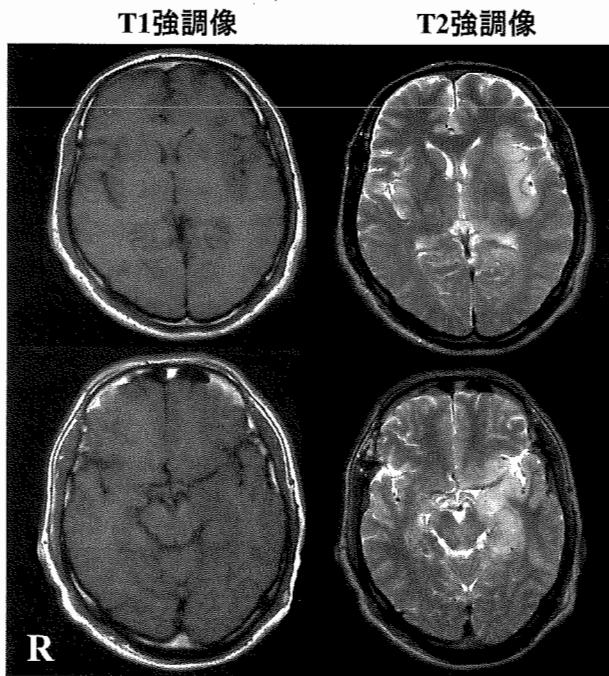
図2 HSVE成人例の後遺症

の検討でも、記憶力障害59~69%、性格や人格の変化が40%、認知症25~29%^{6,7)}、不安、自発性的低下、集中力低下などが20~35%と報告^{8, 9)}されており、本邦と欧米においてほぼ同様である。

本症では、ものの名称がわからない、失名辞といえる後遺症をしばしば認める。しかし、純粹な失名辞というより意味記憶障害であることが多い。意味記憶障害とは、例えば患者に「リンゴ」をみせて、「リンゴ」という名前を思い出せないだけでなく、

「果物」というカテゴリー、「食べられる」という機能、「赤い」という色、さらに「丸い」という形状がわからない。つまり、「りんご」に付与されている知識や情報も併せ障害されることを意味する。この障害の責任病巣としては、側頭葉内側から扁桃体、海馬を含むネットワークの障害と想定されている。本症では、画像上辺縁系の病巣を呈し、即時記憶や意味記憶障害を認める定型的な場合もある(図3A)。しかし、画像上辺縁系の病巣を示すも、即時

A. 画像所見と症候の一一致例 (45歳男性)



B. 画像所見と症候の不一致例 (52歳女性)

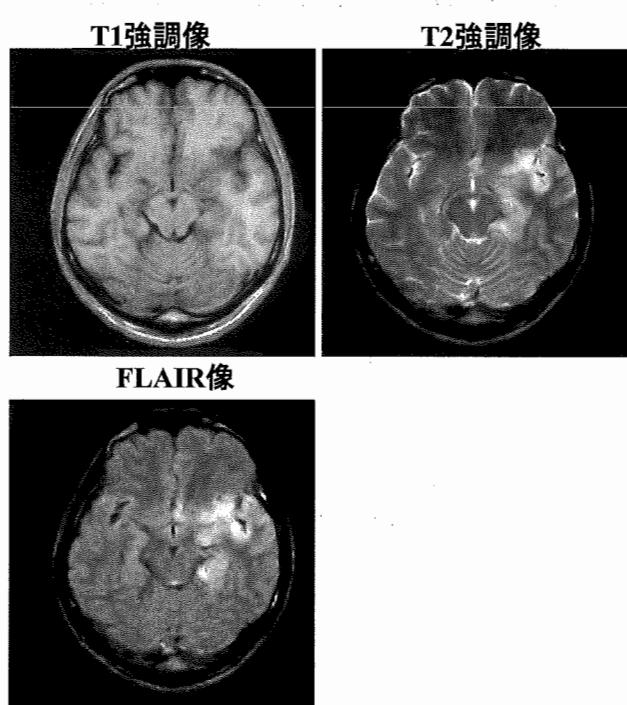


図3 HSVEにおけるMRI所見と認知機能の関連

A:頭部MRIにて海馬・扁桃体から島回に病巣を検出し、アシクロビルにて治療した。しかし、後遺症として即時記憶や意味記憶の障害を残した。

B:Aと同様に辺縁系に病巣を検出し、アシクロビル治療で軽快した。Mini Mental State Examinationは29点と良好、即時記憶や意味記憶の障害もなかった。しかし、MRIでは前頭葉の病巣は高度には示されていないが、思考転換やプランニングの障害を認めた。我々は、遂行機能を評価する Behavioural assessment of the dysexecutive syndrome (BADS)で検討した。BADS年齢補正標準化得点において58点(70点未満は、障害と判定され、年齢補正した健常者群の平均値から2標準偏差未満を意味する)と広汎な遂行機能障害を認め、前頭葉機能障害の存在が示唆された。このように症候と画像の病巣の不一致な症例もある。

記憶や意味記憶障害を示さず前頭葉障害を示唆する遂行機能障害を呈する場合もある(図3B)。このように本症では画像所見と症候が必ずしも一致しない。しかし、いずれにしても、これら認知機能障害は患者の社会復帰を妨げている大きな要因であり、この点から新たな治療戦略が必要である。

新たな治療戦略として、副腎皮質ステロイド薬の併用について述べる。我々は、2005年に多変量解析による転帰影響要因の検討から、急性期の副腎皮質ステロイド薬併用の有用性を臨床的に初めて報告¹⁰⁾した。最近公表されている欧米のガイドライン^{11,12)}は、この論文を引用し、その併用を考慮しても良いとされている。現在、この論文を基に欧州において副腎皮質ステロイド薬併用の有用性の確認が多

施設無作為二重盲検にて成人例372例を目標症例数として進行中である¹³⁾。その概要によれば、デキサメタゾンとプラセボの二重盲検で、デキサメタゾンは40 mg / 日 × 4 日間投与である。この副腎皮質ステロイド薬の用量設定は、細菌性髄膜炎の本薬の有用性の検討に準拠している。つまり、この用量においてプラセボとの間で消化管出血の頻度が有意な差を示さなかったことから、倫理的にクリアできると考えられ、設定されている。なお、評価のエンドポイントはrandomizationの6か月後と12か月後に、modified Rankin Scale、Glasgow outcome scale、EuroQoLなどにて機能評価するとなっている。その結果が待たれる。

II. ヒトヘルペス6型ウイルス (human herpes virus-6: HHV-6) 脳炎

HHV-6は新生児期に見られる突発性発疹の病原ウイルスとして同定されたが、造血幹細胞移植後の辺縁系脳炎の病原ウイルスとしても知られるようになった。その後成人例での発症も知られてきている。

本症の症状は、急性の意識障害、痙攣、頭痛、発熱であり、局在徵候や異常行動などもみられる。本例23例の解析では、臨床症状として意識障害(91%)が最も多く、即時記憶障害(73%)、痙攣(61%)、発熱(60%)、頭痛(13%)と報告され、上記のHSVEに類似している¹⁴⁾。しかし、本症の特徴として即時記憶障害の頻度が非常に高いことが挙げられる。本症は治療が遅れると死亡や重篤後遺症を呈する。従って、本症についての認識に基づく早期のMRI実施と辺縁系病巣を確認した場合には、直ちにガンシクロビルまたはホスカルネットによる治療開始が必要である。自験成人例の頭部MRIを示す(図4)。本例は、骨髄異形成症候群にて骨髄移植後に即時記憶障害を呈して発症した55歳例で、髄液PCRにてHHV-6を同定し、早期にガンシクロビルを開始し軽快した。つまり、迅速な治療の点から、移植医・放射線科医など他の領域の医師における、本症に対する理解と迅速な対応が極めて重要といえる。

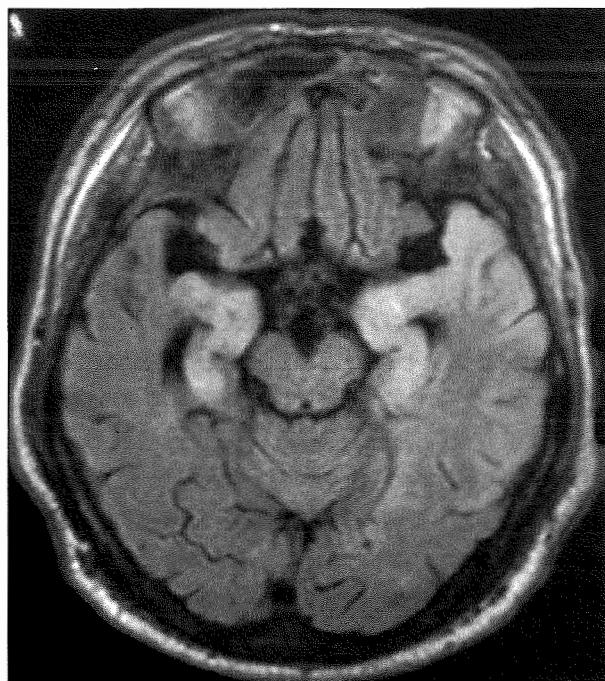


図4 HHV6脳炎自験成人例の頭部MRI像(FLAIR画像)
頭部MRIにて両側海馬を中心病巣を認める。

III. 抗N-Methyl-d-Aspartate(NMDA) 受容体脳炎

1997年に自施設から、若年女性で精神症状にて発症し、急性期に痙攣・中枢性低換気など重篤な病像を呈し、遷延経過を示すが、長期予後は良好な5症例を報告¹⁵⁾した。2004年に自験86例の一連の脳炎例の解析から、このような症例は従来知られている脳炎と異なる臨床像を呈する抗NMDA型グルタメート受容体(GluR)抗体を検出する独立疾患であると提唱した¹⁶⁾。2007年にDalmauらは、卵巣奇形腫に合併した脳炎をまとめ、この抗体が奇形腫の神経組織に発現していることを確認し、抗NMDA受容体脳炎として報告した¹⁷⁾。その後、両疾患は同一であることが明らかになっている^{18,19)}。さらにその後、症例の集積とともに新たな知見が報告されている。

(1) 臨床像

若年女性に好発するも、小児から成人と広く発症し、感冒前駆が多く、発熱・精神症状で発症し、意識障害・痙攣・不随意運動を呈し、中枢性低換気により人工呼吸器を要す場合も多く、急性期は重篤で各種治療に抵抗を示し遷延化する。しかし、軽症の症例もあり、その臨床像は当初考えられていたものより広いと言える。抗GluR抗体を検出し、従来卵巣奇形腫との関連が示唆されてきたが、卵巣奇形腫以外の腫瘍での報告もされてきている。本邦からは子宮低分化型神経内分泌癌での症例を自施設から報告²⁰⁾している。一方、本症は女性だけでなく男性例でも同様に罹患する可能性を我々は指摘し、男性例における縦隔奇形腫やセミノーマに対する検討の必要性を指摘¹⁹⁾してきた。その後、男性例でのセミノーマ・肺小細胞癌の症例が確認されてきている^{21,22)}。本症は現在では救命し得るが、以前であれば死亡していたと考えられる。この点から、類似症例を検討すると、1965年にIizuka Rにより"acute diffuse lymphocytic meningoencephalitis"として報告²³⁾された症例がその臨床像と一致する。また最近、過去のvon Economo脳炎におけるジスキネジア型嗜眠性脳炎にてこの抗体が高頻度に検出されることが報告²⁴⁾されている。さらに、昨年米国神経学会の機関誌であるAnnals of Neurologyに本症の総説が記載されたが、その中で、映画「エクソシスト」の原作モデルになった少年の臨床像は抗NMDA受容体脳炎の症状そのものであると指摘²⁵⁾されている。

(2) 発症病態

一昨年 Tüzün らは、その組織化学的な検討から、NMDA受容体抗体のNR1とNR2において、その病態の主体はNR1にあり、抗原抗体反応が主な病態であることを報告²⁶⁾している。現在、我々が考えている本症の病態仮説を示す(図5)。卵巣腫瘍などから抗NMDA受容体抗体が産生していると考えられる。しかし、卵巣奇形腫の全例が本症を発症するわけではないこと、若年成人に好発することから、何らかの別の発症要因が必要といえる。多くの症例で感冒前駆があることを踏まえれば、おそらく何らかのウイルス感染は発症のトリガーであろうとは想定されるが、それのみでは、なぜ若年成人に好発することを説明することはできない。ウイルス感染により宿主獲得免疫が賦活し、抗神経抗体が活性化され、血液脳関門の破綻から抗体が流入すると想定される。この抗体により、NMDA受容体がDown regulationを呈し、2次性の広範な機能的脳障害すると考える。NMDA受容体阻害薬(ketaminなど)は統合失調様症状を誘発することが知られ、また本症では精神症状の発症が多いことを踏まえれば、抗体の受容体に対する作用はDown regulationといえる。

最近、このDown regulationの機序についての新たな報告がされている。本症の患者髄液を入れてラットの海馬神経細胞を培養すると、後シナプスのNMDA受容体のクラスター数は減少す

る。しかし、この患者髄液を除去し、正常の髄液に置き換えて培養すると、この減少したクラスター数は再度増加することが報告されている(図6)。従って、この抗体は後シナプスのNMDA受容体のクラスターを選択的かつ可逆的に減少させるといえる²⁷⁾。つまり、一度障害されたNMDA受容体が、正常髄液に戻すことにより再度回復するということを示している。この現象を説明する機序として、最近、「内在化(internalization)」という病態仮説(図7)が提唱されている²⁸⁾。この抗体はNMDA受容体に架橋結合するが、その後病態が増悪すると内在化することでNMDA受容体の数を減らし、受容体のDown regulationを呈する。しかし、抗体が減少すると、受容体は再び細胞膜に出現して、それに連れて症状は軽快するとの考え方である。しかも、この病態の過程は症状の推移と関連すると述べられている²⁸⁾。

一方、昨年、Tachibana らは、組織化学的検討から抗GluR抗体を卵巣奇形腫のGFAP陽性の神経組織だけでなく、陰性の部分まで広く同定されること、さらに比較対照とした卵巣における正常卵胞細胞の細胞質においてもNR2Bに関連した免疫染色性が示されたと報告²⁹⁾している。この所見は、腫瘍が同定されない症例での発症機序を考える上で興味深い。しかし、腫瘍が同定されない男性例の症例の病因については今後の課題と言える。

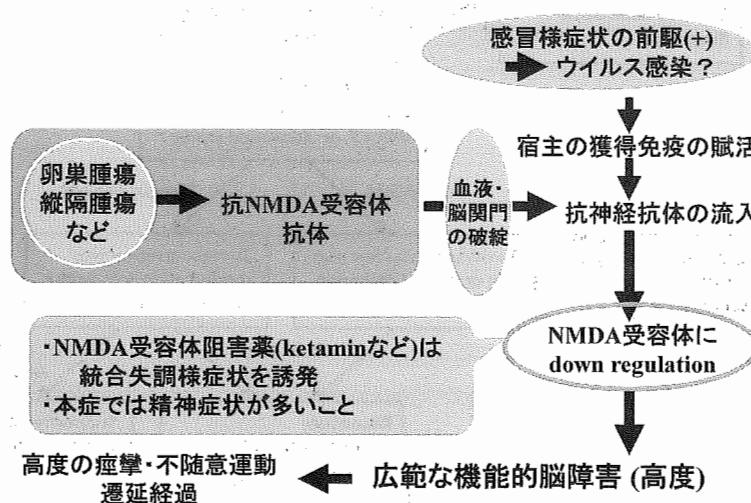


図5 抗NMDA受容体脳炎の病態仮説

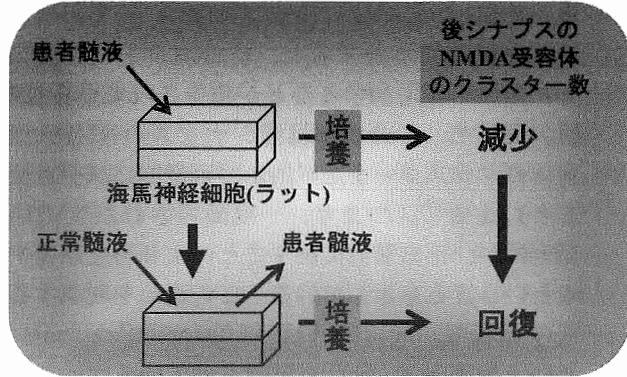


図6 抗NMDA受容体脳炎における
Down regulationの機序

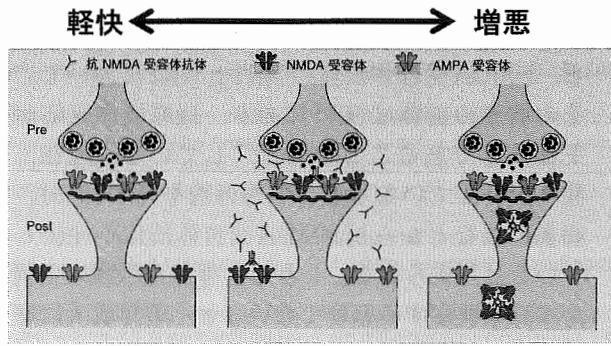


図7 内在化(internalization)仮説
文献28および30改変

(3) 治療

本症の治療は、腫瘍からの抗神経抗体がその病態との考えに立てば、腫瘍が同定されたら、その大きさに拘わらず早期に外科的切除が薦められる。腫瘍を早期に摘出した場合、その遷延経過が短縮される可能性が報告²⁷⁾されている。一方、急性期治療として副腎皮質ステロイド薬や血漿交換療法なども考慮される。最近では、免疫抑制剤の使用が有用との報告²⁸⁾もあり、症例の積み重ねとその解析が待たれていた。最近、本例400例の解析に基づいた、新しい治療algorithmが示された²⁸⁾ (図8)。その概要は、迅速に腫瘍を検索し、確認されたら早期切除をおこない、併せ第一段階として副腎皮質ステロイド薬のパルス療法・

血漿交換療法・ガンマグロブリン大量静注療法を投与する。しかし、治療開始したにも拘らず軽快しない場合には、積極的なサクロホスファマイドやリツキシマブによる免疫抑制剤の使用が第二段階として薦められており、一つの治療指針となると考える。

まとめ

成人の辺縁系脳炎として、HSVE、HHV-6脳炎、および抗NMDA受容体脳炎の動向を概説した。これら疾患は、早期の適切な治療が必要であり、神経内科のみならず関連各科の理解と迅速な対応が重要といえる。

