

原著

当院で経験した急性脳症の原因病原体について

奥野英雄¹⁾ 改田 厚²⁾ 天羽清子¹⁾ 井上岳司³⁾
石川順一¹⁾ 外川正生¹⁾ 塩見正司⁴⁾

要旨 当院で経験した急性脳症 93 例を対象に原因病原体を後方視的に検討した。病原体はインフルエンザウイルス (Flu)、ヒトヘルペスウイルス 6 型 (HHV-6) が全体的に多く認められたが、脳症の病型分類ごとに差が認められた。また、呼吸器ウイルス遺伝子検査やヘルペスウイルス属の real-time PCR を用いた積極的な検索により Flu や HHV-6 以外にさまざまな病原体が脳症の原因となることが示された。今後、脳症の病原体検索のため全国規模のネットワーク構築が求められる。

はじめに

発熱を契機に急激な意識障害を呈し、脳に直接の炎症がみられない場合、「急性脳症」と診断されている。日本では 1990 年代以降にインフルエンザウイルス罹患に伴う小児の急性脳症の多発があり、急性脳症の研究が進み、複数の病型の存在が明らかとなった。誘因となる発熱の原因はさまざまであるがウイルス感染症であることが多い。また、一つのウイルスは複数の病型の急性脳症の原因になることも明らかとなった^{1,2)}。

当院では、MRI 画像所見などから急性脳症の病型分類を行うとともに、発熱の原因病原体精査のため、細菌培養検査、ウイルス抗原検査、ウイルス分離、polymerase chain reaction (PCR) 法を用いた遺伝子検査を行っている。

当院で経験した急性脳症で、原因病原体を検索した結果を基に後方視的に検討した。

I. 対象・方法

1. 対象

1999 年 1 月～2010 年 12 月に当院に入院した急性脳症 93 例を対象とした。

急性脳症を、けいれん重積型急性脳症 (acute encephalopathy with febrile convulsive status epilepticus : AEFCSE)、出血性ショック脳症症候群 (hemorrhagic shock and encephalopathy syndrome : HSES)、急性壊死性脳症 (acute necrotizing encephalopathy : ANE)、急性脳腫脹型脳症 (acute brain swelling : ABS) に分類し、どれにも属さないものを分類不能とした^{1,3)}。

急性脳症の診断は厚生労働省インフルエンザ脳

Key words : 急性脳症, ヒトヘルペスウイルス 6 型, 原因病原体, けいれん重積型急性脳症, 出血性ショック脳症症候群

- 1) 大阪市立総合医療センター小児救急科
- 2) 大阪市立環境科学研究所微生物保健グループ
- 3) 大阪市立総合医療センター小児神経内科
〔〒534-0021 大阪市都島区都島本通 2-13-22〕
- 4) 愛染橋病院小児科

表 ヘルペスウイルス real-time PCR 法のプライマー

項目名	Forward Primer	Reverse Primer	TaqMan Probe
CMV	GCGTGCTTTTAGCCTCT-GCA	AAAAGTTTGTGCCCAAC-GGTA	FAM-TGATCGGCGTTATCGCGTTCTTGATC-TAMRA
HSV-1	CTGTTCTCGTTCCTCACT-GCCT	CAAAAACGATAAGGTGTG-GATGAC	FAM-CCCTGGACACCCTCTTCGTCGTCAG-TAMRA
HSV-2	CAAGCTCCCCTAAGGAC-AT	GGTGCTGATGATAAAGAG-GATATCTAGA	FAM-ACACATCCCCCTGTTCTGGTTCCTAACG-TAMRA
EBV	CGGAAGCCCTCTGGACTT-C	CCCTGTTTATCCGATGGA-ATG	FAM-TGTACACGCACGAGAAATGCGCC-TAMRA
VZV	GATGGTGCATACAGAGAA-CATTC	CCGTTAAATGAGGCGTGA-CTAA	FAM-ATTACTGGAACCTGCAGCGCGGA-TAMRA
HHV-6	TTTGCAGTCATCACGATC-GG	AGAGCGACAAATTGGAGG-TTTC	FAM-AGCCACAGCAGCCATCTACATCTGTCAA-TAMRA
HHV-7	AAAGAATGGTTTTGTTCA-ACTCCAA	ACATTCACTTTGCGTGCA-TTTC	FAM-TCATCGAGAACATAGGAGAAGCTCCAG-CA-TAMRA