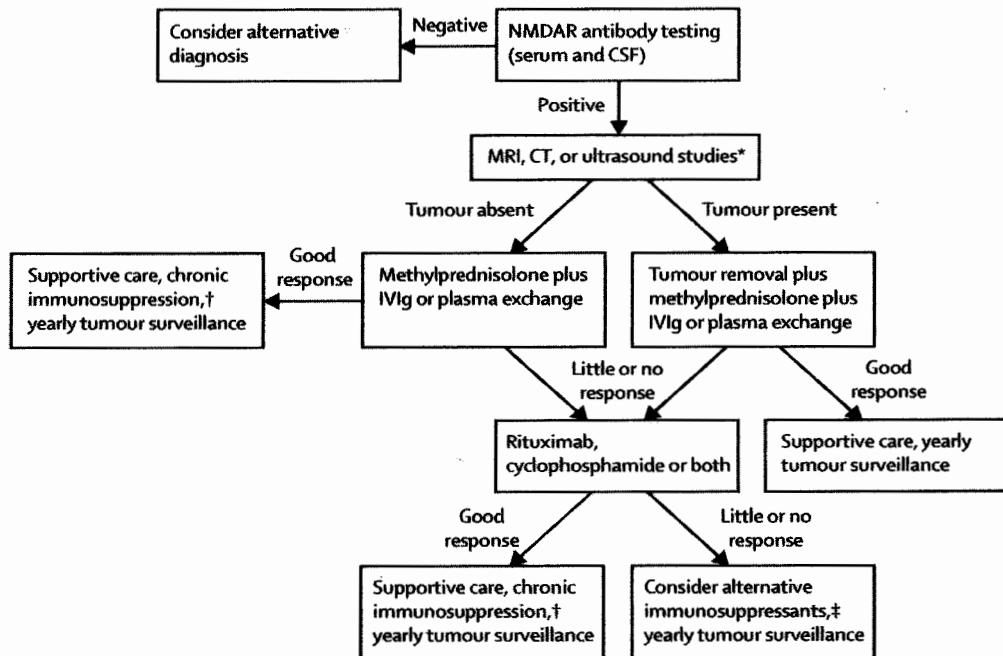


図8 抗NMDA受容体脳炎の治療アルゴリズム
文献28改変

引用文献

- 1) Afifi AK and Bergman RA: Limbic system. In Functional Neuroanatomy Text and atlas. McGraw-Hill, New York, 1998, pp421-443.
- 2) Whitley RJ, Alford CA, Hirsch MS, et al. Vidarabine versus acyclovir therapy in herpes simplex encephalitis. *N Engl J Med* 314:144-149, 1986.
- 3) Sköldenberg B, Forsgren M, Alestig K, et al. Acyclovir versus vidarabine in herpes simplex encephalitis: randomised multicentre study in consecutive Swedish patients. *Lancet* 2: 707-711, 1984.
- 4) 塩田宏嗣, 亀井聰, 高須俊明: 単純ヘルペスウイルス脳炎成人例の臨床解析(第1報). *日本医学雑誌* 57(10): 484-497, 1998.
- 5) 塩田宏嗣, 亀井聰, 高須俊明: 単純ヘルペスウイルス脳炎成人例の臨床解析(第2報). *日本医学雑誌* 57(10): 498-515, 1998.
- 6) Sköldenberg B. Herpes simplex encephalitis. *Scand J Infect Dis Suppl* 80:40-46, 1991.
- 7) Hokkanen L and Launes J. Cognitive recovery instead of decline after acute encephalitis: a prospective follow up study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 63:222-227, 1997.
- 8) McGrath N, Anderson NE, Croxson MC, et al. Herpes simplex encephalitis treated with acyclovir: diagnosis and long term outcome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 63:321-326, 1997.
- 9) Utley TF, Ogden JA, Gibb A, et al. The long-term neuropsychological outcome of herpes simplex encephalitis in a series of unselected survivors. *Neuropsychiatry Neuropsychol Behav Neurol* 10:180-189, 1997.
- 10) Kamei S, Sekizawa T, Shiota H et al: Evaluation of combination therapy using both aciclovir and corticosteroid in adult patients with herpes simplex encephalitis. *J Neurol Neurosurg Pyschiatry* 76, 1544-1549, 2005.
- 11) Solomon T, Hart JJ, Beeching NJ: Viral encephalitis: a clinician's guide. *Pract Neurol* 7: 288-305, 2007.
- 12) Tunkel AR, Glaser CA, Bloch KC, et al: The management of encephalitis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 47: 303-27, 2008.
- 13) Martinez-Torres F, Menon S, Pritsch M, et al: Protocol for German trial of Acyclovir and corticosteroids in Herpes-simplex-virus-encephalitis (GACHE): a multicenter, multinational, randomized, double-blind, placebo-controlled German, Austrian and Dutch trial [ISRCTN45122933]. *BMC Neurol* 8: 40, 2008
- 14) Yoshikawa T, Ihira M, Suzuki K, et al: Invasion by human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7 of the central nervous system in patients with neurological signs and symptoms. *Arch Dis Child* 82, 170-171, 2000
- 15) 西村敏樹, 三木健司, 小川克彦, ほか. 無菌性非ヘルペスウイルス性急性脳炎の病態.-若年女性に起こり, 強い意識障害と遷延性経過を示すが転帰比較的良好な1群について-. *Neuroinfection* 2: 74-76, 1997.
- 16) 亀井聰. 若年女性に好発する急性非ヘルペス性脳炎(Acute Juvenile Female Non-Herpetic Encephalitis: AJFNE). *神経研究の進歩* 48:827-836, 2004.
- 17) Dalmau J, Tüzün E, Wu H, et al. Paraneoplastic anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis associated with ovarian teratoma. *Ann Neurol* 61:25-36, 2007.
- 18) Iizuka T, Sakai F, Ide T, et al. Anti-NMDA receptor encephalitis in Japan. Long-term outcome without tumor removal. *Neurology* 70:504-511, 2008.
- 19) Kamei S, Kuzuhara S, Ishihara M, et al: Nationwide Survey of Acute Juvenile Female Non-Herpetic Encephalitis in Japan: Relationship to Anti-N-Methyl-D-Aspartate Receptor Encephalitis. *Intern Med* 48: 673-679, 2009.
- 20) Hara M, Morita A, Kamei S, et al. Anti-N-

- methyl-d-aspartate receptor encephalitis associated with carcinosarcoma with neuroendocrine differentiation of uterus. *J Neurol* 258: 1351-1353, 2011.
- 21) Dalmau J, Gleichman AJ, Hughes EG, et al. Anti-NMDA receptor encephalitis: case series and analysis of the effects of antibodies. *Lancet Neurol* 7:1091-1098, 2008.
- 22) Berger JR, Bensalem M, Dalmau J. A brainstem paraneoplastic syndrome associated with prostate cancer. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 80:934-935, 2009.
- 23) Iizuka R: Beitrag zur akuten diffusen lymphocytären Meningoencephalitis und Encephalopathie. *Arch Psychiat Nervenkr* 206: 705-717, 1965.
- 24) Dale RC, Irani SR, Brilot F, et al. N-methyl-D-aspartate receptor antibodies in pediatric dyskinetic encephalitis lethargica. *Ann Neurol* 66:704-709, 2009.
- 25) Sébire G. In search of lost time from "Demonic Possession" to anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis. *Ann Neurol*. 2010 Jan;67(1):141-2;
- 26) Tüzün E, Zhou L, Baehring JM, et al: Evidence for antibody-mediated pathogenesis in anti-NMDAR encephalitis associated with ovarian teratoma. *Acta Neuropathol* 118, 737-747, 2009.
- 27) Dalmau J, Gleichman AJ, Hughes EG, et al. Anti-NMDA-receptor encephalitis: case series and analysis of the effects of antibodies. *Lancet Neurol* 7:1091-1098, 2008.
- 28) Dalmau J, Lancaster E, Martinez-Hernandez E, et al. Clinical experience and laboratory investigations in patients with anti-NMDAR encephalitis. *Lancet Neurol* 10:63-74, 2011.
- 29) Tachibana N, Shirakawa T, Ishii K, et al. Expression of various glutamate receptors including N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) in an ovarian teratoma removed from a young female with anti-NMDAR encephalitis. *Intern Med* 49:2167-2173, 2010.
- 30) 飯塚高浩, 安田 徹, 望月秀樹. 抗NMDA受容体脳炎における最近の進歩. 最新医学 5:973-983, 2011.

Limbic encephalitides in adult

Satoshi Kamei

Key words: herpes simplex virus encephalitis, human herpes virus 6 encephalitis, anti-N-Methyl-d-Aspartate (NMDA) receptor encephalitis, symptom, treatment

〈シンポジウムV〉 神経ウイルス感染症の最前線

HIV脳症の臨床と病理

岸田修二

【要旨】HIV (Human immunodeficiency virus type-1) 感染に抗レトロウイルス剤の多剤併用療法 (CART) が1996年に導入されて以来、HIV脳症をはじめとするAIDS (Acquired immunodeficiency syndrome) 指標中枢神経合併症の発症頻度は著しく減少している。しかしHIV感染者は増加傾向に有り、特にわが国では新規HIV/AIDS患者が増加傾向にある。CARTが導入される以前には多くの患者に認知、運動、行動異常を中心として進行するHIV脳症が見られていたが、CART導入に伴い、重度のHIV脳症は著減し、その代わり軽症型の認知機能障害を有する患者が高率に見られるとの指摘がある。認知障害は軽症といえどもHIV感染患者の長期管理に様々な問題を孕んでおり、HIV感染患者が延命増加する中で認知障害の病態解明と対策は重要である。

Key words: HIV脳症、HIV関連神経認知障害、抗レトロウイルス剤の多剤併用療法

はじめに

近年HIV (Human immunodeficiency virus type-1) 感染は国や地域により新規感染者が増加傾向にあるところあるいは減少傾向を示すところが見られるが、世界全体から見るとやや減少傾向にあり、また AIDS (Acquired immunodeficiency syndrome) での死亡率も減少傾向にある。特に欧米の経済的先進国では抗レトロウイルス剤の多剤併用療法 (CART) が導入された1996年以降顕著に死者数が減少している。しかしながら生存HIV/AIDS患者数は世界的に増加傾向にあり2009年末で約3,300万人と推定されている。治療を受けられる患者はその内約30%に満たない。現在のところ我が国は成人感染率が0.1%未満と少ないが、他の経済的先進国とは異なりHIV感染者が唯一増加傾向にある。2010年値は新規HIV感染者は1,075人、新規AIDS患者は469人と報告され、しかもAIDSで初めてHIV感染が判明する症例が増えている特徴がある。2011年末にはHIV感染者が2万人に達すると推定されており、国民の関心の薄いことに一因があると思われる。ところでHIVは感染患

者の50%以上に神経系を傷害する。神経障害はHIVが直接関与した病態と、免疫不全から発症する日和見性疾患（日和見感染症、日和見性悪性腫瘍）、薬剤が関与した神経症状に大別することができる。神経合併症は中枢神経系から末梢神経・筋系に至るまで様々で、しかも感染初期から免疫不全に至る晚期まで時期を問わず合併するが、主としてCD4(+)Tリンパ球数が200未満、特に100未満でみられる（図1）。HIV感染の治療が十分普及していない国々ではHIV関連神経疾患が主要な神経病となっている。しかしHIV感染にCARTが導入された欧米先進国では、他の日和見感染症と同様に、神経合併症（NeuroAIDS）は減少傾向にある。しかしneuroAIDSは未だに生命予後が悪い疾患である¹⁾。

HIV感染症がCART導入後管理可能な慢性疾患へと変化してきたことにより、導入される前には考えられなかつた様々な問題、すなわち1) 長期薬剤投与による長期効果と薬剤副作用、2) HIV慢性感染に伴う合併症（薬剤の副作用を含む）である。その中で一番懸念されているのが認知症（広義のHIV脳症）の問題である。

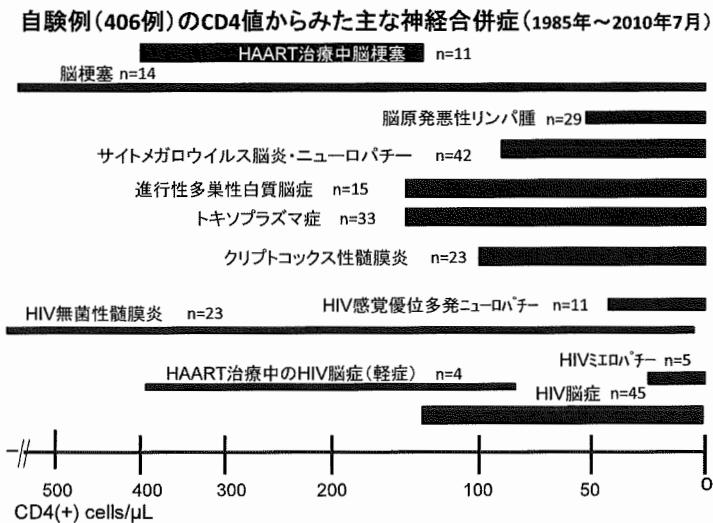


図1 自験例のCD4(+)Tリンパ球数からみたHIV感染に伴う主要神経合併症

HIV脳症

HIV感染患者には、進行性の認知、運動、行動異常がしばしば見られる。これに対し当初、亜急性脳炎(脳症)、AIDS脳症、HIV脳症など様々な名称が用いられた。1986年NaviaらはAIDS認知症コンプレックス(ADC)という名称のもとに、臨床・病理学的所見を記載した。1988年にはADCに対して日常生活に及ぼす認知機能障害の程度に基づき6段階の重症度が設けられた。その後1991年には米国神経学会はこれまでの用語の統一と今後のリサーチのために、日常生活に支障を及ぼす重度の認知障害と運動/行動異常を伴う後天的異常をHIV関連認知症(HAD)、何らかの認知機能障害はあるが日常生活にはさほど支障の無い軽症型を軽度認知・運動障害(MCMD)と称することを提唱した。HIV感

染症に対して強力な抗レトロウイルス剤の多剤併用療法(CART)が導入される以前には、HADは高度に免疫不全の進行した状態で発症し、AIDS指標疾患であった。CART導入前にはAIDS患者の20～30%に発症し、生命予後不良疾患であった。HADは南アフリカや東南アジアでも高率に見られ、ウイルスのクレード(亜型)にかかわらず合併する疾患である。

1996年HIV感染治療にCARTが導入されると、その後HIV感染者のAIDS発症が抑制された。同時に重度なHADの発症頻度も減少した(図2)。CART導入後のHADは晩期HIV感染患者の10～15%と推定されている。現在HADを呈する患者はほとんどがCART未治療の患者であるか、導入後自己中断をした患者である。

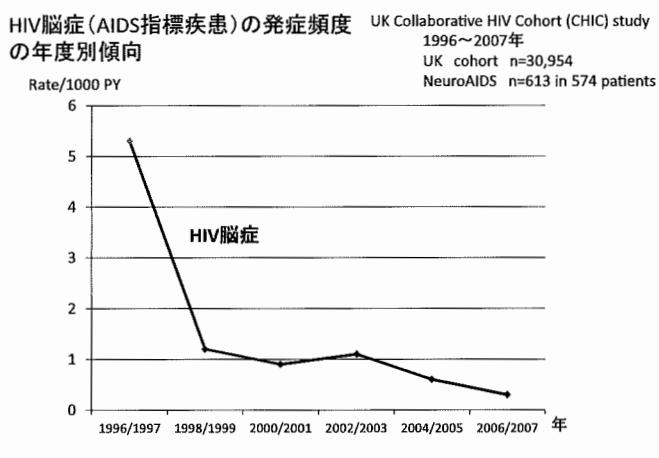


図2 英国におけるCART導入後1996年～2007年におけるHIV脳症の発症頻度
(率/1,000人・年)¹⁾

ところで、治療の行われていないHADに対してCARTを開始し、免疫能を再構築すると、認知機能が改善してくる例が多く、更に病理学的にもCART導入後は血管周囲に多核巨細胞やマクロファージが浸潤し、ミクログリア結節や器質の淡明化などを呈する典型的なHIV脳炎像をみる機会は稀となつた²⁾。その結果HADはHIVの関与が極めて大きいことがあらためて強調されるようになった。

HIV関連神経認知障害はCARTにより発症抑制可能か？

HADはCARTにより臨床的にも、検査所見でも進行が停止したり、改善する例が多く治療できる認知症と考えられるようになった。またCART導入後の剖検例ではHIV特異病理所見を見ることが減少した。そうするとHADは単なるHIVによる脳炎に過ぎず、CARTのみで発症を予防できるのではないかと考えられる。しかしHADにCART開始しても神経認知障害が持続したり、HIV感染治療にCARTが導入され、CD4(+)Tリンパ球数が改善し、末梢血でHIVが検出されなくなった場合でも依然として神経認知障害が発症する例を経験する。実際CART導入後から軽微な認知障害患者が増加しているとの指摘がある³⁾。CARTを受けている1,160人を対象にしたAIDS clinical trial groupの試験では、ベースラインすでに26%が軽度から中等度の認知症を有し、最初認知症を示さなかつた615例も2回目の評価では21%に軽度な認知障害がみられている⁴⁾。特に認知症はAIDS発症後あるいはCD4(+)Tリンパ球数が200以下でCARTを開始した症例で、CD4(+)細胞数が回復しない場合に認知症が持続したり、発症したりしている。そこでCART導入後の神経認知障害の変化に対応し、認知障害患者の同定とリサーチのための明確な診断基準が設定され、HIVに関連した認知障害をHIV関連神経認知障害(HIV-1-associated neurocognitive disorders: HAND)と包括的に称し、HIV関連認知症(HIV-1-associated dementia: HAD)(=エイズ脳症、HIV脳症、エイズ認知症コンプレックス、従来のHAD)、軽度神経認知障害(mild neurocognitive disorder: MND)(=MCMD)、無症候性神経認知障害(asymptomatic neurocognitive impairment: ANI)に細分類した(図3)⁵⁾。

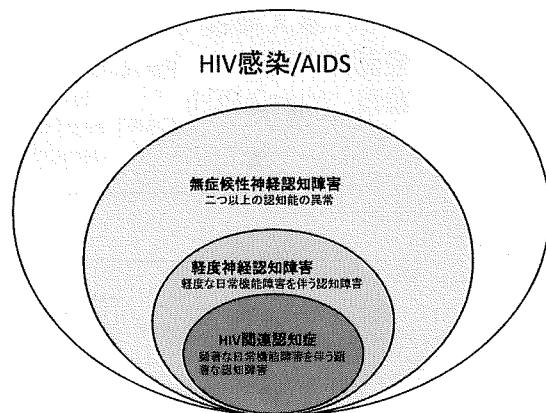


図3 HIV関連神経認知障害の重傷度スペクトラム。

米国の6大学病院から参加した計1,555人のHIV感染患者を対象にしたCNS HIV Antiretroviral Therapy Effects Research (CHARTER) 試験では、上記の認知症の基準で52%の患者に神経認知機能障害が見られており、ほとんどが軽症のHANDであると報告している⁶⁾。また48ヶ月間(中央値)末梢でHIVが検出されていない200人を対象にした認知機能検査でも69%にHANDを認めている⁷⁾。一方CART導入前後のHIV感染患者の認知機能障害についてHIV非感染患者を対象に比較した成績では、HIV感染者はCART導入に関わらず、どのCDCステージ分類時期でも高率に認知機能障害が見られることを報告している⁸⁾(図4)。すなわちCARTによって重度な認知症発症は予防できても何らかの神経認知障害の発症は予防できないことが多数の臨床研究で証明されている。

CART治療のもとでHIV感染患者の中樞神経で何が進行しているのだろうか？

CART導入後の神経病理学的検討報告は数少ない。Everallら²⁾によると、剖検例の約80%は何らかの異常がみられたが、HIV特異病理所見は17%にすぎず、CART導入以前と比べ減少していた。認知機能障害の存在はアルツハイマーII型グリアや非感染性病理所見、非診断的微小変化がどちらかというと相関しており、HAND発症に中枢神経内でHIV複製以外の別の作用が関与している可能性を言及している²⁾。

CART導入前後のHIV(−)対象とHIV(+)患者のCDC stageでの神経認知障害

頻度 ***p=0.001
 Pre-CART era(1998-1995) (HIV Neurobehavioral Research Center: NRC)
 N=857 (HIV−:179, CDC-A:412, CDC-B:181, CDC-C:85)
 CART era(2000-2007) (CNS HIV Antiretroviral Therapy Effects Research: CHARTER)
 N=937 (HIV−:94, CDC-A:337, CDC-B:216, CDC-C:290)