症研究班のインフルエンザ脳症ガイドラインを参照し、臨床症状に加え頭部 CT・頭部 MRI 検査、脳波検査結果を基に診断した。また、本検討では脳炎と明確に区別するため、髄液検査にて細胞数上昇を認めた症例、画像検査で異常を認めない、あるいは脳梁膨大部にのみ病変を認めた予後良好な脳症症例については今回の検討には含めなかった。

2. 原因病原体検索

1) 抗原検査

インフルエンザウイルス (Flu)、RS ウイルス (RSV)、ロタウイルスについて市販の抗原検査キットを用いて検索した。

2) 細菌培養検査

血液、髄液、喀痰・鼻咽頭吸引液の培養検査を行った。

3) 分子生物学的検査

Real-time PCR 法を用いて血液、髄液からのヘルペスウイルス属〔ヒトヘルペスウイルス 6 型 (HHV6)、HHV7、単純ヘルペスウイルス 1 型、2 型、水痘帯状疱疹ウイルス、サイトメガロウイルス、Epstein-Barr ウイルス〕の同定を行った (手法は下記詳述)。

また、2004 年より大阪市立環境科学研究所に依頼し、全例鼻咽頭吸引液検体から real-time PCR

法や reverse transcription PCR 法を用いて呼吸器ウイルス検索を施行した (手法は下記詳述)。

4) ウイルス分離

すべての検体について、Vero, RD-18S 細胞によるウイルス分離検査を試み、インフルエンザウイルス感染が疑われる場合は、MDCK 細胞を用いたウイルス分離も実施した。細胞変性作用が認められた検体については、培養上清を用いて、抗体を用いた中和反応、あるいは赤血球凝集抑制試験により、アデノウイルス、インフルエンザウイルスの型別同定を行った。

3. ヘルペスウイルス属分子生物学的検査

ヘルペスウイルス属の PCR 法は、急性期の EDTA 加血漿、髄液検体を使用し、QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN 社) によって DNA を抽出した。その後、各種プライマーを使用し (表)、温度条件は 50°C 2 分間、95°C 10 分間で反応させた後、96°C 15 秒間、61°C 1 分間で 50 サイクル繰り返した。ヘルペスウイルス属の PCR 法は 2005 年より行っており、血漿、髄液検体を用いて全例施行した。2005 年以前の症例に関しては発疹などの臨床症状に加え、末梢血単核球や髄液を用いて PCR を行い診断した。

4. 呼吸器ウイルス検索

鼻咽頭吸引液検体における呼吸器ウイルスの分

子生物学的検査は、RSV、ヒトパラインフルエンザウイルス 1~3 型 (HPIV-1~3)、ヒトボカウイルス (HBoV)、ヒトメタニューモウイルス (hMPV)、ライノウイルス (HRV)、エンテロウイルス (HEV)、インフルエンザウイルス (H1N1pdm) を対象に実施し、方法は既報に従った^{4~8)}。

脳症後の後遺症に関しては、重度四肢麻痺などの臨床症状に加え、施行可能な症例に関しては退院後 1 年を目安に発達検査を行い評価した。

原因病原体検索の結果を、比較的症例数の多い AEFCSE と HSES を中心に後方視的に検討した。

III. 結 果

全 93 症例の脳症分類ごとの内訳を図 1 に示した。AEFCSE が 41 例と最も多く、次いで HSES が 26 例、ANE が 6 例、ABS が 3 例、分類不能が 17 例であった。また、年度別の脳症の内訳を図 2 に示した。

1. AEFCSE

男女比は 26 : 15 とやや男児に多く、発症時年齢の中央値は 1 歳 5 カ月 (8 カ月~5 歳 10 カ月) であった。テオフィリン内服例は 10 例 (24.4%) であり、2004 年に 4 例と最も多く認められた。図 2 に示したように、2004 年は AEFCSE が多くみられたが、2005 年の小児喘息ガイドライン改正

後、乳幼児へのテオフィリン投与の制限された後、減少した。

後遺症としては、脳症後てんかんを残した症例は 10 例 (24.4%)、脳症後重度四肢麻痺を残した症例が 5 例 (12.2%) であった。発達指数が 70 以上の症例は 5 例 (12.2%) あり、そのうち 3 例では明らかな後遺症は認められなかった。

原因病原体は、HHV6 が 13 例 (31.7%) で最も多く、次いで Flu が 9 例 (22.0%) であった (図 3)。その他、ロタウイルス、RSV、hMPV、インフルエンザ菌 b 型 (Hib)、HPIV-1、HPIV-3 が 1 例ずつ認められた。原因病原体が不明であった症例は 13 例 (31.7%) であった。

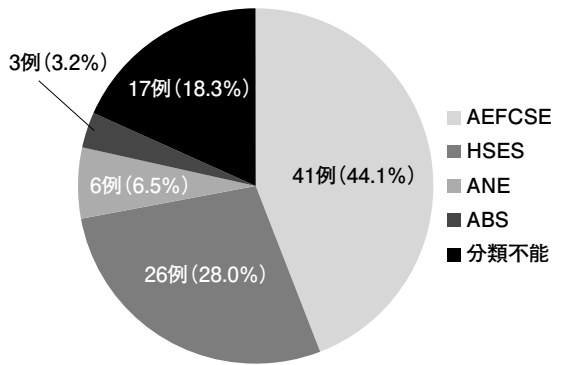


図 1 急性脳症症例数の内訳

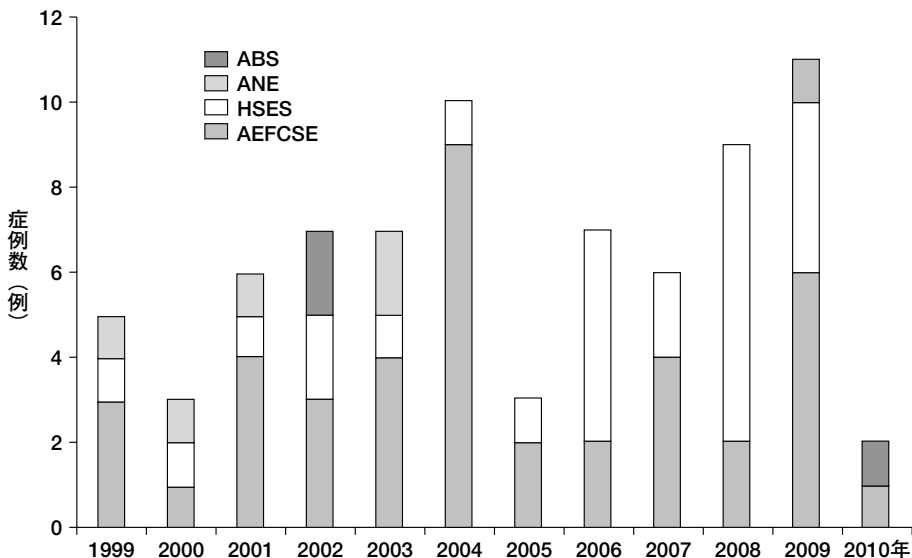


図 2 急性脳症の年度別分布

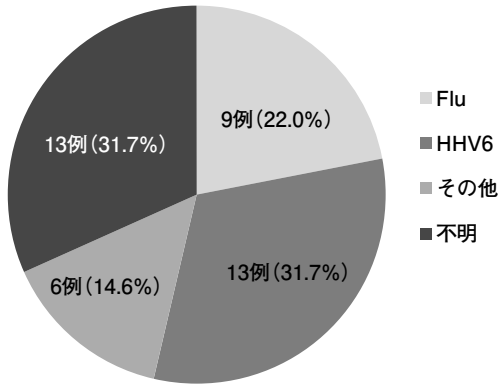


図 3 AEFCE の原因病原体検索結果
AEFCE の原因病原体は Flu と HHV6 で半数以上を占めていた。
Flu：インフルエンザウイルス，HHV6：ヒトヘルペスウイルス 6 型

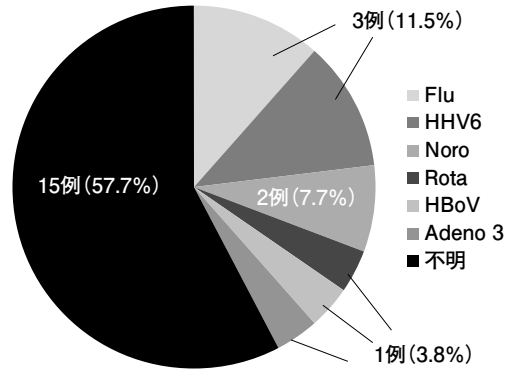


図 4 HSES の原因病原体検索結果
HSES では AEFCE と比較し，Flu，HHV6 の占める割合が小さく，原因病原体不明症例が多く認められる傾向にあった。
Noro：ノロウイルス，Rota：ロタウイルス，HBoV：ヒトボカウイルス，Adeno3：アデノウイルス 3 型

2. HSES