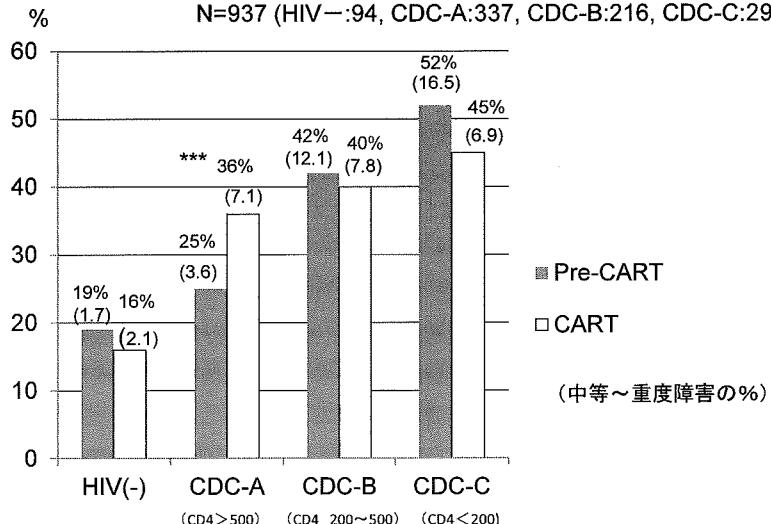


図4 CART導入前後のCDC分類各ステージによる認知機能障害保有率
 (文献8引用改変)。

表1 CART導入後の剖検例の神経病理学的検討²⁾

HAART導入後の臨床病理学的検討

Everall I et al: J Neurovirol 15;1-11,2009

1999年以降National NeuroAIDS Tissue Consortium(NNTC)の589名の脳サンプル

	全 (n=589)	HIV特異病 理所見 (n=103)	HIV特異病 理所見なし (n=486)
正常脳	127/589 (22%)	0/103(0%)	127/486(26%)
日和見感染	23%	24%	24%
リンパ腫	5%	10%	4%
血管障害	15%	18%	15%
無菌性髄膜脳炎	5%	9%	4%
無酸素・虚血性脳症	5%	6%	4%
アルツハイマーII型グリオーシス	15%	17%	15%
他の非感染性病理所見	20%	10%	22%
微小非診断的異常所見	12%	1%	14%

HIV特異病理所見 17%
 HIV脳炎 11%
 ミクログリア結節脳炎 5%
 HIV白質脳症 2%

しかし一方で、CART下でもCART導入以前にみられたような持続的炎症を示唆するマクロファージ/ミクログリアの活性化が顕著にみられているし⁹⁾、CART治療を受けた患者の半数に逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)法により剖検時の脳組織にHIV-RNAが検出されている¹⁰⁾。髄液検査でも、

CARTにより血漿、髄液双方でHIV複製が抑制されても、髄液中でマクロファージの活性化を示す所見が認められたり、血漿でHIVが抑制されていてもしばしば髄液中にHIVが検出されている^{11,12,13)}。また神経放射線学的にも長期間CARTで良好なコントロールを得ている患者群とHIV感染の

ない集団を対象にした研究で、前者で進行性の脳萎縮がみられている¹⁴⁾。また、Magnetic resonance spectroscopy (MRS) を用いた検討でも、軽度な認知機能障害が残存する患者ではコリンの増加とN-アセチルアスパラギン酸の減少が持続するとの報告もある。このようにCARTの下でも神経傷害が進行している可能性を示唆する証拠が多数出ている。すなわちHIV感染患者ではCART下にあっても、慢性的な免疫活性状態（これがHIV自体によるものか、或いはその他の要因によるものかは不明であるが）、が中枢神経内で進行していると思われる。ANIやMNDの基礎にある病態は不明であるが、今日みる認知機能障害の背後にある病態かもしれない。さらにCART下で臨床的にANIからMND、HADへとアルツハイマー型老年認知症のように進行性経過をとるかどうかは全くわかっていない。これらは慢性化したHIV感染患者を見ていく上で解明されなければならない重要な問題である。

今後の問題点

HANDの存在はHIV感染患者にとって生活の質の障害や仕事への従事に問題を伴うばかりでなく、治療に対するアドヒアランスの障害、その結果としての全身合併症の障害を起こす可能性がある。HANDはHIV感染患者の慢性化に伴い最も重要かつ懸念材料の一つである。HANDへの治療と対策を考える上で問題となるのは、①HANDの診断、②HANDに対する治療薬、③HAND発症予防である。HANDの診断は、臨床所見、画像、髄液所見、神経心理学的検査などから行われるが、どれ一つとしてHANDに診断特異的なものではなく、除外診断からなる。通常よく行われる改訂長谷川式認知スケールやミニメンタルステート検査は主に皮質性機能異常を見る検査であるため、皮質下性認知機能異常が主となるHANDの早期異常はとらえられない。MRIではHADでは脳萎縮や大脳白質異常を示す率が高いが、ANIやMNDに対する診断的有用性はない。MRSは認知機能障害を有する患者でN-アセチルアスパラギン酸の減少、ミオイノシトールやコリンの増加が見られ、また早期から異常が見られるとの報告があり早期診断に有用かもしれない。CART導入以前には認知機能異常の重症度と髄液中のHIV負荷量やネオプテリン、β2ミクログロブリンなど様々な免疫活性の上昇が平行して見られていた。しかし 髄液中マーカーいずれもHANDに診断特異性はないが、治療モニターとして利用できる

上、HIV負荷量、ネオプテリン、ニューロフィラメント軽鎖など各エレメントのマーカーの組合せがHAND診断の補助手段として有益であった。しかしCARTがすでに導入された患者では、髄液中のHIVは検出限界以下になっていることがあり、HANDのマーカーとしてのHIV負荷量測定の有用性はなくなっている。同様に髄液中各種マーカーもCART開始患者では減少しており、HANDの重症度を反映しなくなっている。ANI、MCDを含めたHANDの診断のための簡易で有用な診断ツールの開発が望まれる。

HANDにおける抗レトロウイルス療法の主な目的は血漿ならびに中枢神経系で完全にウイルスを抑制することである。このためには中枢神経への浸潤が重要であるが、現在のところ使用できる薬剤で実質浸潤に関する情報はほとんどない。どの程度髄液濃度が実質内濃度を反映しているかは明らかではない。髄液移行性の多寡を考慮したCART処方内容の如何にかかわらず、臨床的およびHANDのバイオマーカーが改善するために、抗レトロウイルス剤のどの組み合わせが最も効率よく脳に浸潤し、すなわちHANDの治療に有効かに関しては意見の相違がある。しかし髄液移行性を考慮した抗ウイルス薬を処方に加えた3剤以上からなるCARTが認知機能の改善と髄液中HIV負荷量抑制効果が高い。薬剤の化学的性質、髄液濃度に関するデータ、認知機能に関する薬剤評価などに基づいた中枢神経浸潤と効果 (CNS penetration effectiveness; CPE) に関してランク付けを確立しよう試みがある¹⁵⁾。高いランクの薬剤の組み合わせは中枢神経内でHIVの増殖を抑制し、ニューロンの傷害のリスクを低減させるが、一方で中枢神経系での高濃度の抗HIV剤は神経毒を及ぼす危険性を生じる。現在の所、HANDを発症し抗HIV療法を受けていない患者の治療法に関して明らかな指針はない。またCPEランクの高いレジメンで治療開始すべきかも明らかではなく、今後の検討課題の一つである。

また、抗レトロウイルス薬がHANDを予防できるかどうかに関する研究もないし、どの薬剤を選択し、いつ頃から開始すれば中枢神経系に潜在するHIVを根絶できるのかなどの問題も全くわかっていない。HANDを発症しないHIV感染患者もあり、必ずしも全例に中枢神経に最適な抗レトロウイルス薬の治療が必要とも限らない。HANDのリスク因子には患者側の因子としてCD4(+)Tリンパ球数の低値、加齢、微生物転移、貧血、血小板減少、宿主の遺伝的素因、HIVサブタイプがあり、併存症とし

てC型肝炎、覚醒剤の使用、心血管障害、代謝障害、うつ或いはその他の精神状態、アルツハイマー病など神経変性疾患が挙げられている¹⁶⁾。HAD発症にはCD4(+)Tリンパ球数が200未満の高度な免疫不全の進行が関与していることから、早期にCARTを開始し、免疫不全の進行を止めることは重要である。発症リスクとの関連を含め、HAND発症予防も今後解明されるべき問題である。

終わりに

HIV感染患者の増加、CARTと延命は、合併する神経疾患を複雑化し、表現型を変えてきている。HIV感染者の高齢化に伴い、神経障害の後遺症や認知機能障害はHIV感染患者やその介護者に負担が多く、更に社会経済的な問題を孕んでいるが故にHANDのみならずほか神経症状の発症に対しての対策が考慮されるべきである。

文献

- 1) UK Collaborative HIV Cohort (CHIC) Study Steering Committee: HIV-associated central nervous system diseases in the recent combination antiretroviral therapy era. Eur J Neurol 18: 527-534, 2011.
- 2) Everall I, Vaida F, Khanlou N, et al: Cliniconeuropathologic correlates of human immunodeficiency virus in the era of antiretroviral therapy. J Neurovirol 15: 360-370, 2009.
- 3) McArthur JC, Brew BJ, Nath A : Neurological complications of HIV infection. Lancet Neurol 4: 543-55, 2005.
- 4) Robertson KR, Smurzynski M, Parsons TD, et al: The prevalence and incidence of neurocognitive impairment in the HAART era. AIDS 21:1915-1921, 2007.
- 5) Antinori A, Arendt G, Becker JT, et al: Updated research nosology for HIV-associated neurocognitive disorders. Neurology 69:1789-1799, 2007.
- 6) Heaton RK, Clifford DB, Franklin DR Jr, et al: HIV-associated neurocognitive disorders persist in the era of potent antiretroviral therapy: CHARTER Study. Neurology 75:2087-2096, 2010.
- 7) Simioni S, Cavassini M, Annoni J, et al: cognitive dysfunction in HIV patients despite long-standing suppression of viremia. AIDS 24:1243-1250,2010.
- 8) Heaton RK, Franklin DR, Ellis RJ, et al: HIV-associated neurocognitive disorders before and during the era of combination antiretroviral therapy: differences in rates, nature, and predictors. J Neurovirol 17:3-16, 2011.
- 9) Anthony IC, Ramage SN, Carnie FW, et al: Influence of HAART on HIV-related CNS disease and neuroinflammation. J Neuropathol Exp Neurol 64: 529-536, 2005.
- 10) Kumar AM, Borodowsky I, Fernandez B, et al: Human immunodeficiency virus type 1 RNA Levels in different regions of human brain: quantification using real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. J Neurovirol 13: 210-224, 2007.
- 11) Gisolf EH, van Praag RM, Jurriaans S, et al: Increasing cerebrospinal fluid chemokine concentrations despite undetectable cerebrospinal fluid HIV RNA in HIV-1-infected patients receiving antiretroviral therapy. J Acquir Immune Defic Syndr 25:426-433, 2000.
- 12) Edén A, Price RW, Spudich S, et al: Immune activation of the central nervous system is still present after >4 years of effective highly active antiretroviral therapy. J Infect Dis 196:1779-1783, 2007.
- 13) Edén A, Fuchs D, Hagberg L, et al: HIV-1 viral escape in cerebrospinal fluid of subjects on suppressive antiretroviral treatment. J Infect Dis 202:1819-1825, 2010.
- 14) Cardenas VA, Meyerhoff DJ, Studholme C, et al: Evidence for ongoing brain injury in human immunodeficiency virus-positive patients treated with antiretroviral

- therapy. J Neurovirol 15:324-333, 2009.
- 15) Letendre SL, Ellis RJ, Ances BM, et al: Neurologic complications of HIV disease and their treatment. Top HIV Med. 18: 45-55, 2010.
- 16) Schouten J, Cinque P, Gisslen M, et al: HIV-1 infection and cognitive impairment in the cART era: a review. AIDS 25: 561-575, 2011.

Clinico-pathological findings of HIV- associated encephalopathy

Shuji Kishida

Key words: HIV- associated encephalopathy, HIV-associated neurocognitive disorders, combination antiretroviral therapy

Department of Neurology, Tokyo Metropolitan Cancer and Infectious Disease Center
Komagome Hospital

〈シンポジウムV〉 神経ウイルス感染症の最前線

HTLV-1関連脊髄症の病因と病態

齊藤峰輝

【要旨】ヒトT細胞白血病ウイルス(Human T-cell leukemia virus type 1: HTLV-1)関連脊髄症(HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: HAM/TSP)は、HTLV-1感染者の一部に発症する痙性脊髄麻痺・膀胱直腸障害を呈する神経疾患である。生体内のHTLV-1感染細胞数が多いほどHAM/TSP発症リスクが増加することが知られているが、現在のところ発症原因の解明と根治的治療法の確立には至っていない。本稿では、HAM/TSPの病態解明に関する研究成果について最新の知見を含めて概説する。

Key words: HTLV-1、HAM/TSP、宿主免疫応答、疾患感受性遺伝子

はじめに

ヒトT細胞白血病ウイルス1型(Human T cell leukemia virus type 1: HTLV-1)は世界で初めてヒト疾患との関連が見いだされたレトロウイルスであり、HTLV-1関連脊髄症(HTLV-1-associated myelopathy/ tropical spastic paraparesis: HAM/TSP)および成人T細胞白血病(Adult T-cell leukemia: ATL)の原因ウイルスである。ATLやHAM/TSPを発症するのは感染者の5%前後ではあるが、ATLは最も悪性度の高い造血器腫瘍のひとつであり、HAM/TSP患者では約40%が経過中に歩行不能となり生活の質が著しく障害される。2010年に国立感染症研究所から報告された全国調査によると、我が国にはいまだに先進国で最多の約108万人ものHTLV-1感染者が存在しており、従来多かった九州・沖縄では減少しているものの都市部では逆に増加していることが明らかになっている。HTLV-1感染症の制圧は、我が国の公衆衛生上・医療上の緊急の課題であるだけでなく、世界のHTLV-1感染地域のうち先進国は日本のみであることから、我が国における研究成果が感染地域諸国から期待されている点でも重要である。

I. HAM/TSPの臨床所見

HAM/TSPの患者数は国内に約1500例、世界では医療機関で診断されている症例だけで少なくとも3000例以上と推定されている。多くの臓器特異的自己免疫疾患と同様にHAM/TSP患者は約1:2～1:3の比率で女性に多く^{1),2)}、平均発症年齢は45.1±16.5歳である²⁾。主要な臨床症状は、両下肢の緩徐進行性痙性不全対麻痺であるが、排尿困難、頻尿、便秘などの膀胱直腸障害が歩行障害に先行して病初期より認められることもある。神経学的診察にて下肢の深部腱反射亢進、明瞭なバビンスキー徵候が認められる。感覺障害は運動障害に比較して軽度であるが、自覚的なしびれ感や痛みを訴える症例も多い。HAM/TSP患者の血清抗HTLV-1抗体価はATL患者、無症候性キャリアー(asymptomatic carrier: AC)と比較して有意に高く、リウマチ因子(18.3%)、抗核抗体(22%)、抗SS-A抗体(23.4%)、抗SS-B(9.7%)抗体、platelet associated IgG(30%)など多くの自己抗体陽性例が認められ、Tリンパ球性肺胞症(70%)、シエグレン症候群(25%)、関節症(20%)、ぶどう膜炎(15%)、多発筋炎(5%)などの自己免疫疾患を含む炎症性疾患の合併例も多い²⁾。髄液検査で

は、軽度の細胞数增多、髄液内 IgG 産生亢進とともに、活性化 T 細胞由来インターフェロン・ガンマ (Interferon- γ : IFN- γ) の刺激によりマクロファージが放出するネオブテリンの増加が認められ³⁾、髄腔内での活発な炎症を反映した所見と考えられる。特徴的な臨床症状、神経所見に加え、血清・髄液中に抗 HTLV-1 抗体を検出することで診断自体は比較的容易である。現在のところ HAM/TSP に対する保険適応のある治療薬は Interferon (IFN) - α ⁴⁾ のみであるが、副腎皮質ステロイドや免疫抑制剤など免疫抑制・免疫調節効果のある薬剤の有効性が報告されている²⁾。

II. HAM/TSP の病理所見

HAM/TSP の脊髄では、リンパ球およびマクロファージを主体とした炎症細胞が小血管周囲を中心に浸潤、集簇する特徴的な病変が認められる。病変は、脊髄側索を中心に左右対称性に中部胸髄から下部胸髄にかけて、髓鞘および軸索の変性、グリオーシスを伴って広がっており、くも膜下腔の細胞性炎症、くも膜の肥厚も伴っている⁵⁾。このような活発な細胞性炎症所見は、特に発症後早期の罹病期間の短い症例で明瞭に観察され、発病後長期を経た症例では軽微である。同様の細胞浸潤は、程度は軽いものの大脳にも認められることが報告されている⁶⁾。HAM/TSP 脊髄病巣における HTLV-1 については、In situ PCR、in situ hybridization と各種細胞表面マーカーによる免疫組織化学を組み合わせた検討から、プロウイルスゲノムの存在⁷⁾、ウイルス mRNA の発現⁸⁾ は共に局所の浸潤 T 細胞に限局し、神経細胞には認められない。

III. HAM/TSP 発症を規定する因子

1. Tax サブタイプ

2000年に報告された鹿児島県における解析から、HTLV-1 の転写調節因子 Tax の遺伝子配列には2つのサブタイプが存在し、そのうちサブタイプ A を持つ感染者はサブタイプ B を持つ感染者と比較して、後述するヒト白血球型抗原 (Human Leukocyte Antigen : HLA) の影響とは独立して HAM/TSP 発症の Odds が約2倍高いことが報告された⁹⁾。

2. 疾患感受性遺伝子 - HLA

HTLV-1 感染者の末梢血リンパ球は、培養系に移すとマイトジエン・T 細胞増殖因子・HTLV-1

抗原による刺激なしで自律的に増殖するが、この自己増殖反応は HAM/TSP 患者のリンパ球において特に強く、一方 HAM/TSP 患者では抗 HTLV-1 抗体値が血清・髄液とともに ATL 患者、AC より有意に高い。生体内での感染細胞数を反映する HTLV-1 プロウイルス量は HAM/TSP 患者において AC の7~16倍に増加しているのみならず、HAM/TSP 患者を血縁を持つ AC では、家族歴のない AC より有意に高い。このことは、HAM 発症、HAM 患者の HTLV-1 に対する高免疫応答と宿主遺伝的要因との関連を強く示唆している¹⁰⁾。実際に、国内の高感染地域である鹿児島県の HTLV-1 感染者を対象とした研究から、HLA クラス I の HLA-A*02 と HLA-Cw*08 を持つ個体が HAM/TSP 群で AC 群より有意に少なく HAM/TSP 発症抑制に関与していることが、HLA クラス I の HLA-B*54 と HLA クラス II の HLA-DRB1*0101 を持つ個体が HAM/TSP 群で AC 群より有意に多く HAM/TSP 発症促進に関与していることが報告された。同時に、HLA-A*02、Cw*08 を持つ AC においては、HTLV-1 プロウイルス量が非保有者の約1/3 と有意に低下していること、HLA-DRB1*0101 陽性の HAM/TSP 患者群では HLA-DRB1*0101 陰性群と比較して HTLV-1 プロウイルス量が有意に低い、つまりより低いプロウイルス量で HAM/TSP を発症していることも示された^{11), 12)}。

3. 非 HLA 疾患感受性遺伝子

一方、合計100種類以上の非 HLA 宿主遺伝子多型 (SNPs, VNTR または CA repeat) の解析から、脊髄内の小血管内皮細胞基底膜の主な構成蛋白である4型コラーゲンを主に分解することで細胞の血管外への遊走に関与しているとされる蛋白分解酵素 matrix metalloproteinase (MMP)-9 遺伝子のプロモーターに存在する CA repeat の延長¹³⁾、脊髄マトリックス構成蛋白質である Aggrecan 遺伝子の翻訳領域に存在する VNTR 多型の 1630bp アレル¹⁴⁾ および腫瘍壞死因子 (Tumor necrosis factor- α : TNF- α) 遺伝子のプロモーターに存在する -863A/C 多型の A アレル¹⁵⁾ が HAM/TSP 発症の危険率を上げることが明らかになった。一方、stromal cell-derived factor (SDF)-1 遺伝子のプロモーターに存在する -863A 3' UTR¹⁵⁾、Interleukin (IL)-10 -592A¹⁶⁾、Vitamin D receptor exon 9 ApaI 多型¹⁷⁾ が HAM/TSP 発症の危険率を下げ、IL-15 191C は、HTLV-1 ウィルス量の低下している感

染者に多いことが示された¹⁵⁾。これらHAM/TSP群とAC群でアレル頻度に有意差を認めた宿主遺伝子のうち、MMP-9プロモーターとIL-10プロモーターがHTLV-1 Tax蛋白により転写活性化され、各遺伝子多型がTaxを介する宿主遺伝子の転写活性化効率に影響することが報告された。すなわち、HAM/TSP群に高頻度に認められたMMP-9の長いCA repeatとIL-10の-592 Cアレルを持つプロモーターは、短いCA repeat、-592 Aアレルを持つプロモーターと比較してどちらもTaxを介する転写活性化能が有意に高かつた^{13),16)}。

これらの成果は、遺伝的に規定されたHTLV-1感染に対する宿主遺伝子の応答効率の違いとウイルス遺伝子型の双方が疾患感受性に深くかかわっていることを示している。

4. HTLV-1のヒトゲノム挿入部位

最近、HTLV-1のヒトゲノム挿入部位の網羅的な解析結果が英国のBanghamらのグループによって報告された¹⁸⁾。彼らはハイスクープットなゲノムマッピング法を用いて、61例のHTLV-1感染者（AC 14例、HAM/TSP 26例、ATL 20例、ぶどう膜炎1例）の末梢血単核球（peripheral blood mononuclear cell: PBMC）における91,000以上のHTLV-1プロウイルス挿入部位（UIS: Unique insertion site）を同定し、感染者にはPBMC由来ゲノムDNA 10 μgあたり500から5000のUISがあることを示した。さらに、生体内でのHTLV-1感染細胞のクローナル多様性を定量可能な「オリゴクローナル指数（oligoclonality index: OCI）」を設定してHTLV-1感染細胞のin vivoにおけるクローナリティを定量し、OCIがHAM患者とACとの間でほぼ同等であり、HAM患者、ACいずれにおいてもOCIとHTLV-1プロウイルス量との間に相関関係が認められないことを明らかにした。このことは、HAM患者における高プロウイルス量（＝感染細胞数）が、従来考えられていたようなクローナルな感染細胞の増殖によるのではなく、生体内に多くの感染細胞クローナルが存在することによって維持されていることを示しており、極めて興味深い所見である。一方彼らは、生体内でのHTLV-1クローナル数は、HTLV-1プロウイルス挿入部位周囲のゲノム環境に大きく影響を受けることも明らかにした。すなわち、HTLV-1プロウイルスが活発に転写を行っている宿主遺伝子と同方向に挿入された場合には、感染細胞はクローナル

殖しやすい傾向があり、反対にプロウイルスが転写抑制状態のゲノム領域に挿入された場合には、感染細胞のクローナル増殖は抑制される。以上の結果から、ACではHAM/TSP患者と比較して、慢性感染時に認められるCTLによる負のクローナル選択が起こりやすく、病原性の低い感染細胞クローナルが選択されやすいとの仮説を提唱している。

IV. HTLV-1に対する宿主免疫応答

1. NK細胞・NKT細胞

NK細胞は、直接的な細胞障害活性を介して自然免疫を司るのみならず、樹状細胞やT細胞との相互作用を介して獲得免疫応答形成にも影響することが近年明らかになりつつある。HAM/TSP患者では、末梢血中NK細胞の頻度¹⁹⁾ならびに抗体依存性細胞介在性細胞障害（Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity: ADCC）²⁰⁾活性が低下していることが、すでに1990年代初頭には報告されていた。2003年には、NK細胞の抑制性受容体の一つNKG2AのリガンドであるHLA-Eのテトラマーを用いたHTLV-1感染者末梢血の解析結果から、HAM/TSP患者ではACに比較してCD3陽性のテトラマー陽性細胞、つまりNKT細胞に相当する細胞群の頻度が有意に低下する一方で、この細胞群のクローナリティは逆に集積していることが報告された²¹⁾。HAM/TSP患者における末梢血中NKT細胞の低下は、近年の日本²²⁾、米国および南米²³⁾の症例による解析で再確認されている。一方、乳酸菌飲料の服用によりNK細胞活性が回復したHAM/TSP患者において、臨床症状も改善したとの報告もあり²⁴⁾、NK細胞・NKT細胞がHAM/TSPの病態形成に関与することは明らかであろう。

2. 体液性免疫

HTLV-1感染者では、その血清中にHAM/TSP患者、ACとともにIgM抗体を含む抗HTLV-1抗体が検出される²⁵⁾。また、先述したようにHAM/TSP患者では抗HTLV-1抗体価が血清・髄液とともにATL患者、ACより有意に高く、これは同程度のプロウイルス量を持つ症例を比較した場合でも同じである^{25),26)}。すなわち、HTLV-1蛋白（抗原）はHTLV-1感染者の体内で持続的に発現しており、HAM/TSP患者ではその発現が増強していることが考えられる。血清中の抗HTLV-1特異的抗体の免疫優性エピトープ（immunodominant epitope）はATL患者、HAM/TSP患者、ACい

ずれにおいても HTLV-1 のエンベロープ (Env) 蛋白上に存在するが、Tax 蛋白に対する抗体は、HAM/TSP 患者 (71-93%) では ATL 患者 (4-31%) や AC (27-37%) と比較して出現頻度が高い²⁷⁾。

米国の Levin らは、HTLV-1 の Tax 蛋白を認識する抗体が RNA 結合タンパク質 A1 (heterogeneous nuclear riboprotein A1: hnRNP-A1) と交差反応し、神経細胞の活動に影響しているとする実験結果を 2002 年に報告した²⁸⁾。彼らの検討では、抗 hnRNP-A1 抗体は HAM/TSP 患者全例 (10 例中 10 例) に検出されたため、HTLV-1 関連疾患発症における分子相同性 (molecular mimicry) の意義が注目されたが、我々が多数の検体を用いて二重盲検法により検証したところ、その検出率は HAM/TSP 患者においてわずかに 35.0% (40 例中 14 例) であり、HAM/TSP 患者のみならず多発性硬化症 (71.4% : 28 例中 20 例)、ウイルス性髄膜炎 (31.3% : 16 例中 5 例) など、他の神経疾患患者においても検出され、HAM/TSP に対する疾患特異性は確認されなかつた²⁹⁾。hnRNP-A1 が神経細胞特異的な分子でなく普遍的に存在する分子であること、抗体が直接作用しにくい核内に存在することから、Tax と交差反応する抗 hnRNP-A1 抗体は HAM/TSP の発症に直接関与するのではなく、炎症による組織破壊により血液脳関門が破綻した後に、大量に放出された自己抗原に反応した 2 次的な現象と考えられる。

3. ヘルパー T 細胞

CD4 陽性 T 細胞は、ヘルパー T 細胞として免疫応答における司令塔的役割を担う重要な細胞であるが、同時に HTLV-1 の主要な感染標的細胞でもある。末梢血中の HTLV-1 特異的ヘルパー T 細胞の頻度や、末梢血 CD4 陽性 T 細胞分画内における IFN-γ、インターロイキン 2 (Interleukin-2: IL-2)、TNF-α 産生細胞の頻度は、同じプロウイルス量であっても AC より HAM/TSP 患者で有意に高く、HAM/TSP 患者は臓器特異的自己免疫疾患の患者でよくみられる Th1 細胞優位な状態にあることが報告されている^{30,31)}。また、HTLV-1 特異的ヘルパー T 細胞のレセプター Vβ における相補性決定領域 (complementarity determining region 3: CDR3) の解析結果は、単に感染 CD4 細胞が増殖した結果として HTLV-1 特異的ヘルパー T 細胞が高頻度に認められるのではなく、生体内で主要組織適合遺伝子複

合体 (major histocompatibility complex: MHC) 抗原 - ペプチド複合体による選択を受けた結果でもあることを示唆している³²⁾。HTLV-1 特異的ヘルパー T 細胞の標的抗原エピトープは HAM/TSP 患者、AC を問わず主に Env 上に存在するが³³⁾、日本とイランという民族的にまったく異なる感染地域において共通の HAM/TSP 発症促進 HLA である³⁴⁾ HLA-DRB1*0101 が、ヘルパー T 細胞の dominant epitope を拘束すること³⁵⁾、HLA-DRB1*0101 陽性の HAM/TSP 患者群では陰性群と比較して有意にプロウイルス量が低いこと¹¹⁾から、ヘルパー T 細胞による HTLV-1 に対する過剰な免疫応答の誘導が HAM/TSP 発症に密接に関与することが考えられる。

4. 細胞傷害性 T 細胞

HTLV-1 特異的ヘルパー T 細胞が Env を認識するのに対して、HTLV-1 感染細胞に対する細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte: CTL) の多くは Tax を標的としており³⁶⁾、HLA-A*02 に拘束される Tax の 11~19 番目のアミノ酸が特に強力なエピトープである。このことと、先述したように HLA-A*02 を持つ個体が HAM/TSP 群で AC 群より有意に少ないと、HLA-A*02 を持つ AC では持たない AC より HTLV-1 プロウイルス量が有意に低いことから、HAM/TSP 抑制 HLA アリルは効率のよい CTL による感染細胞の認識・排除機構によって HAM/TSP 発症に関与しているとの仮説が提唱されている³⁷⁾。実際に、HAM/TSP 患者では AC と比較して HTLV-1 特異的 CTL の機能が低下していることが報告されており³⁸⁾、鹿児島県における HLA 痠学の結果と合わせ、この仮説を強く支持する所見である。

5. 樹状細胞

樹状細胞 (dendritic cell: DC) は、自己の MHC 上に抗原をのせて T 細胞受容体 (T cell receptor: TCR) に提示する最も強力な抗原提示細胞である。1992 年には HAM/TSP 患者の DC に HTLV-1 が感染していること³⁹⁾が、1993 年には健常者の DC に HTLV-1 を感染させると自己 T 細胞の著しい増殖を誘導すること⁴⁰⁾が in vitro の実験で報告された。先述したように、HTLV-1 感染者の末梢血リンパ球を in vitro で培養すると、増殖因子等を添加しなくても活発な自発増殖現象が起こり、これは特に HAM/TSP 患者において顕著であることが知られている。この HAM/TSP 患者末梢血リンパ球の培養系から DC を除くと自発増殖現象が見られなくなること³⁹⁾、抗 MHC

class II抗体、抗CD86抗体、抗CD58抗体の培養系への添加によっても同様の抑制が起こること⁴¹⁾が明らかにされ、DCの末梢血リンパ球の自発増殖現象とHAM/TSP病態への関与を示唆している。2008年には、Cell-freeのHTLV-1ウイルスがDCに効率よく感染し、ウイルスを感染効率の悪いCD4陽性T細胞に伝達すること⁴²⁾が、2009年には当初報告されたCD4陽性CD25陽性T細胞ではなく、DCこそがTax特異的CD8陽性T細胞の誘導と機能維持に関与する細胞であることが示された⁴³⁾。さらに、HTLV-1のDCからT細胞への伝播にはDendritic Cell Specific ICAM-3 Grabbing Non-integrin(DC-SIGN)が関与していること⁴⁴⁾、in vitro, in vivo双方においてDCがTax特異的CD8陽性T細胞の誘導と維持に関与していること⁴³⁾が報告された。トランシジェニックマウスを用いたHTLV-1感染モデルの解析からは、DCがHTLV-1感染に対する自然免疫、獲得免疫の誘導に不可欠であることが示されている^{45),46)}。HTLV-1が単球からDCへの分化を阻害するとする報告もあり⁴⁷⁾、近年DCのHAM/TSP病態における重要性が再認識されるとともに、免疫療法の細胞ソースとしても期待されている。

6. 制御性T細胞(Regulatory T Cell: Treg)

HTLV-1感染細胞ならびに典型的なATL細胞がCD4陽性CD25陽性の活性化ヘルパーT細胞のフェノタイプを示すことは早くから明らかになっていた。このCD4陽性CD25陽性細胞のうち、転写因子FoxP3陽性の細胞群が制御性T細胞(Regulatory T Cell: Treg)である。Tregが免疫寛容の機構に関与し、自己免疫疾患発症を抑制することから、HAM/TSP患者におけるTregについて検討された。米国のグループによる当初の報告では、HAM/TSP患者の末梢血においてCD4陽性CD25陽性FoxP3陽性細胞の頻度が減少しており、Tax遺伝子をヒトT細胞に導入することでFoxP3の発現低下と自己活性化T細胞に対する増殖抑制機能の低下が観察されたことから、TaxによるTregの機能低下がHAM/TSP発症に関与するとされた⁴⁸⁾。しかしながら、CD25分子は活性化T細胞に発現し、かつTaxにより発現誘導される⁴⁹⁾ことから、HTLV-1感染者における末梢血中CD4陽性CD25陽性FoxP3陽性細胞の頻度はCD4陽性CD25陽性細胞の頻度上昇により相対的に低下してしまうため、CD4陽性CD25陽性FoxP3陽性細胞をTregのマーカーと

して用いるには問題がある。実際、このことに留意してCD4陽性FoxP3陽性細胞をTregのマーカーとして解析した英國⁵⁰⁾および日本⁵¹⁾からの報告では、いずれもCD4陽性FoxP3陽性細胞の頻度は逆にHAM/TSP患者末梢血において高く、かつHTLV-1プロウイルス量と相關することが示されている。同時に、末梢血中のCTL活性がHTLV-1未感染のCD4陽性FoxP3陽性細胞の頻度と逆相関することも報告されており⁵⁰⁾、HTLV-1未感染TregによるCTLの機能制御がプロウイルス量増加とHAM/TSP発症に関連していることが考えられる。一方、多数のヒトT細胞株を検討した報告では、FoxP3 mRNAの発現はむしろHTLV-1感染細胞株において高く、FoxP3 mRNAと蛋白の発現量は必ずしも相關していない⁵²⁾。最近、HTLV-1のマイナス鎖にコードされるHTLV-1 bZIP factor(HBZ)がFoxp3遺伝子の転写を誘導することが報告されており⁵³⁾、Taxが実際にHTLV-1感染者の生体内においてFoxP3の発現調節に関与するか否かについては、さらなる検証が必要である。

V. HAM/TSPの病態形成機序

以上述べた臨床検査所見、免疫学的、ウイルス学的、細胞生物学的知見から、HAM/TSPの病因・病態形成について以下のような機序が想定されている(図1)。

- 大部分のHTLV-1感染者では、ウイルス感染細胞は宿主の免疫システムにより適切に制御され、感染細胞数(HTLV-1プロウイルス量)は低い水準で抑えられているため、長い年月にわたり宿主と共に存して無症候のまま経過し、疾患を誘発しない。
- しかし、一部の感染者においては、ウイルス因子・宿主側の免疫遺伝学的因子によって複雑に規定されたHTLV-1に対するきわめて高反応ではあるが、同時にきわめて効率の悪い(すなわち、ウイルス感染細胞を排除できない)免疫応答が起り、感染リンパ球数(HTLV-1プロウイルス量)の増加、抗HTLV-1抗体値の上昇、制御性T細胞へのHTLV-1感染による過剰な免疫応答に対する抑制機構の破綻などが起こり、持続的な抗原刺激による宿主免疫系の疲弊が緩慢に進行する。
- 宿主の適切な免疫応答機構の障害により、ウイルスの排除、増殖の抑制につながらないまま、さらなる免疫担当細胞(DCやHTLV-1感染リンパ

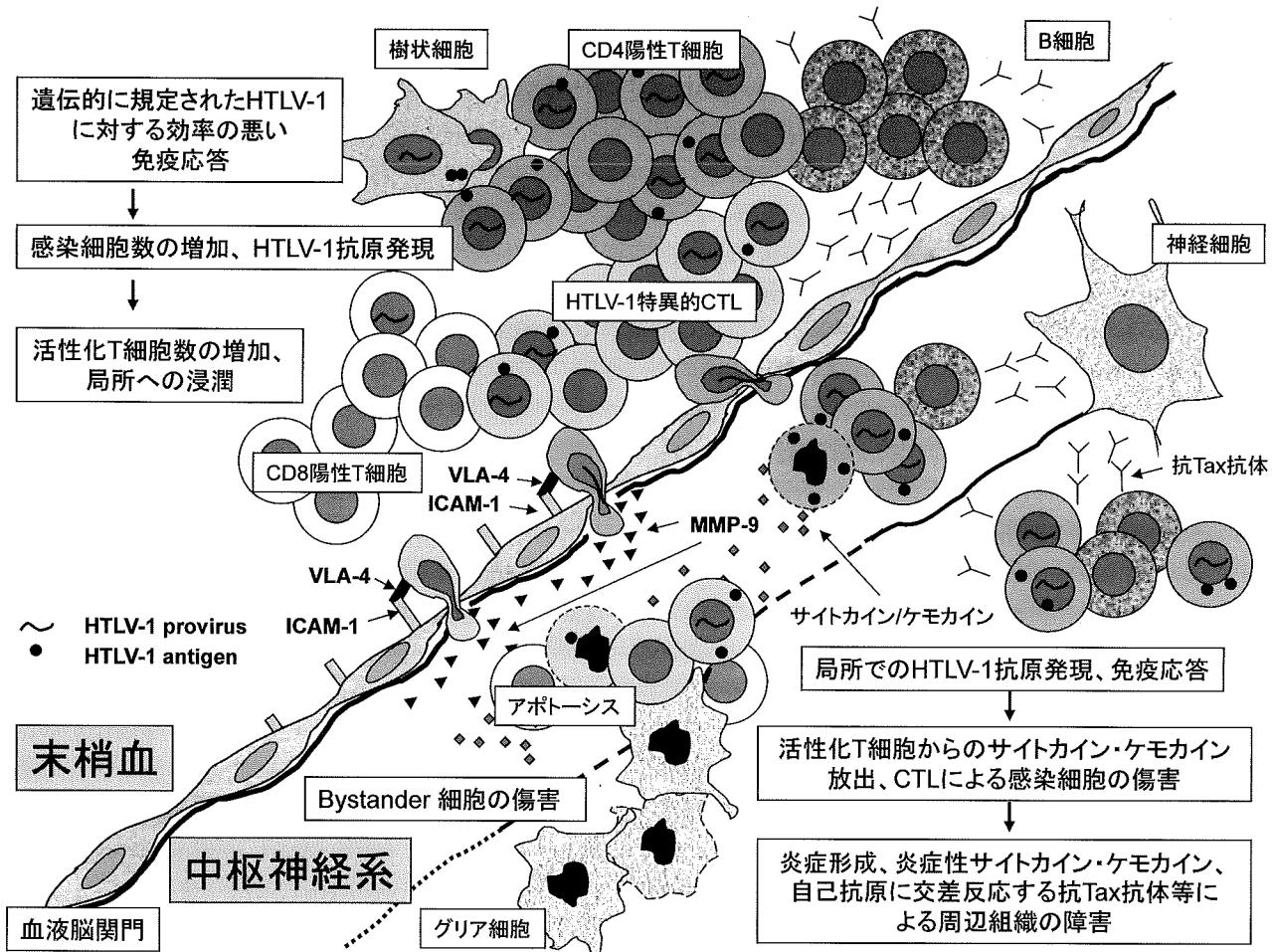


図1

球を含む) の過剰な活性化が起こり、サイトカイン、ケモカイン、細胞接着因子、プロテアーゼなど宿主細胞性因子の適切な制御機構が破綻し、標的臓器への浸潤と破壊が起こりやすい状態になる。

4. 感染細胞が血液脳関門などの生体内のバリアーを突破して標的臓器に到達した後に、局所でのHTLV-1ウイルス抗原の発現などにより、周辺の細胞を巻き込んだ形での非常に強い抗ウイルス免疫応答が起こり、最終的に炎症性サイトカイン等のエフェクター分子による浸潤細胞周囲の組織破壊が引き起こされる。

5. 細胞の破壊により放出された多量の自己抗原が宿主の免疫系に暴露されることで、自己反応性の免疫担当細胞クローニングの活性化や、自己抗体の産生などの連鎖反応が起こり、さらに病態が悪化する。

おわりに

HAM/TSPは生命予後としては比較的良好な疾患ではあるが、長期にわたる療養が強いられる上に合

併症も多く、患者の負担が非常に大きいため、一刻も早い治療法の開発が望まれる。幸い、ここ数年の解析技術の著しい進歩により、治療標的となりうる細胞や分子に対する理解が急速に深まりつつある。今後、発症予防・治療につながる成果が早期に得られることが期待される。

文献

- 1) Hisada M, Stuver SO, Okayama A, et al. Persistent paradox of natural history of human T lymphotropic virus type I: parallel analyses of Japanese and Jamaican carriers. *J Infect Dis.* 2004;190:1605-1609.
- 2) Nakagawa M, Izumo S, Ijichi S, et al. HTLV-I-associated myelopathy: analysis of 213 patients based on clinical features and laboratory findings. *J Neurovirol.* 1995;1:50-61.