男女比は 13：13 であり，発症時年齢の中央値は 1 歳 6 カ月（1 カ月～15 歳 3 カ月）であった。12 例（46.2%）の死亡例があり，生存例でもほぼ全例で重度の後遺症を残した。原因病原体は，Flu と HHV6 が 3 例ずつ，ノロウイルスが 2 例，ロタウイルス，ヒトボカウイルス（HBoV），アデノウイルス（ADV）が 1 例ずつ認められた。原因病原体が不明なもの 15 例（57.7%）と，AEFCE と比較し，その割合は多かった（図 4）。

原因病原体が不明なものうち 3 例で発熱の契機として感冒症状を認めたが，術後発熱やうつ熱など非感染性の発熱が 4 例，発熱源が不明なものが 8 例にのぼった。

3. ANE

男女比は 3：3。死亡例は 1 例であり，重度四肢麻痺を残した症例が 2 例あった。原因病原体は Flu 5 例，HHV6 1 例。Flu のうち H1N1pdm が 1 例で認められた。

4. ABS

男女比は 1：2。死亡例は 1 例，重度四肢麻痺は 2 例で認められた。原因病原体は Flu 2 例，もう 1 例は不明であった。

図 5 に原因病原体が同定された 58 症例について年度別分布を示した。最も多いのは Flu であり，26 症例であった。特に 1998～1999 年度，2002～

2003 年度では AH3 の新株の流行（シドニー株，福建省株）が，2009 年には H1N1pdm の流行があり，それに一致して脳症の発症も多かった。HHV6 は 17 症例で認められた。そのうち，大量の血漿中 HHV6 DNA（ $7.4 \times 10^4 \sim 3.9 \times 10^6$ copy/ml）により HHV-6 が原因病原体であると同定されたものの，解熱後発疹を認めない症例も 6 例（35.3%）あった。ロタウイルスは 2 例のみにとどまった。また，2004 年以降に鼻咽頭吸引液検体の呼吸器ウイルス遺伝子検査を開始してから，2005 年には hMPV が 2 例，2008 年は HBoV が 1 例，2009，2010 年に HPIV が 1 例ずつ同定されるなど，HHV6 や Flu 以外の呼吸器ウイルスが原因病原体となる割合が高くなっていった。