- 3) Nomoto M, Utatsu Y, Soejima Y, Osame M. Neopterin in cerebrospinal fluid: a useful marker for diagnosis of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Neurology*. 1991;41:457.
- 4) Saito M, Nakagawa M, Kaseda S, et al. Decreased human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) provirus load and alteration in T cell phenotype after interferon-alpha therapy for HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Infect Dis*. 2004;189:29-40.
- 5) Izumo S, Umehara F, Osame M. HTLV-I-associated myelopathy. *Neuropathology*. 2000;20 Suppl:S65-68.
- 6) Aye MM, Matsuoka E, Moritoyo T, et al. Histopathological analysis of four autopsy cases of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: inflammatory changes occur simultaneously in the entire central nervous system. *Acta Neuropathol*. 2000;100:245-252.
- 7) Matsuoka E, Takenouchi N, Hashimoto K, et al. Perivascular T cells are infected with HTLV-I in the spinal cord lesions with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: double staining of immunohistochemistry and polymerase chain reaction in situ hybridization. *Acta Neuropathol*. 1998;96:340-346.
- 8) Moritoyo T, Reinhart TA, Moritoyo H, et al. Human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy and tax gene expression in CD4+ T lymphocytes. *Ann Neurol*. 1996;40:84-90.
- 9) Furukawa Y, Yamashita M, Usuku K, Izumo S, Nakagawa M, Osame M. Phylogenetic subgroups of human T cell lymphotropic virus (HTLV) type I in the tax gene and their association with different risks for HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Infect Dis*. 2000;182:1343-1349.
- 10) Nagai M, Usuku K, Matsumoto W, et al. Analysis of HTLV-I proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-I carriers: high proviral load strongly predisposes to HAM/TSP. *J Neurovirol*. 1998;4:586-593.
- 11) Jeffery KJ, Usuku K, Hall SE, et al. HLA alleles determine human T-lymphotropic virus-I (HTLV-I) proviral load and the risk of HTLV-I-associated myelopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:3848-3853.
- 12) Jeffery KJ, Siddiqui AA, Bunce M, et al. The influence of HLA class I alleles and heterozygosity on the outcome of human T cell lymphotropic virus type I infection. *J Immunol*. 2000;165:7278-7284.
- 13) Kodama D, Saito M, Matsumoto W, et al. Longer dinucleotide repeat polymorphism in matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) gene promoter which correlates with higher HTLV-I Tax mediated transcriptional activity influences the risk of HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *J Neuroimmunol*. 2004;156:188-194.
- 14) Nobuhara Y, Usuku K, Saito M, et al. Genetic variability in the extracellular matrix protein as a determinant of risk for developing HTLV-I-associated neurological disease. *Immunogenetics*. 2006;57:944-952.
- 15) Vine AM, Witkover AD, Lloyd AL, et al. Polygenic control of human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) provirus load and the risk of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Infect Dis*. 2002;186:932-939.
- 16) Sabouri AH, Saito M, Lloyd AL, et al. Polymorphism in the interleukin-10 promoter affects both provirus load and the risk of human T lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Infect Dis*. 2004;190:1279-1285.
- 17) Saito M, Eiraku N, Usuku K, et al. ApaI polymorphism of vitamin D receptor gene is associated with susceptibility to HTLV-

- 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in HTLV-1 infected individuals. *J Neurol Sci.* 2005;232:29-35.
- 18) Gillet NA, Malani N, Melamed A, et al. The host genomic environment of the provirus determines the abundance of HTLV-1-infected T-cell clones. *Blood.* 2011;117:3113-3122.
- 19) Yu F, Itoyama Y, Fujihara K, Goto I. Natural killer (NK) cells in HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis-decrease in NK cell subset populations and activity in HTLV-I seropositive individuals. *J Neuroimmunol.* 1991;33:121-128.
- 20) Fujihara K, Itoyama Y, Yu F, Kubo C, Goto I. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) in HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *J Neurol Sci.* 1996;142:65-69.
- 21) Saito M, Braud VM, Goon P, et al. Low frequency of CD94/NKG2A+ T lymphocytes in patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis, but not in asymptomatic carriers. *Blood.* 2003;102:577-584.
- 22) Azakami K, Sato T, Araya N, et al. Severe loss of invariant NKT cells exhibiting anti-HTLV-1 activity in patients with HTLV-1-associated disorders. *Blood.* 2009.
- 23) Ndhlovu LC, Snyder-Cappione JE, Carvalho KI, et al. Lower numbers of circulating natural killer T (NK T) cells in individuals with human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) associated neurological disease. *Clin Exp Immunol.* 2009.
- 24) Matsuzaki T, Saito M, Usuku K, et al. A prospective uncontrolled trial of fermented milk drink containing viable Lactobacillus casei strain Shirota in the treatment of HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Neurol Sci.* 2005;237:75-81.
- 25) Kira J, Nakamura M, Sawada T, et al. Antibody titers to HTLV-I-p40tax protein and gag-env hybrid protein in HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: correlation with increased HTLV-I proviral DNA load. *J Neurol Sci.* 1992;107:98-104.
- 26) Ishihara S, Okayama A, Stuver S, et al. Association of HTLV-I antibody profile of asymptomatic carriers with proviral DNA levels of peripheral blood mononuclear cells. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1994;7:199-203.
- 27) Lal RB, Giam CZ, Coligan JE, Rudolph DL. Differential immune responsiveness to the immunodominant epitopes of regulatory proteins (tax and rex) in human T cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy. *J Infect Dis.* 1994;169:496-503.
- 28) Levin MC, Lee SM, Kalume F, et al. Autoimmunity due to molecular mimicry as a cause of neurological disease. *Nat Med.* 2002;8:509-513.
- 29) Yukitake M, Sueoka E, Sueoka-Aragane N, et al. Significantly increased antibody response to heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients but not in patients with human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Neurovirol.* 2008;14:130-135.
- 30) Goon PK, Hanon E, Igakura T, et al. High frequencies of Th1-type CD4(+) T cells specific to HTLV-1 Env and Tax proteins in patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Blood.* 2002;99:3335-3341.
- 31) Goon PK, Igakura T, Hanon E, et al. High circulating frequencies of tumor necrosis factor alpha- and interleukin-2-secreting human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-specific CD4+ T cells in patients with HTLV-1-associated neurological disease. *J Virol.* 2003;77:9716-9722.

- 32) Nose H, Kubota R, Seth NP, et al. Ex vivo analysis of human T lymphotropic virus type 1-specific CD4+ cells by use of a major histocompatibility complex class II tetramer composed of a neurological disease-susceptibility allele and its immunodominant peptide. *J Infect Dis.* 2007;196:1761-1772.
- 33) Goon PK, Igakura T, Hanon E, et al. Human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I)-specific CD4+ T cells: immunodominance hierarchy and preferential infection with HTLV-I. *J Immunol.* 2004;172:1735-1743.
- 34) Sabouri AH, Saito M, Usuku K, et al. Differences in viral and host genetic risk factors for development of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis between Iranian and Japanese HTLV-1-infected individuals. *J Gen Virol.* 2005;86:773-781.
- 35) Kitze B, Usuku K, Yamano Y, et al. Human CD4+ T lymphocytes recognize a highly conserved epitope of human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) env gp21 restricted by HLA DRB1*0101. *Clin Exp Immunol.* 1998;111:278-285.
- 36) Kannagi M, Harada S, Maruyama I, et al. Predominant recognition of human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) pX gene products by human CD8+ cytotoxic T cells directed against HTLV-I-infected cells. *Int Immunol.* 1991;3:761-767.
- 37) Bangham CR. CTL quality and the control of human retroviral infections. *Eur J Immunol.* 2009;39:1700-1712.
- 38) Sabouri AH, Usuku K, Hayashi D, et al. Impaired function of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-specific CD8+ T cells in HTLV-1-associated neurologic disease. *Blood.* 2008;112:2411-2420.
- 39) Macatonia SE, Cruickshank JK, Rudge P, Knight SC. Dendritic cells from patients with tropical spastic paraparesis are infected with HTLV-1 and stimulate autologous lymphocyte proliferation. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1992;8:1699-1706.
- 40) Ali A, Patterson S, Cruickshank K, Rudge P, Dalgleish AG, Knight SC. Dendritic cells infected in vitro with human T cell leukaemia/lymphoma virus type-1 (HTLV-1); enhanced lymphocytic proliferation and tropical spastic paraparesis. *Clin Exp Immunol.* 1993;94:32-37.
- 41) Makino M, Azuma M, Wakamatsu SI, et al. Marked suppression of T cells by a benzothiophene derivative in patients with human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999;6:316-322.
- 42) Jones KS, Petrow-Sadowski C, Huang YK, Bertolette DC, Ruscetti FW. Cell-free HTLV-1 infects dendritic cells leading to transmission and transformation of CD4(+) T cells. *Nat Med.* 2008;14:429-436.
- 43) Manuel SL, Schell TD, Acheampong E, Rahman S, Khan ZK, Jain P. Presentation of human T cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) Tax protein by dendritic cells: the underlying mechanism of HTLV-1-associated neuroinflammatory disease. *J Leukoc Biol.* 2009;86:1205-1216.
- 44) Jain P, Manuel SL, Khan ZK, Ahuja J, Quann K, Wigdahl B. DC-SIGN mediates cell-free infection and transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1 by dendritic cells. *J Virol.* 2009;83:10908-10921.
- 45) Rahman S, Manuel SL, Khan ZK, et al. Depletion of dendritic cells enhances susceptibility to cell-free infection of human T cell leukemia virus type 1 in CD11c-diphtheria toxin receptor transgenic mice. *J Immunol.* 2010;184:5553-5561.
- 46) Rahman S, Khan ZK, Wigdahl B, Jennings SR, Tangy F, Jain P. Murine FLT3 ligand-derived dendritic cell-mediated early immune responses are critical to

- controlling cell-free human T cell leukemia virus type 1 infection. *J Immunol.* 2011;186:390-402.
- 47) Nascimento CR, Lima MA, de Andrade Serpa MJ, Espindola O, Leite AC, Echevarria-Lima J. Monocytes from HTLV-1-infected patients are unable to fully mature into dendritic cells. *Blood.* 2011;117:489-499.
- 48) Yamano Y, Takenouchi N, Li HC, et al. Virus-induced dysfunction of CD4+CD25+ T cells in patients with HTLV-I-associated neuroimmunological disease. *J Clin Invest.* 2005;115:1361-1368.
- 49) Inoue J, Seiki M, Taniguchi T, Tsuru S, Yoshida M. Induction of interleukin 2 receptor gene expression by p40 α encoded by human T-cell leukemia virus type 1. *EMBO J.* 1986;5:2883-2888.
- 50) Toulza F, Heaps A, Tanaka Y, Taylor GP, Bangham CR. High frequency of CD4+FoxP3+ cells in HTLV-1 infection: inverse correlation with HTLV-1-specific CTL response. *Blood.* 2008;111:5047-5053.
- 51) Hayashi D, Kubota R, Takenouchi N, et al. Reduced Foxp3 expression with increased cytomegalovirus-specific CTL in HTLV-I-associated myelopathy. *J Neuroimmunol.* 2008;200:115-124.
- 52) Yamamoto M, Tsuji-Takayama K, Suzuki M, et al. Comprehensive analysis of FOXP3 mRNA expression in leukemia and transformed cell lines. *Leuk Res.* 2008;32:651-658.
- 53) Satou Y, Yasunaga J, Zhao T, et al. HTLV-1 bZIP factor induces T-cell lymphoma and systemic inflammation in vivo. *PLoS Pathog.* 2011;7:e1001274.

〈シンポジウムV〉 神経ウイルス感染症の最前線

アシクロビル耐性単純ヘルペスウイルスによる中枢神経感染症

西條政幸

【要旨】 抗ヘルペスウイルス薬アシクロビル(acyclovir、ACV)による単純ヘルペスウイルス1型(HSV-1)によるヘルペス脳炎(herpes simplex encephalitis、HSE)の治療と薬剤耐性化の問題点を解説する。ACVは、開発されて約40年が経ち、日本で使用されるようになって四半世紀が過ぎた。現在でも、その効果を上回る薬剤はなく、HSEの第一選択治療薬として君臨している。近年、ACV治療に抵抗性を示すHSEの報告が散見される。しかし、実際に脳脊髄液(cerebrospinal fluid、CSF)からHSV-1が分離され、その薬剤感受性が調べられ、ACV耐性HSV-1によるHSEと証明された患者はいない。最近、著者らにより開発された、増幅させたウイルス性チミジンリン酸化酵素遺伝子を哺乳細胞発現ベクターに導入し、293T細胞にトランスフェクションして組換えvTKを発現させ、その細胞におけるACV等のvTK関連薬剤のvTK欠損HSV-1の増殖抑制効果を解析することでvTK関連の薬剤耐性の有無を評価する方法を開発した。今後ACV耐性HSEの診断が可能になる。病原体診断だけでなく薬剤感受性試験成績も参考にして、HSEの治療にあたることが可能になる。

Key words: ヘルペス脳炎、単純ヘルペスウイルス、アシクロビル、薬剤耐性、薬剤感受性試験

はじめに

抗ヘルペスウイルス薬アシクロビル(acyclovir、ACV)は、単純ヘルペスウイルス1型(herpes simplex virus type 1、HSV-1)、同2型(HSV-2)、水痘帶状疱疹ウイルス(varicella-zoster virus、VZV)の α -ヘルペスウイルスに高い増殖抑制効果を示す薬剤である。Elion博士により開発されて約40年が経ち、日本で使用されるようになって四半世紀が過ぎた。未だにHSVによる脳炎(ヘルペス脳炎、herpes simplex encephalitis、HSE)の治療において、ACVの治療効果に勝る薬剤はなく、HSEの治療薬として第一選択薬である。

近年、HSEの治療経過中にACV治療に耐性を示すHSE患者報告が散見されはじめていることから、本稿ではACV耐性HSV-1によるHSEの診断と治療について解説したい。

ヘルペス脳炎とアシクロビル

一般的には、初感染後に三叉神経節等の知覚神経節に潜伏しているHSV-1が再活性化する場合、神経末梢側の皮膚粘膜病変(口唇ヘルペス、眼瞼ヘルペス等)を起こす。しかし、まれに中枢神経側にウイルスが運ばれ、脳炎(HSE)を引き起こす。ただし、新生児ヘルペスに伴う脳炎は、HSV-1やHSV-2による全身感染症に伴う脳炎である。

ACVの作用機序は、以下の通りである(図1)。ACVは、塩基のひとつであるグアノシンの誘導体である。グアノシンと異なるのは糖鎖の部分で、グアノシンのそれは5炭糖(デオキシリボース)であるが、ACVのそれは環状になっていない(<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=2022>)。HSV-1、HSV-2、VZVは感染細胞内で増殖する際に、ウイルス性チミジンリン酸化酵素(viral thymidine kinase、vTK)を発現する。

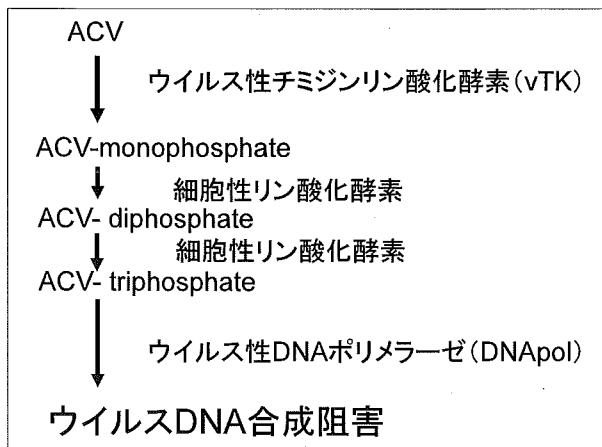


図1 アシクロビルの作用機序

このvTKがACVをリソヌム酸化し、ACV-monophosphateにする。その後この物質は細胞性リソヌム酸化酵素でリソヌム酸化され、ACV-diphosphate（二リソヌム酸体）、次いでACV-triphosphate（三リソヌム酸体）となる。これがHSV-1のDNAポリメラーゼ（DNAPol）活性を阻害することと、ウイルスのDNAに取り込まれてウイルスの遺伝子合成におけるチェーンターミネーターとして機能して、その増殖を抑制する（図1）。細胞毒性は極めて弱く、比較的副作用の少ない抗ウイルス薬である。

ACVによる治療は、vidarabine（アラセナA）のそれに比較してより高い効果が認められた。病理学的に、また、ウイルス学的に確定診断されたHSE患者におけるACVおよびvidarabineによる治療効果を比較した研究では、ACV治療群の機能的予後、完全治癒率がvidarabine治療群のそれよりも高くなることが報告された（図2）¹⁾。現在においても、ACV療法に勝る治療法はない。