IV. 考 察

急性脳症の多くは小児にみられ，発熱を契機に意識障害やけいれんなどで発症する重篤な疾患群である。1990 年代後半からインフルエンザ脳症研究班などで知見が集積され，2005 年 11 月にインフルエンザ脳症のガイドラインが公表され，その病態，診断・分類，治療法について多くの研究がなされてきた。しかし，生命予後の改善は得られてきたものの，依然として神経学的後遺症を残す症例も多いのが現状である。

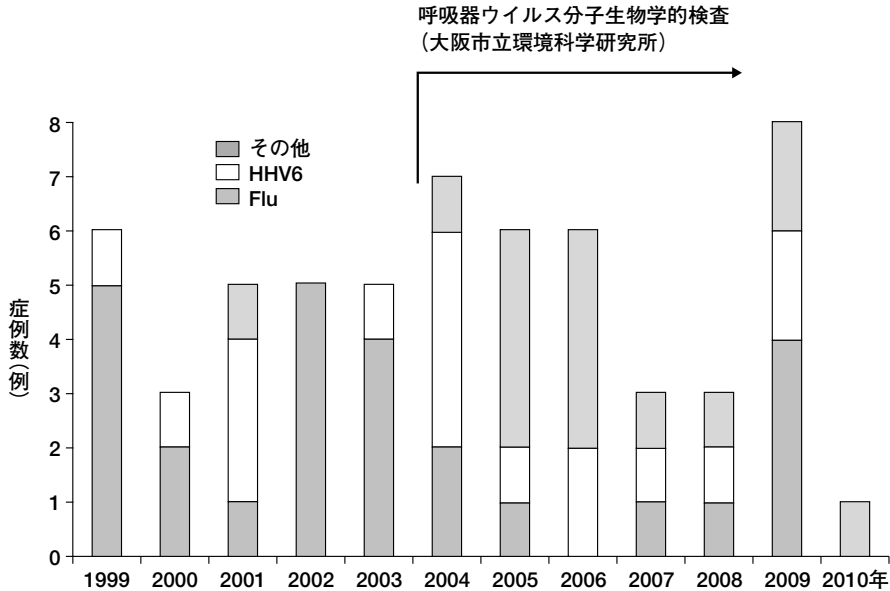


図5 原因病原体の年度別分布

2004年に呼吸器ウイルス分子生物学的検査開始後、HHV6やFlu以外の多様な病原体が急性脳症の原因となり得ることがわかってきた。

「インフルエンザ脳症」の名前に代表されるように、Fluは脳症の原因ウイルスの代表として考えられていたが、Fluによる感染を契機に起きた脳症であっても、決して同一の臨床症状を呈するわけではなく、症状や画像変化を中心とした脳症の分類が試みられてきた。この脳症の分類に基づいて、Hoshinoらは全国調査を行い、3年間983例を集積した⁹⁾。脳症の病型ごとに原因となる病原体に傾向がみられているが、いずれの施設でも十分な病原体検索が実施されているとはいえない。

今回検討した93例のうち、AEFCSEは図1に示したように41例(44.1%)と最も多く、Hoshinoらの報告とも合致する結果であった⁹⁾。AEFCSEの原因病原体をみると、HHV6が最も多く、次いでFluが2番目に多く、この2つのウイルスでAEFCSE全体の半分以上を占めていた(図3)。

われわれは、AEFCSEの病態の一つとして、けいれん重積状態に伴う興奮毒性(excitotoxicity)による遅発性神経細胞壊死を考えている^{10,11)}。HHV6やFluに関しては、熱性けいれんの原因ウイルスとしても高頻度で報告されており¹²⁾、その点では前述の仮説を今回の結果が支持していると

も考えられる。しかし、熱性けいれんの原因ウイルスとも完全に合致しているわけではない。ADVは熱性けいれんの原因ウイルスとして国内外でも上位に数えられるウイルスであるが¹²⁾、過去の報告ではADVがAEFCSEの原因病原体であった症例の報告は少ない。本検討でも、細胞分離ではADVはAEFCSEの原因病原体としてはみられなかったが、ADVに関してはPCRでの検索はできておらず、今後も検討が必要である。

HSESとAEFCSEの発熱原因の違いも注目すべき点である。HSESでもFlu、HHV6は原因病原体としては最も多かったが、HSESでは57.7%とその半数以上が原因病原体を特定できなかった。Hoshinoらの報告では、HSES20例のうち原因病原体が判明したのは7例であり、半数以上で原因病原体が特定されていないのは、今回の検討とも合致した。

また、HSESでは、感冒症状を伴わないうつ熱(ホットカーペットなど)や心臓血管外科術後の発熱など、感染症と直接関連のない原因であった症例もあり、この点はAEFCSEの発熱原因とは全く異なる結果であった。HSESは高体温自体が重要

な発症因子とされ、AEFCSE と比較して発熱原因は多岐にわたる印象を受けた。

図5に示したように、急性脳症全体の原因病原体としては、Flu が最も頻度が高く、HHV6 が2番目に多く、ロタウイルスは2例のみであった。Hoshino らは、ロタウイルスを Flu, HHV6 について3番目に多い病原体と報告している。今回は、ロタウイルス感染症との関連が指摘される、脳梁膨大部に一過性拡散低下を伴う脳炎・脳症 (clinically mild encephalitis/encephalopathy with reversible splenial lesion: MERS) を含んでおらず、そのために相対的に頻度が減ったものと考えられた。MERS は、細菌性髄膜炎, toxic shock syndrome, 重症肺炎など、以前から意識障害を伴うとされた疾患で MRI の拡散強調画像で見出されることが知られている。神経症状発症後10日以内に後遺症なく回復するなど、軽度意識障害例を多く含んでおり、何らかの神経学的後遺症を残すことの多い他の急性脳症の病型とは異質なところがあるため、今回は検討に含めなかった。

一方で、当院では2004年の呼吸器ウイルス遺伝子検査導入後より、HHV6 や Flu 以外の病原体がみつかるようになっており、多様な病原体で脳症が引き起こされることがわかってきた (図5)。また、HHV6 に関しては、解熱後発疹が認められない症例があることは当初より知られていたが¹³⁾、本検討においても解熱後発疹を認めない症例が35%で認められた。加えて、解熱する前に死亡する症例もあるため、臨床症状のみではなく real-time PCR を用いた診断が有用であった。

すべての脳症の発症因子解明のために、病原体の検索は非常に重要である。脳症の診察時には、抗原検査のみならず、血漿や髄液中のヘルペスウイルス属の real-time PCR や鼻咽頭吸引液検体の呼吸器ウイルスの遺伝子検査を用いた、より積極的な検査が必要と考えられた。

今回の報告は、12年間にわたる単一医療施設での検討であり、その結果の解釈にはいくつかの制限がある。検討期間中の検査手法の変化、新規導入に伴い、すべての症例で同様の検査方法を用いたわけではない。また、ヘルペスウイルス属の real-time PCR や呼吸器ウイルスの遺伝子検査な

どを行ったものの、これらの検査手法ですべての病原体を網羅しているとはいえない。単一医療施設での検討であり、自ずと症例数や施行可能な検査手法にも限界が生じる。

英国では、国内の各地の病院から脳炎患者の髄液や血清、血漿、便、尿、咽頭拭い液などを一つの研究施設に集め病原体の検索から自己免疫性脳炎に至るまで検索を行い、検討を行っている¹⁴⁾。しかし、欧米では急性脳炎、急性脳症は「脳炎脳症」あるいはまとめて「脳炎」と表現されているようであり、日本で近年明らかにされた「急性脳症」の新概念が理解されていないと考えられる¹⁵⁾。