薬剤耐性単純ヘルペスウイルスによる脳炎

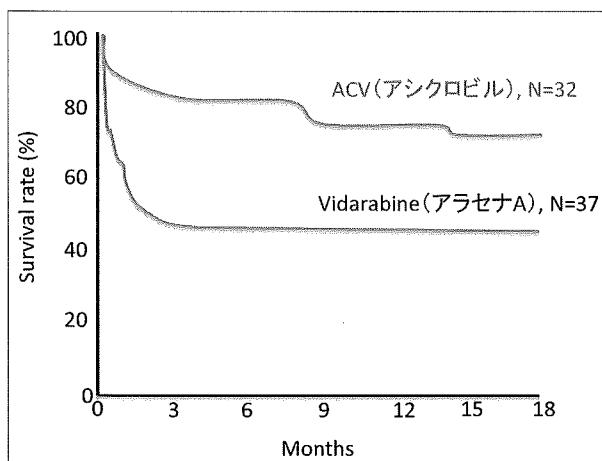


図2 病理学的、ウイルス学的に診断されたHSEに対するACVとvidarabineによる治療効果の比較 (N Engl J Med 314:144-149, 1986、一部改変)

近年、ACV療法に抵抗性を示すHSE患者報告が散見される^{2), 3), 4)}。AIDS患者で発症したACV耐性HSV-2による髄膜脳炎の患者報告⁴⁾においては、病原体が脳脊髄液（cerebrospinal fluid、CSF）や脳組織から分離され、それがACVに耐性を示していることが明らかにされている。しかし、この報告を除いては実際にACV耐性が証明された患者報告はない。それは、CSFからのHSV-1またはHSV-2を分離することは困難であることが原因である。Shulteらの報告²⁾では、CSFから増幅されたHSV-1のvTK遺伝子の塩基配列を解析したところ、ACVに耐性を示すと考えられるアミノ酸変異を誘導する塩基配列が認められたと報告されている。

HSE患者治療において、ACV治療に耐性を示す場合に遭遇しても、なかなか薬剤感受性を調べることは困難な状況にある。

薬剤耐性単純ヘルペスウイルスによる脳炎の診断

HSEの病原診断においては、CSFからの遺伝子検出法が最も感度および精度に優れており、そのための方法としてnested PCR法や高感度リアルタイムPCR法が用いられている。

ACVに対する感受性を解析するには、CSFからHSV-1やHSV-2のvTK遺伝子を直接nested PCR法で増幅させ、その塩基配列を解析することが有用である場合がある。患者から分離されるACV耐性HSV-1の95%はvTK遺伝子に、残りの5%はDNAPol遺伝子に変異が認められる。さらにvTK遺伝子変異では、1塩基の欠損や挿入（多くは連続するGまたはCの塩基配列に認められる）が約50%に認められ、1塩基変位に基づくアミノ酸変位によるものが残りを占める^{5), 6)}。つまり、ACV耐性HSV-1感染症の95%はvTK遺伝子の塩基配列を決定することで、ACVに耐性化否かについて類推することが可能となる。これまでに報告されているACV耐性を誘導するアミノ酸変位や塩基のフレームシフト変位、早期ストップコドン出現変位が認められる場合に、ACVに対する感受性を類推することが可能となる。

筆者らは、検体から直接vTK遺伝子を増幅させ、それを哺乳細胞発現ベクターに導入し、293T細胞にトランスフェクションすることにより組換えvTKを発現させ、その細胞におけるACVのvTK欠損HSV-1の増殖抑制効果を解析することでvTK関

連の薬剤耐性の有無を評価する方法を開発した(図3)⁷⁾。この方法を用いると、CSFからvTK遺伝子を増幅することができれば、CSF中に存在する

HSV-1のACVに対する感受性を類推することが可能となる。

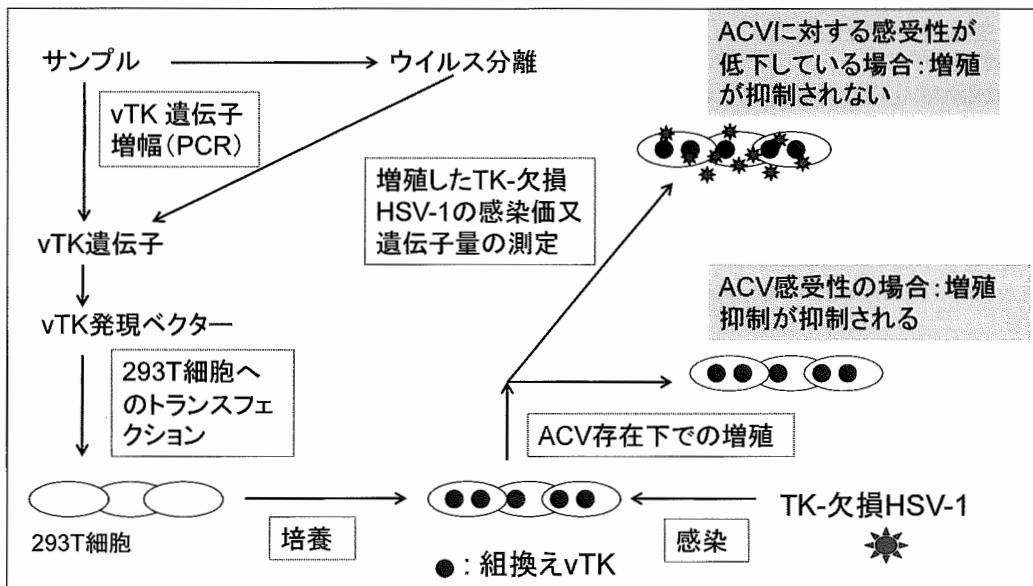


図3 293T細胞に組換えvTKを発現させ、その細胞を用いたvTK関連薬剤感受性を推定するための新規薬剤感受性試験法(Antiviral Res 91:142-149, 2011、一部改変)

薬剤耐性単純ヘルペスウイルスによる脳炎の治療

これまでのところ、厳密に言えばACV治療に耐性を示したHSV-1によるHSEの報告はあっても、ウイルス学的に証明されたACV耐性HSV-1によるHSEの報告はない。ACV治療に耐性を示すHSEに対しては、vTK関連ACV耐性HSV-1に対しても活性がみとめられるvidarabineやDNAポリメラーゼ阻害薬のfoscarnetによる治療が選択される。しかし、ACV耐性HSV-1による重症皮膚粘膜感染症に対してACV高力価持続点滴静注投与が効果的であるとの報告もある^{8), 9)}。ACVはvidarabineやfoscarnetに比較すると安全な薬剤であり、試みる価値のある治療法のひとつと考えられる。

現在のところ、我が国においてはHSV-1、HSV-2、VZV等の薬剤感受性を検査することの可能な施設は限られている。当然、コマーシャルラボにおいては実施されていない。ACV耐性のこれらの感染症にはfoscarnet等、他の作用機序で効果を発揮する薬剤の変更等が求められる。適切に治療するには、迅速な薬剤感受性試験は欠かせない。今後、この領域での環境が整備されることが期待される。

おわりに

ACV耐性HSEに焦点をあてて、その診断と治療について解説した。今後、HSEの治療に欠かせない中枢神経組織で増殖しているHSV-1やHSV-2の薬剤感受性試験が実施できるようになり、ACV耐性HSEの発症病態が明らかにされることが期待される。

文献

- Whitely JW, Alford CA, Hirsch MS, et al. Vidarabine versus acyclovir therapy in herpes simplex encephalitis. *N Engl J Med* 314:144-149, 1986
- Schulte EC, Sauerbrei A, Hoffmann D, et al: Acyclovir resistance in herpes simplex encephalitis. *Ann Neurol* 67:830-833, 2010
- Patel P, Ahmed E, Subramanian ML. Intravitreal foscarnet therapy for acyclovir-resistant acute retinal necrosis after herpes simplex encephalitis.

- Ophthalmic Surg Lasers Imaging 9:1-3, 2010
- 4) Gateley A, Gander RM, Johnson PC, et al. Herpes simplex virus type 2 meningoencephalitis resistant to acyclovir in a patient with AIDS. J Infect Dis 161:711-715, 1990
 - 5) Gaudreau A, Hill E, Balfour Jr HH, et al: Phenotypic and genotypic characterization of acyclovir-resistant herpes simplex viruses from immunocompromised patients. J Infect Dis 178:297-303, 1998
 - 6) Saijo M, Suzutani T, De Clercq E, et al: Genotypic and phenotypic characterization of the thymidine kinase of ACV-resistant HSV-1 derived from an acyclovir-sensitive herpes simplex virus type 1 strain. Antiviral Res 56:253-262, 2002
 - 7) Shiota T, Wang L, Takayama-Ito M, et al: Expression of herpes simplex virus type 1 recombinant thymidine kinase and its application to a rapid antiviral sensitivity assay. Antiviral Res 91:142-149, 2011
 - 8) 井上裕靖, 東寛, 坂田葉子, 他: アシクロビルの持続点滴静注法に著効を示したWiskott-Aldrich症候群に合併した難治性ヘルペスウイルス感染症. 日児誌 100:85~88, 1996
 - 9) Kim JH, Schaenman JM, Ho DY, et al. Treatment of acyclovir-resistant herpes simplex virus with continuous infusion of high-dose acyclovir in hematopoietic cell transplant patients. Biol Blood Marrow Transplant 17:259-64, 2011

〈シンポジウムV〉 神経ウイルス感染症の最前線

プリオントリオ病研究の最前線

堂浦克美

【要旨】 国内で牛海綿状脳症が発生してから10年が経過した。この10年間で国内外のプリオントリオ病サーベイランスは強化され病気の発生動態が明らかになった。また、プリオントリオ病研究の成果は着実に蓄積され、無細胞系の試験管内においてプリオントリオを増殖させることも可能となり、人工的プリオントリオ蛋白からのプリオントリオ新生の報告も相次いでいる。しかし、この病気を克服するうえで必要な2つの情報がいまだに欠けている。一つは、プリオントリオに対する生体防御メカニズムであり、もう一つはプリオントリオによる神経変性のメカニズムである。これらのメカニズムは相互に密接に関係していると考えられ、その解明研究の成果は具体的な治療・予防に直結するものと期待される。

Key words: CJD、プリオントリオ、キャリアー、デノボ新生、防御機構

はじめに

国内で第一例目の牛海綿状脳症(BSE)罹患牛が千葉県で確認されたのは、アメリカ同時多発テロの発生が世界中を震撼させる直前の平成13年9月10日のことであった。たちまち、国内では国産牛に対する過敏な反応がおこり狂牛病パニックに陥った。時の厚生労働大臣と農林水産大臣が国民の前で牛肉の安全性をアピールするため、「牛肉を大いに食べる会」と銘打ってパフォーマンスを行ったのは今から10年前のことである。それ以来、国内でも本格的なクロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)やBSEのサーベイランスが実施されるようになり、先行していたヨーロッパを追い越す勢いで、新たな知見が蓄積されてきた。ここでは、最近十年間のプリオントリオ病研究の進歩を振り返り、今後に残されている課題についてまとめたい。

ヒトプリオントリオ病

ヒトプリオントリオ病は、原因が特定できない特発性、プリオントリオ蛋白遺伝子に異常がある遺伝性、感染経路が特定できる獲得性に大別される。プリオントリオ病患者の約80%は特発性で、孤発性CJDと呼ばれる疾患

である。孤発性CJDの大半の患者は、他覚的にはつきりした異常所見がない不定愁訴や視覚異常などの時期を経て、認知機能の低下、小脳症状、ミオクロースなどの不随意運動、精神症状、錐体路徴候、錐体外路徴候などが急速に進行し、約4ヶ月で無動性無言状態となり、全経過約16ヶ月で死に至る。一部の孤発性CJDには、緩徐進行性で特徴的検査所見の揃わない非典型例もあるが、非典型例では脳内に蓄積するプリオントリオのタイプや患者のプリオントリオ蛋白遺伝子多型が典型例とは異なっている。

一方、プリオントリオ病患者の約15%は遺伝性で、プリオントリオ蛋白遺伝子異常のタイプにより症状・経過といった表現型は異なっている。孤発性CJDと同様な症状・経過を示すものや、アルツハイマー病様の緩徐進行性の経過や痴呆症状が前景に立つものは、家族性CJDと呼ばれている。運動失調や錐体外路症状あるいは不眠・自律神経症状が目立ち、緩徐に進行し病期後半に痴呆症状が出現する遺伝性プリオントリオ病には、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー症候群あるいは家族性致死性不眠症と呼ばれる疾患がある。遺伝性プリオントリオ病の原因となるプリオントリオ蛋白遺伝子異常として、15種類の欠失・挿入変異と30種類の点変異がこれまでに報告されている。

獲得性プリオントリック病には、感染源が特定されているヒト乾燥硬膜使用に伴う医原性CJDやBSEからの感染である変異型CJDが含まれる。最近10年間のサーベイランス強化の成果として、国内外におけるプリオントリック病患者の発生実態が明らかになってきた。ヒトプリオントリック病は希少な致死性神経難病であるものの、発症者の数は年々増加傾向にある¹⁾。国内では、以前は年間100万人に1人と言われていたのが、現在は1.6人と増加している。この傾向は国内外で共通しており、疾患に関する認知度の向上以外の要因が関係しているかどうかは不明である。また、国内では世界中で最多のヒト乾燥硬膜使用による医原性CJDが発生していることも明らかとなった。現在までに約140症例が確認されている。さらに、用いた手術器具にプリオントリック病発症患者への使用歴があることが判明した二次感染リスクを持つ人々の存在も確認されるようになり、丁寧なフォローアップが行われている。

プリオントリック病発症の背景

特発性プリオントリック病は、50歳代～70歳代に極めてまれに発生するが、感染経路や原因が全く不明であり、明らかな家族内発症や地域集簇性はない。特定の年齢層に発病者がみられることから、免疫系の変化を含めた何らかの体質性変化が発病に寄与しているものと推定されているが、解明の糸口は得られていない。一方、遺伝性プリオントリック病は、プリオントリック蛋白のアミノ酸配列に異常を伴う遺伝子異常を持つ人々において、30歳代以降に発病が起こる。同一の遺伝子変異であっても臨床像や発症時期にバリエーションがある。端的な例は、一卵性双生児であって、同一の遺伝的背景を持つにもかかわらず、臨床像や発症時期が異なる例が報告されている²⁾。また、遺伝性プリオントリック病には浸透率が高い遺伝子変異もあるが、そうでない遺伝子変異もあり、日本に多いV180IやM232Rでは家族内発症がない³⁾。これらのこととは、病態や発病を修飾する何らかの要因が存在する可能性を示唆している。

また、獲得性プリオントリック病では、感染してから発病するまでの潜伏期間はヒトでは数年～数10年であることが明らかとなっている。プリオントリック病では持続感染状態(キャリアー状態)において、体液中のプリオントリックを簡便に証明できる手段がまだ確立されていないため、正確に発病のリスクや発病の背景を予測することは困難である。大まかな推測では、ヒト乾燥硬膜使用によるCJDでは、およそ1000人に1人

の確率でプリオントリック病が発生していると言われている。使用されたすべてのヒト乾燥硬膜がプリオントリックで汚染されていたとは考えられないが、バッチ法で多数の硬膜を一括して処理して製品化されていた状況を考えると、製品のロット毎にプリオントリック汚染度の違いがあり、使用された製品がどのロットだったかにより発病しやすさが変わる可能性がある。一方、変異型CJDの発病については、英国では50万頭以上のBSE罹患牛が食用になり市場に流通したと言われており、当初は数十万以上の患者が発生するかもしれないとの予想もあったが、実際にはこれまでに約200人が発病した。なお、変異型CJDは129Met/Metのプリオントリック蛋白多型をもつ若年者に発病が偏っているという特徴がある。いずれの獲得性プリオントリック病においても、感染源に同程度暴露されたにもかかわらず、予想より少ない人数で発病が観察されている。このことは、発病を左右する何らかの要因が存在している可能性を示唆している。

未発症キャリアー

プリオントリック汚染源に同程度暴露された人々の中でも発病していない人が存在することは、未発症キャリアーが存在する可能性があることを示唆している。実際、近年英国においては変異型CJDの未発症キャリアーが存在していることが明らかとなっている。未発症キャリアーのリンパ系組織ではプリオントリックが増殖し、血液中にもプリオントリックが存在することが指摘されており、二次感染の原因となることから大きな問題となっている。

動物を用いた実験においても、感染個体が未発症キャリアー状態になる場合があることが知られている。極めて低い感染力値のものを接種された場合や、種の壁現象が見られる宿主-プリオントリック株の組み合わせを用いた実験を行った場合⁴⁾、さらにはプリオントリック蛋白の発現を低下させた個体に感染させた場合などである。また、脳内感染ではなく末梢感染の際には、B細胞欠損マウスや老齢マウスでは未発症キャリアー状態が生じることが知られている^{5),6)}。このような動物を用いた実験で観察されている現象が、ヒトで見られる未発症キャリアーの出現や特定の人々での発症を説明できるかもしれないが、ヒトの体内に発症抑制に働く要因が存在する可能性を否定するものではない。

プリオン新生

1982年にブルシナー博士がプリオン仮説を提唱して以来、プリオン研究で最もホットな論争の一つはプリオンが純粋に蛋白質だけで形成されているかどうかであった。今日、プリオンが「凝集体を形成する異常型プリオン蛋白」であることを否定する研究者は稀である。プリオンの生物学的特性(伝達性と病原性)は、試験管内で異常型プリオン蛋白を種(シード)にして正常型プリオン蛋白からプリオンが産生された^{7),8)}。最近10年間で特筆すべきことは、この試験管内反応において異常型プリオン蛋白を含まない反応組成物(精製した正常型プリオン蛋白とRNAの混合物や、正常動物の脳乳剤のみや、組換え型正常型プリオン蛋白とリン脂質とRNAの混合物)だけでも、*de novo*にプリオンの产生(プリオン新生)に成功したとする報告がある⁹⁾。また、プリオン蛋白過剰発現動物へのプリオン蛋白ペプチドだけからなるアミロイド投与により、新たなプリオンの形成が報告されているだけでなく、昨年以降は野生型動物への組換え型プリオン蛋白からなるアミロイド投与でもプリオン新生が次々と報告されるようになった^{10),11)}。*De novo*プリオン形成については、コンタミネーションによるアーチファクトの可能性を指摘する報告もあり¹²⁾、白熱した議論が展開されているところである。すべての研究報告をアーチファクトと考えるには無理があり、われわれの体内でもプリオンは正常型プリオン蛋白から容易に形成される可能性がある。

プリオン様因子

今日、プリオン様の形質伝達は、他のアミロイド蛋白質でも報告されており、凝集体(アミロイドあるいはアミロイド様)を形成する蛋白質とプリオンとの垣根は明瞭ではなくなってきた。たとえば、アルツハイマー病患者脳で出現するアミロイド β やタウタンパク質も外来性に未発症動物に投与すると発病がおこる^{13),14)}。また、AAアミロイドーシスにおいてもアミロイドタンパクがプリオン様の形質伝達を起こすことが報告されている¹⁵⁾。さらに、プリオン様の形質伝達は酵母でも確認されており、出芽酵母の研究ではグルタミン/アスパラギンに富む配列をもつ様々な蛋白質(これまでに8種類のプリオンが報告されている)でプリオン現象が観察されている。興味深いことは、酵母では酵母プリオンの維持を阻害する内在性因子(例えばGpg1やHsp104の

過剰発現)の存在が報告されていることである¹⁶⁾。すなわち、これらの内在性因子の発現状態がアミロイドポリマーからオリゴマー(シード)への形成に影響を与え、オリゴマー形成が阻害されると娘細胞にプリオンは伝播しない。

生体防御

プリオンを排除する生体防御機構については、まったくわかっていない。プリオンが経口的に侵入した際には、免疫系細胞がプリオンの中枢神経系への伝播に関与していることは明らかにされている¹⁷⁾。小腸上皮に存在するM細胞や樹状突起細胞がプリオンの取り込みに関係しており、取り込まれたプリオンは所属のリンパ節で濾胞樹状突起細胞に感染し、濾胞樹状突起細胞の細胞膜上でプリオンの増殖が起こる。そこから中枢神経系へのプリオンの侵入はリンパ組織に分布する副交感神経を介して起こるとされている。したがって、末梢でのプリオン感染では濾胞樹状突起細胞の機能低下は、プリオンの中枢神経系への侵入を遅らせることになり、発病を遅延させる。実際に、変異型CJDが若年者で発生し、高齢者に発生が極めてまれであることの理由の一つとして、濾胞樹状突起細胞の加齢に伴う生理的機能低下が指摘されている⁶⁾。これまでの知見では、宿主の免疫系はプリオンの運び屋や増殖の場を提供するものとして働いている。宿主の生体防御系が積極的にプリオンを排除しているかどうかについては不明であり、中枢神経系に侵入したプリオンの増殖を制御する宿主メカニズムについては全くわかっていない。

実験的治療の現状

最近10年間に治療開発研究も盛んになってきた。プリオン病において、プリオン蛋白が病態形成で中心的な役割を果たしていることは明らかであるものの、それ以外の因子については不明である。特に、亜急性に進行する神経変性がどのようなメカニズムによるものか未だに明らかではない。これまでに、インビトロ実験やインビボ実験で治療効果(プリオン増殖阻害や延命効果)が観察された医薬品等が臨床で試してきた^{18),19)}。現在も、ペントサンポリサルフェート脳室内投与²⁰⁾とドキシサイクリン経口投与²¹⁾が実験的治療として一部で継続されているが、病気の進行を止め症状改善をもたらすほどの効果は出ていない。インビボ実験では、感染早

期に投与を開始した場合には顕著な生命予後改善効果が観察されるものの、発症後の投与開始では極めて限定された効果しか観察されていないので、臨床での結果は当然とも言える。

治療薬開発のターゲットとしては、3つ考えられる。一つは、プリオン（異常型プリオン蛋白）の増殖阻害であり、試験管内プリオン增幅法やプリオン持続感染細胞といったアッセイ用のツールが整備されていることや、プリオン蛋白を標的とした合理的創薬の手法が応用できることから、最も研究が進んでいる。前述のペントサンポリサルフェートはプリオンの増殖阻害を標的にした代表的薬剤である。二つ目はプリオンの分解促進である。ドキシサイクリンの作用は、プリオンと結合することによりプリオンの構造を緩解して分解されやすくなると考えられている。生体内でのプリオン分解経路についてオートファジーの関与が示唆されているものの、インビオ実験では目立った効果は得られていない。もう一つのターゲットは神経変性の阻害である。最も即効的効果が期待される標的であるが、プリオンによる神経変性をアッセイできる簡便なツールがないため研究は遅れしており、目立った研究成果の報告はない。

今後の課題

一部の患者を除いて、大半の患者では発症後は亜急性に病気が進行して数ヶ月以内には無動性無言状態に陥る。ミオクローススや脳波所見、病気の経過、脳脊髄液中のプリオンの存在²²⁾などからプリオン病の診断が成されるため、診断がつく時点では病気はかなり進行していることになる。プリオン病の神経症状が顕在化している時点では、病気を治癒させることは不可能である。プリオン病では、発症前のキャリアーの段階で介入できれば、治療効果を期待できることになる。したがって、感染キャリアーの診断が必要となってくるが、診断に結びつく疾患マーカーは未だに発見されていないし、プリオンを末梢の体液から発症前に証明することもできない。治療開発とともに、早期診断とくに発症前診断の開発がプリオン病を克服する上できわめて重要である。

一方、最近10年間の知見は、プリオン病は特定のヒトで発病が起こる可能性を強く示唆している。我々の体内にはプリオンの増殖を抑え発症を防ぐ疾患感受性に関わる防御機構が備わっており、その防御機構は何らかの外的要因や内的要因の影響を受けて発病を修飾している可能性がある。プリオン病を

克服するうえで解明されなければならないものとして、一つは脳内でプリオン増殖を制御しているメカニズムであり、もう一つはプリオンによる神経変性のメカニズムである。これらは、独立したものではなく、脳内プリオン増殖制御機構の破たんが神経変性に繋がることは容易に推測でき、したがってこれらのメカニズムは密接に連携しているものと思われる。今後10年以内には両者の解明が進み、プリオン病の克服が一層現実味を増していることを期待している。

文献

- 1) 山田正仁、篠原もえ子、浜口 肇、ほか：日本におけるヒト・プリオン病のサーベイランスと疫学的実体、プリオン病と遅発性ウイルス感染症、「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」編、金原出版、東京、2010、PP16-21.
- 2) Hamasaki S, Shirabe S, Tsuda R, et al: Discordant Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease in monozygotic twins. Lancet 352:1358-1359, 1998
- 3) 志賀裕正：遺伝性(家族性)プリオン病—臨床病型の特徴と診断のポイント— 2) 家族性クロイツフェルト・ヤコブ病、プリオン病と遅発性ウイルス感染症、「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」編、金原出版、東京、2010、PP132-138.
- 4) Race R, Raines A, Raymond GJ, et al: Long-term subclinical carrier state precedes scrapie replication and adaptation in a resistant species: analogies to bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeldt-Jakob disease in humans. J Virol 75:10106-10112, 2001.
- 5) Klein MA, Frigg R, Flechsig E et al: A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie. Nature 390:687-690, 1997.
- 6) Brown KL, Gossner A, Mok S, et al: The effects of host age on the transport of complement-bound complexes to the spleen and the pathogenesis of intravenous scrapie infection. J Virol 86:25-35, 2012.
- 7) Saborio GP, Permanne B, Soto C.

- Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* 41:810-813, 2001.
- 8) Atarashi R, Moore RA, Sim VL, et al: Ultrasensitive detection of scrapie prion protein using seeded conversion of recombinant prion protein. *Nat Methods* 4:645-650, 2007.
- 9) Colby DW, Prusiner SB: De novo generation of prion strains. *Nat Rev Microbiol* 9:771-777, 2011.
- 10) Makarava N, Kovacs GG, Bocharova O, et al: Recombinant prion protein induces a new transmissible prion disease in wild-type animals. *Acta Neuropathol* 119:177-187, 2010.
- 11) Makarava N, Kovacs GG, Savtchenko R, et al: Genesis of mammalian prions: from non-infectious amyloid fibrils to a transmissible prion disease. *PLoS Pathog* 7:e1002419, 2011.
- 12) Cosseddu GM, Nonno R, Vaccari G, et al: Ultra-efficient PrP amplification highlights potentialities and pitfalls of PMCA technology. *PLoS Pathog* 7:e1002370, 2011.
- 13) Meyer-Luehmann M, Coomaraswamy J, Bolmont T, et al: Exogenous induction of cerebral beta-amyloidogenesis is governed by agent and host. *Science* 313:1781-1784, 2006.
- 14) Clavaguera F, Bolmont T, Crowther RA, et al: Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol* 11:909-913, 2009.
- 15) Zhang B, Une Y, Fu X, et al: Fecal transmission of AA amyloidosis in the cheetah contributes to high incidence of disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:7263-7268, 2008.
- 16) Ishiwata M, Kurahashi H, Nakamura Y: A G-protein gamma subunit mimic is a general antagonist of prion propagation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:791-796, 2009.
- 17) Mabbott NA, MacPherson GG: Prions and their lethal journey to the brain. *Nat Rev Microbiol* 4:201-211, 2006.
- 18) Sim VL, Caughey B: Recent advances in prion chemotherapeutics. *Infect Disord Drug Targets* 9:81-91, 2009.
- 19) Teruya K, Kawagoe K, Kimura T, et al: Amyloidophilic compounds for prion diseases. *Infect Disord Drug Targets* 9:15-22, 2009.
- 20) Rainov NG, Tsuboi Y, Krolak-Salmon P, et al: Experimental treatments for human transmissible spongiform encephalopathies: is there a role for pentosan polysulfate? *Expert Opin Biol Ther* 7:713-726, 2007.
- 21) Forloni G, Salmona M, Marcon G, et al: Tetracyclines and prion infectivity. *Infect Disord Drug Targets* 9:23-30, 2009.
- 22) Atarashi R, Satoh K, Sano K, et al: Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluid by real-time quaking-induced conversion. *Nat Med* 17:175-178, 2011.

Frontline of Prion Disease Research

Katsumi Doh-ura

【Summary】Ten years has passed since the first case of bovine spongiform encephalopathy was reported in Japan. Here, the progress in prion disease research for these 10 years is reviewed, and the perspective for the future is discussed. In the past 10 years, laborious surveillance for prion diseases has succeeded in scanning outbreaks and trends of the diseases. In addition, research efforts for unveiling the pathogenesis have steadily brought various promising inventions and discoveries, which include ultra-efficient in-vitro prion amplification/detection techniques and *de novo* prion genesis phenomena from artificial prion proteins. It is, however, still unknown how the body or the brain is protected against prion conversion, or how the brain is exactly affected by accumulated prions. Every challenge to resolve these enigmas will hopefully open a new avenue toward remedy against prion diseases.

Key words: CJD, prion, carrier, de novo genesis, defense mechanism

原 著 論 文

発熱から神経症状発現までの時間からみた pandemic influenza A (H1N1) 2009脳症の病型と予後との関連

森地振一郎¹、河島尚志¹、奥村彰久²、中川聰³、森島恒雄⁴、
厚生労働省新型インフルエンザ脳症班会議協力施設

【要旨】 2009年より pandemic influenza A (H1N1) 2009 (以下 pdm H1N1 2009) が世界的に流行し急性脳症が報告されているが、その病態には依然不明な点が多い。(対象及び方法) 今回、本邦における pdm H1N1 2009 脳症の臨床像を神経症状発現までの時間経過の面から、病型ならびに予後との関連を検討した。対象期間は6か月間、対象患者は188例 (16歳以下) である。(結果) 発熱から神経症状の発現までの時間が24時間前後に死亡例が集中していた。AESD群では後遺症がある群が、ない群と比較してより早期に症状が出現していた。MERS群は後遺症の有無に関係なく50時間以内であった。(結論) 発熱と神経症状の発現までの時間は脳症分類(病態)と関連があり、画像と合わせての治療戦略は有用であると考えた。

Key words: 新型インフルエンザ脳症、AESD、MERS、小児

はじめに

インフルエンザウイルスは様々な症状を引き起こし、重症急性呼吸器窮迫症候群 (SARS : Severe Acute Respiratory Syndrome) を併発することが全国的に知られている^{1,2)}。しかし肺炎等の呼吸器症状による死亡例は認知されているが、近年急性脳症による中枢神経障害が原因の重症及び死亡例が多く報告されるようになった³⁻⁵⁾。本邦では1998年以来、季節性インフルエンザ関連脳症の報告例が増加しており、約30%の死亡率という報告もある^{6,7)}。疾患概念が提唱され始めた当初は予後不良の中枢神経疾患であったが、各種集中治療により季節性インフルエンザ脳症に対する治療成績は改善されてきている。

一方、2009年よりウイルス学的性状を異にする新型インフルエンザウイルス (pandemic influenza A (H1N1) 2009、以下 pdm H1N1 2009 と略) が世界的に流行し、同時に同ウイルス感染に

伴う急性脳症が報告されるようになったが、その病態の解明は未だ完結していない⁸⁾。特に小児における報告として、pdm H1N1 2009 では急性脳症などの中枢神経症状を併発しやすいという見解もあり、従来の季節型とは違う治療法を考案していく必要がある⁹⁾。本調査は pdm H1N1 2009 感染関連による急性脳症に対する治療法の新たな可能性を模索するため、本邦における本症の臨床像、特に発熱から神経症状発現までの時間からみた病型と予後との関連を検討した。

【対象及び方法】

本邦の入院施設あるいはそれに準じた施設を持つ824施設にアンケートを送り、207例 (1歳2か月～16歳9か月、平均年齢±標準偏差=7.3±3.4歳) の回答を得た。特に死亡例に関しては、直接施設に赴きデータから死亡原因が急性脳症であるかの検討を行った。予後・後遺症は、詳細が判明した188例

1：東京医科大学小児科学教室 (〒160-0023 東京都新宿区西新宿6-7-1)

2：順天堂大学医学部小児科・思春期科学教室

3：成育医療センター集中治療部

4：岡山大学大学院医歯薬学総合研究科病態機構学小児医科学

の内訳は、神経学的後遺症を残さなかつた群：149例、神経学的後遺症を残した例：23例、死亡例：16例であった。対象期間は、2009年9月～2010年2月の6か月間である。対象児は、本邦で報告された予後・後遺症の詳細が判明した188例（1歳2か月～16歳9か月、平均年齢土標準偏差=7.4±3.5歳）を対象とした。

急性脳症の後遺症を過去の文献⁶⁾を参考にし、①軽症群（後遺症にてんかん、軽度精神発達遅延等）、②重症群（重度精神発達遅延・四肢麻痺等）、③死亡群の3群に分けた。

今回のサーベイランスは、厚生労働省の新型インフルエンザ脳症研究班（班長＝森島恒雄先生：岡山大学大学院医歯薬学総合研究科病態機構学小児医学）によって行われ、国内でpdm H1N1 2009脳症の報告数としては最大規模である。

統計処理にはStatcel 2 (Oms-publishing, Saitama, Japan) を用いてStudent's-t及びMann-Whitney法を利用した。P<0.05を有意とした。

【結果】

アンケートの回答があった207例の男女比は、男児：127例、女児：79例、性別記載なし：1例であり、6:4（男女比61.3%）と男児に多かつた。後遺症なし及び軽度後遺症例、重症の後遺症例は全年齢層に散布していたが、死亡例は低年齢層に分布し

ていた。図1に発熱から神経症状発現までの時間経過を男女別に示した。24時間以内に発症例が65%で、うち男児が68.9%を占めていた。また、6時間以内発症が29%を占めていた。

次に後遺症の有無で神経症状が出現する時間（以下の平均を標準偏差で示す）を比較検討した。後遺症あり群が23.8±20.4時間、後遺症なし群が20.4±24.1時間であり統計学的有意差は認めなかつた。図2に比較結果を示す。発熱から神経症状発現までの時間は、24時間前後（27.2±14.8時間）に死亡例が集中していた（16例中15例：94%）。また、後遺症なし群では30時間以内にほぼ全例が神経症状を発現していた。

図3に二相性けいれんと遅発性拡散能低下を呈する急性脳症（acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion：以下AESDと略）群、可逆性脳梁膨大部病変を有する軽症脳炎・脳症（mild encephalitis/encephalopathy with a reversible splenial lesion：以下MERSと略）群、死亡群で比較検討した。AESDの後遺症あり群では大半が6時間以内（26.7±40.1時間）にけいれん・意識障害等の神経症状が発現しており、後遺症なし群では100時間以上を経過している例が多く（124±61.5時間）、Student's t-testにて統計学的有意差（p<0.05）を認めた。MERS群では後遺症あり群が39.0±19.6時間、後遺症なし群が27.4±21.7時間と統計学的有意差は認めず、50時間以内に神経症状が発現していた。

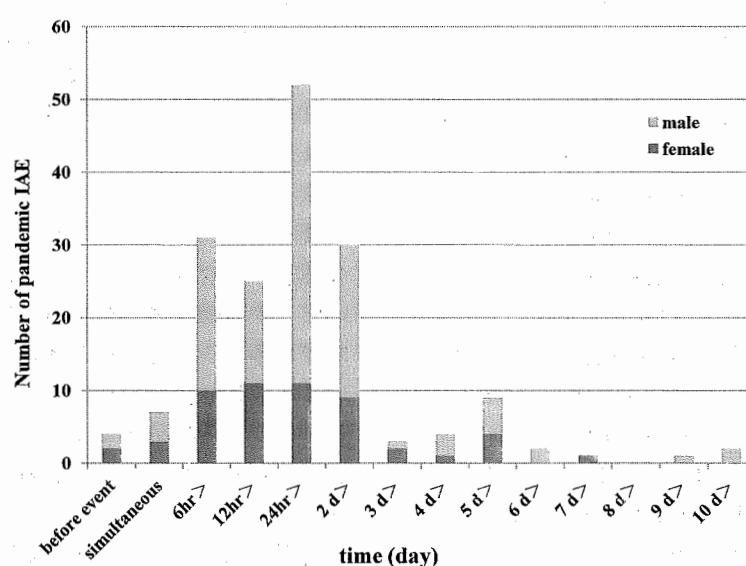


図1：神経症状発現から24時間以内の性別及び患者数の分布

24時間以内の発症例が65%で、特に6時間以内発症が29%を占めていた。

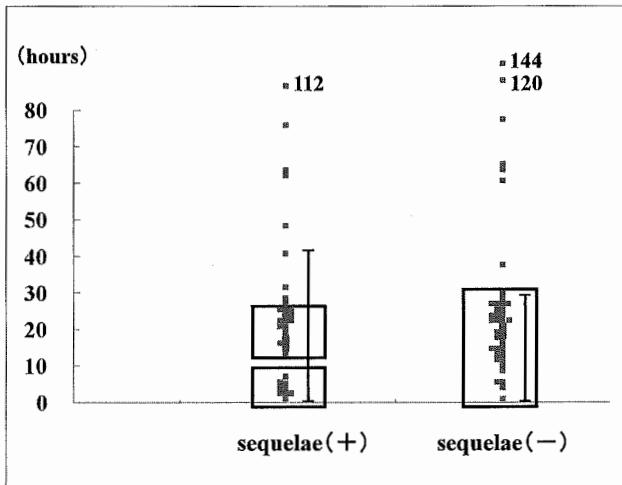


図2：発熱から神経症状発現までの時間①

発熱から神経症状発現までの時間は、24時間前後（平均士標準偏差=27.2±24.8時間）に死亡例が集中していた（94%）。また、後遺症なし群では30時間以内にはほぼ全例が神経症状を認めていた。

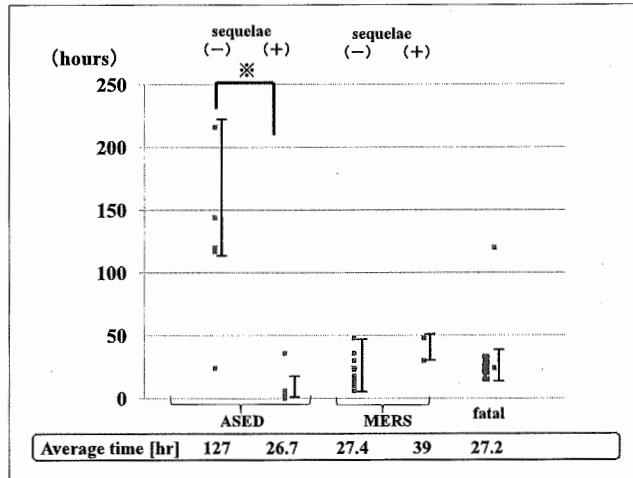


図3：発熱から神経症状発現までの時間②

AESDの後遺症あり群では大半が6時間以内に神経症状が発現しており、後遺症なし群では100時間以上を経過している例が多かった。MERS群では後遺症の有無で有意差は認めず、50時間以内に神経症状が発現していた。

※P<0.05 (Student's t-test) を示す。

(略語) AESD : acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion

MERS : mild encephalitis/encephalopathy with a reversible splenial lesion

【考察】

2009年度のインフルエンザ感染に関する入院サーベイランスにより、2009年7月28日から2010年3月30日までに全国の医療機関から17646人の報告があり、うち79.2%が小児である。その間に検出されたインフルエンザウイルスの99%がpdm H1N1 2009であった。小児の入院患者の少なくとも1.5%が脳症に対する治療目的に入院しているとする報告もある¹⁰⁾。

今回のサーベイランスはアンケート調査が中心であり、限界がある。集計結果からAESDの発症時間を後遺症の有無にわけて統計処理を行ったが、その結果はAESDの典型的な臨床経過とはいえない。AESDの診断基準では、発熱から24時間以内にけいれんが起きることが一般的とされている¹¹⁾⁻¹³⁾。後遺症なし例での平均発症時間は、二相性目のけいれん発作をとらえた可能性があるが、あえてアンケート上の記載と担当医との面談内容に従つた。

AESDで、特に一相目のけいれんが、熱性けいれんなのかAESDの初期けいれんなのかを鑑別することは臨床現場では困難なことが多い。両者の鑑別は臨床症状、血液・髄液検査所見、脳波所見、画像所見等を総合して行うべきであるが、各施設がその他の客観的指標を模索中である。近年では、国内で

早期診断及び予後指標として有望視されている手段にバイオマーカーがある。我々は過去に中枢神経感染症（髄膜炎・急性脳炎／脳症を中心に）に対するサイトカインプロファイリングの結果をもとに、病勢及び予後を含めた治療判定との関連を報告してきた¹⁴⁾⁻¹⁶⁾。しかし、本疾患における全国的に統一された指標とするにはまだ臨床データの蓄積が必要である。この他に応用が期待されている髄液バイオマーカーとして、タウ蛋白¹⁷⁾、NSE (neurone specific enolase)¹⁸⁾、酸化ストレスマーカー¹⁹⁾、ニューロフィラメント²⁰⁾、グリア細胞障害マーカー²¹⁾等がある。

次に死亡例が発症後24時間前に多かった点を免疫学的に考察すると、サイトカインの細胞障害との関連が挙げられる²²⁾⁻²⁶⁾。特に炎症性サイトカインのピークは感染後（発熱後）数時間でむかえるが、サイトカインのピークと死亡例の発症時間がずれている。これは炎症性サイトカインによる細胞障害の進行に要する時間と考えられる。以上の理由より、抗サイトカイン療法の早期導入への有効性も今後検討していくべきである。

高梨らは、MERS小児54例の検討で、神経症状発現は発熱初日後より1～3日以内に約70%を占めていたとしている²⁷⁾。神経症状の内訳は、異常言動・行動が半数を占め、以下けいれん・意識障害・

頭痛・髄膜刺激症状の順となっている。一般的にMERSの神経学的予後は良好といわれており、今回の検討でも16例中2例（13%）に軽度神経学的後遺症を残したが、他は後遺症を認めなかつた。また後遺症の有無で、発症までの時間に差は認めていないが、後遺症あり群の方がより発熱から神経症状までの時間が経過して発症していたので、緩徐な経過例では集中治療の準備が必要と思われる。特にMERS群では頭部MRI所見が特徴的なので、臨床経過と画像所見を合わせることで予後及び治療指針の指標となると考えられる。

今後、今回のサーベイランスで不十分であった箇所を含めて前方視的に対照試験を追加していく必要がある。

【結論】

発熱から神経症状発現までの時間は、24時間頃に死亡例が集中していた。AESD群は、後遺症なし群の方が発現までの時間がより経過していた。AESDの後遺症あり群では大半が6時間以内に症状が発現しており、後遺症なし群では遅れて症状が発現していた。MERS群では、後遺症の有無にかかわらず50時間以内に発現していた。

以上より、発熱と神経症状の発現時期には各脳症分類（病態）と関連があることが示唆される。画像評価・バイオマーカー等を合わせて迅速かつ慎重に、特に発熱から24時間前後経過の中枢神経症状発症例とAESDが疑われる症例は集中治療を含めての治療戦略を立てる必要がある。

本報の趣旨は、第52回日本臨床ウイルス学会（2011年6月・三重県）にて発表した。

【謝辞】

本調査に協力して頂きました全国の諸先生方に深謝致します。

【参考文献】

- 1) Gómez-Gómez A, Magaña-Aquino M, García-Sepúlveda C, et al : Severe pneumonia associated with pandemic (H1N1) 2009 outbreak, San Luis Potosí, Mexico. *Emerg Infect Dis* 16 : 27-34, 2010.
- 2) Miroballi Y, Baird JS, Zackai S, et al : Novel influenza A (H1N1) in a pediatric health care facility in New York City during the first wave of the 2009 pandemic. *Arch Pediatr Adolesc Med* 164 : 24-30, 2010.
- 3) Kitcharoen S, Pattapongsin M, Sawanyawisuth K, et al : Neurologic manifestations of pandemic (H1N1) 2009 virus infection. *Emerg Infect Dis* 16 : 569-70, 2010.
- 4) Centers for Disease Control and Prevention (CDC) : Neurologic complications associated with novel influenza A (H1N1) virus infection in children - Dallas, Texas. *Morb Mortal Wkly Rep* 58 : 773-778, 2009.
- 5) Zheng Y, He Y, Deng J, et al : Hospitalized children with 2009 influenza A (H1N1) infection in Shenzhen, China, November-December 2009. *Pediatr Pulmonol* Oct 20, 2010.
- 6) Morishima T, Togashi T, Yokota S, et al : Encephalitis and encephalopathy associated with influenza epidemic in Japan. *Clin Inf Dis* 35 : 512-517, 2002.
- 7) Yoshikawa H, Yamazaki S, Watanabe T, et al : Study on influenza-associated encephalitis/encephalopathy in children during the 1997 to 2001 influenza seasons. *J Child Neurol* 16 : 885-890, 2001.
- 8) Nakajima N, Hata S, Sato Y, et al : The first autopsy case of pandemic influenza (A/H1N1pdm) virus infection in Japan: detection of a high copy number of the virus in type II alveolar epithelial cells by pathological and virological examination. *Jpn J Infect Dis* 63 : 67-71, 2010.
- 9) Ekstrand JJ, Herbener A, Rawlings J, et al : Heightened neurologic complications in children with pandemic H1N1 influenza. *Ann Neurol* 68 : 762-766, 2010.
- 10) Ministry of Health, Labour, and Welfare, 2010 Japan. [Report of influenza A(H1N1) – updated on April 23]. Available from: <http://www.mhlw.go.jp/bunya/>

- kenkou/kekkaku-kansenshou04/pdf/100423-01.pdf
- 11) 塩見正司：インフルエンザ脳症 臨床病型分類の試み(解説). 小児科臨床53:1739-1746, 2000.
- 12) 木村清次, 根津敦夫, 大槻則行: 他感染に伴う急性脳症35例の臨床的検討. 脳と発達30:244-249, 1998.
- 13) Takanashi J, Oba H, Barkovich AJ, et al : Diffusion MRI abnormalities after prolonged febrile seizures with encephalopathy. Neurology 66 : 1304-1309, 2006.
- 14) Nakamura M, Yamanaka G, Kawashima H, et al : Clinical application of rapid assay of interleukin-6 in influenza-associated encephalopathy. Dis Markers 21 : 199-202, 2005.
- 15) 河島尚志, 上島肇, 石井知愛子, ほか: フリー ラジカルとサイトカインからみたインフルエンザ脳症におけるラジカルスカベンジャー使用 経験. 小児科臨床61:1639-1643, 2008.
- 16) 山中岳, 石田悠, 小穴信吾, ほか: ウィルス 関連脳症における髄液中サイトカインの検討(会). 脳と発達42:Suppl.S214, 2010.
- 17) 田沼直之: 急性脳症とバイオマーカー. 小児科臨床74:931-936, 2011.
- 18) Petzold A : CSF biomarkers for improved prognostic accuracy in acute CNS disease. Neurol Res 29 : 691-708, 2007.
- 19) Fukuda M, Yamauchi H, Yamamoto H : The evaluation of oxidative DNA damage in children with brain damage using 8-hydroxydeoxyguanosine levels. Brain Dev 30 : 131-136, 2007.
- 20) 松重武志, 井上裕文, 末永尚子, ほか: 痙攣 重積型脳症における血清中Neurofilamentの 解析. 日本小児科学会雑誌 114:183, 2010.
- 21) Gurnett CA, Landt M, Wong M : Analysis of cerebrospinal fluid glial fibrillary acidic protein after seizures in children. Epilepsia 44 : 1455-1458, 2003.
- 22) Hasegawa S, Matsushige T, Inoue H, et al : Serum and cerebrospinal fluid cytokine profile of patients with 2009 pandemic H1N1 influenza virus-associated encephalopathy. Cytokine 54 : 167-172, 2011.
- 23) Asano T, Ichiki K, Koizumi S, et al : IL-8 in cerebrospinal fluid from children with acute encephalopathy is higher than in that from children with febrile seizure. Scand J Immunol 71 : 447-451, 2010.
- 24) Yamanouchi H, Shiomi M, Awaya Y, et al : Current topics of acute encephalitis and encephalopathy in Japanese children. No To Hattatsu. 41 : 124-126, 2009. Japanese.
- 25) Mizuguchi M, Yamanouchi H, Ichiyama T, et al : Acute encephalopathy associated with influenza and other viral infections. Acta Neurol Scand Suppl 186 : 45-56, 2007.
- 26) Kawada J, Kimura H, Ito Y, et al : Systemic cytokine responses in patients with influenza-associated encephalopathy. J Infect Dis 188:690-698, 2003.
- 27) Takanashi J : Two newly proposed infectious encephalitis/encephalopathy syndromes. Brain Dev 31 : 521-528, 2009.

Relationship of pandemic influenza (H1N1) 2009 encephalopathy with the disease types and prognoses, in terms of the time from fever to the onset of neurologic symptoms

Shinichiro Morichi¹, Hisashi Kawashima¹,
Akihisa Okumura², Satoshi Nakagawa³,
Tsuneo Morishima⁴ and Cooperative Center for Influenza-associated Encephalopathy Research Committee, the Ministry of Health, Labour and Welfare

[abstract] Acute encephalopathy began to be reported in association with pandemic influenza A (H1N1) 2009 (pdm H1N1 2009), which has been pandemic worldwide since 2009, but many of the disease conditions are unknown. In this study, we evaluated the relationship of the clinical spectrum of pdm H1N1 2009 encephalopathy in Japan with the disease types and prognoses, in terms of the time to the onset of neurologic symptoms. The study period was 6 months, and the subjects consisted of 188 patients with pdm H1N1 2009 encephalopathy aged 16 or younger. In the majority of patients who died, the time from fever to the onset of neurologic symptoms was approximately 24 hours. In the group with acute encephalopathy syndrome characterized by biphasic seizures and late reduced diffusion (AESD), patients with sequelae developed neurologic symptoms within 6 hours, and those without sequelae did not develop such symptoms over 100 hours. In the group with mild encephalopathy with a reversible splenial lesion (MERS), neurologic symptoms occurred within 50 hours regardless of the presence or absence of sequelae. It is considered that the time from fever to the onset of neurologic symptoms is related to the classes (conditions) of encephalopathy, and treatment strategies combined with imaging methods are useful.

Key words: pandemic influenza A (H1N1) 2009 encephalopathy, AESD, MERS, pediatrics

1 : Department of Pediatrics, Tokyo Medical University
(6-7-1 Nishi-shinjuku, Shinjuku-ku, Japan, 1600023)

2 : Department of Pediatrics, Juntendo University, Faculty of Medicine

3 : Division of Critical Care Medicine, National Center for Child Health and Development

4 : Department of Pediatrics, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

会の現況

(2012年4月1日現在)

顧問	井形 昭弘	加地 正郎	倉田 毅	萬年 徹	
特別功労会員	岩田 誠 葛原 茂樹	塙澤 全司 庄司 紘史	高須 俊明 富樫 武弘	古川 漸 松永 宗雄	水谷 智彦
功労会員	渥美 哲至 磯村 思无 内野 誠 岡部 信彦 小鹿 幸生	栗原 照幸 黒岩 義之 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 恒司 湯浅 龍彦 若山 吉弘
理事長	水澤 英洋				
理事	糸山 泰人 大原 義朗	辻 省次 中川 正法	中野 今治 布井 博幸	原 寿郎 細矢 光亮	水澤 英洋 山田 正仁
監事	龜井 聰	楠原 浩一			
評議員	相原 正男 綾部 光芳 荒木 俊彦 荒木 信夫 有村 公良 粟屋 豊 飯塚 高浩 池田 修一 石川 欽也 伊住 浩史 出雲 周二 市川 博雄 市山 高志 井出 俊光 伊藤 瑞規 糸川 かおり 犬塚 貴 岩崎 靖 上野 聰 尾内 一信 大石 実 太田 宏平 岡本 幸市 小川 克彦 梶 龍児 形岡 博史 片山 泰朗	河島 尚志 河村 満 神田 隆 岸田 修二 岸田 日帶 吉良 潤一 吉良 龍太郎 楠 進 國本 雅也 久保田 龍二 熊本 俊秀 倉根 一郎 栗田 正 栗山 勝 黒田 康夫 小島 重幸 作田 学 佐々木 秀直 佐多 徹太郎 佐藤 克也 塙田 宏嗣 塙見 正司 宍戸-原 由紀子 嶋崎 晴雄 自見 隆弘 東海林 幹夫 調 済	新藤 和雅 鈴木 重明 鈴木 則宏 鈴木 裕 鈴木 ゆめ 錫村 明生 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 良輔 高橋 輝行 高橋 幸利 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 貞俊 坪井 義夫 出口 一志 土井 宏	道勇 学 富樫 慎治 長坂 高村 中里 良彦 中島 健二 中嶋 秀人 中瀬 浩史 中根 俊成 長野 祐久 中村 龍文 滑川 道人 成田 光生 西澤 正豊 野倉 一也 野村 恒雄 森島 昭彦 森田 矢部 森田 一郎 森田 清美 山本 山根 山本 知孝 山脇 基弘 雪竹 隆徳 横田 文均 吉井 哲史 吉川 秀人 芳川 浩男 吉田 真理 吉田 誠 米田 重雄 松本 昌泰	三浦 義治 三木 健司 水口 雅 武藤 多津郎 村井 弘之 村上 龍文 村田 頭也 村山 繁雄 持田 嘉之 望月 秀樹 森内 浩幸 森島 恒雄 森田 昭彦 矢部 一郎 山根 清美 山本 知孝 山脇 基弘 雪竹 隆徳 横田 文均 吉井 哲史 吉川 秀人 芳川 浩男 吉田 真理 吉田 誠 米田 重雄 松本 昌泰

(134名:五十音順)

賛助会員 グラクソ・スミスクライン株式会社

総会員数 576名 (一般会員:393名)

事務局 株式会社 春恒社

日本神経感染症学会会則

(平成22年10月)

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

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

第三条 本会の目的を達成するために次の事業を行う。

(1) 年次研究集会「日本神経感染症学会」の開催

(2) 学会誌 (NEUROINFECTION) の発行

(3) その他 本会の目的に必要な調査・研究・知識普及などの事業

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

第五条 役員(評議員、会長、理事、監事、理事長及び顧問)

1. 評議員は理事会により正会員より選出される。

2. 評議員は本会の運営につき審議する。

3. 理事は評議員の中より若干名選出される。

4. 理事は、本会の運営に当たる。

5. 理事の互選により理事長を選出する。

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

会長は評議員会及び総会を招集する。

7. 会計監査のため評議員より2名の監事を依頼する。監事は理事を兼ねない。

8. 助言者として若干名の顧問をおくことができる。

9. 上記役員の任期は2年とし、再任を妨げない。

第六条 会議(評議員会、理事会、総会)は、それぞれ以下の事項を担当する。

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

(1) 年次研究集会「日本神経感染症学会」の開催

(2) 学会誌の発行

(3) 会員の入会と退会

(4) 理事会の選出した役員の承認

(5) 会則の変更

(6) その他、本会の目的に必要な調査・研究・知識普及などの事業

(7) 次年度予算と前年度決算

2. 理事会は会の運営に当たる。

3. 総会は評議員会での審議決定の報告を受け、意見を述べることができる。

第七条 本会の事務局は、評議員会の指定するところにおく。

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

付則1. 本会の事務局は、当分の間、東京医科歯科大学神経内科におく。(補足：現在、事務局は株式会社春恒社に置いている)

付則2. 本会則は平成18年4月1日から実施する。

付則3. 本会の会費は年額以下のごとく定める。

会 費 一般会員 7千円

評議員 9千円

理事 1万円

賛助会員会費 一口5万円、一口以上

(平成17年10月20日一部変更)

(平成22年10月7日一部変更)

「NEUROINFECTION」投稿規程

(2007年5月改訂)

1. 投稿にあたって

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

2. 論文の構成

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

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

3. 執筆要項

- 1) 原稿の送り先
〒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、メディアはフロッピー、CD-R、DVD-R、あるいはMOでよい。（OS、ソフトウェア、ファイル名を必ず記載のこと）。
- 4) 投稿論文の原稿はオリジナル1部、コピー2部（図表を含む）を送ること。
- 5) 投稿論文とともに、共著者全員の署名の入った投稿承諾書（巻末の別紙）を送ること。
- 6) 表紙には和文、英文で表題、著者名、所属、連絡先を記す。
- 7) 表紙にはKey Wordsを英語と日本語で掲げる（5つまで）。
- 8) 投稿論文の場合、要旨について本文として、はじめに、目的、対象・方法、考察、結論または結語などの項目を掲げる。また、症例報告の場合、症例という項目を挙げてもよい。
- 9) 専門用語以外は当用漢字、現代仮名遣いを用い、句読点を正確に書く。

- 10) 外国語の固有名詞（人名、地名）は原語のまま用いる。すでに、日本語化して久しいものはなるべくカタカナとする。商標薬品名®、その他の固有名詞の頭文字は大文字とするが、文中の外国語単語（病名、その他）の頭文字は、ドイツ語名詞及び文頭の場合を除きすべて小文字とする。
- 11) 数字は算用数字を用い、度量衡単位は CGS 単位で、m、cm、mm、cm²、Kg、g、mg などとする。
- 12) 写真、図、表には必ず表題をつける。また必要に応じて説明もつけること。組織標本には染色法と倍率を付ける。写真は原寸大で印刷できる大きさで、十分鮮明なものとし、原寸大の大きさは 21 cm × 14 cm を限度とする。写真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肩番号で記す。また、文献は下記のように記載し、欧文雑誌の略名は最近の Index Medicus に従う。

雑誌の場合 著者氏名：題名、誌名、巻数：起始頁—最終頁、西暦発行年

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

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

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

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

4. 引用文献例

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

投稿承諾書

年 月 日 提出

日本神経感染症学会 殿

論文題名：_____

筆頭著者 所属：_____

フリガナ
氏名：_____ 印

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

共著者

所属：_____ フリガナ
氏名：_____ 印

編集責任者 原 寿郎

Neuroinfection 第 17 卷 1 号

発 行 平成 24 年 9 月 20 日

発行者 水澤 英洋

発行所 〒 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

TEL: 03-5291-6231

FAX: 03-5291-2176

印刷所 S&M トラスト株式会社

〒 811-2312 福岡県糟屋郡粕屋町戸原 231-1

TEL: 092-939-2211

FAX: 092-931-3788

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