疾患感受性の民族間の差異は大きく¹⁶⁾、「急性脳症」に関しては東アジアの国々で解明する必要がある。今後は、まず、日本でも急性脳症の患者の検体を全国から集約し、病原体を詳細に検索していくネットワークの構築が必要と考えられる。

ま と め

AEFCSE と HSES では、発熱の原因となる病原体の分布に差異が認められた。また、Flu や HHV6 以外にもさまざまな病原体が脳症の原因となり得るため、積極的な原因病原体の検索が必要と考えられた。

日本小児感染症学会の定める利益相反に関する開示事項はありません。

文 献

- 1) 塩見正司：インフルエンザ脳症の臨床スペクトラム。小児内科 35：1676-1681, 2003
- 2) 塩見正司, 他：突発性発疹または HHV6 初感染に伴う急性脳症。小児科 46：524-531, 2005
- 3) 九鬼一郎, 他：HSES. 小児科臨床ビクス (五十嵐隆, 塩見正司編). 中山書店, 東京, 2011, 178-181
- 4) Erdman DD, et al: GeneScan reverse transcription-PCR assay for detection of six common respiratory viruses in young children hospitalized with acute respiratory illness. J Clin Microbiol 41: 4298-4303, 2003
- 5) Ishiko H, et al: Human rhinovirus 87 identified as human enterovirus 68 by VP4-based molecular

- diagnosis. *Intervirology* 45 : 136-141, 2002
- 6) Kaida A, et al : Detection and quantitative analysis of human bocavirus associated with respiratory tract infection in Osaka City, Japan. *Microbiol Immunol* 54 : 276-281, 2010
 - 7) Kaida A, et al : Molecular epidemiology of human rhinovirus C in patients with acute respiratory tract infections in Osaka City, Japan. *Jpn J Infect Dis* 64 : 488-492, 2011
 - 8) インフルエンザ診断マニュアル (第2版) (http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/influenza_2003.pdf)
 - 9) Hoshino A, et al : Epidemiology of acute encephalopathy in Japan, with emphasis on the association of viruses and syndromes. *Brain Dev* 34 : 337-343, 2012
 - 10) 岩田欧介, 他 : 脳保護という幻想を現実に. *日小児会誌* 113 (6) : 909-922, 2009
 - 11) 山内秀雄, 他 : けいれん重積型急性脳症. *小児科臨床ピクシス* (五十嵐隆, 塩見正司編). 中山書店, 東京, 2011, 182-183
 - 12) Chung B, et al : Relationship between five common viruses and febrile seizure in children. *Arch Dis Child* 92 : 589-593, 2007
 - 13) Suga S, et al : Human herpesvirus-6 infection (exanthem subitum) without rash. *Pediatrics* 83 : 1003-1006, 1989
 - 14) Ambrose HE, et al : Diagnostic strategy used to establish etiologies of encephalitis in a prospective cohort of patients in England. *J Clin Microbiol* 49 : 3576-3583, 2011
 - 15) Davies E, et al : Encephalopathy in children : an approach to assessment and management. *Arch Dis Child* 97 : 452-458, 2012
 - 16) Dubray K, et al : Epidemiology, Outcomes, and Predictors of Recovery in Childhood Encephalitis : A Hospital Based Study. *Pediatr Infect Dis J*, 2013

A retrospective study of pathogens associated with acute encephalopathy in children

Hideo OKUNO¹, Kiyoko AMO¹, Takeshi INOUE², Jyunichi ISHIKAWA¹,
Masao TOGAWA¹, Masashi SHIOMI³, Atushi KAIDA⁴

¹*Department of Pediatric Emergency, Osaka City General Hospital*

²*Department of Pediatric Neurology, Osaka City General Hospital*

³*Department of Pediatrics, Aizenbashi Hospital*

⁴*Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences, Microbiology*

This retrospective study aimed to analyze acute encephalopathy in 93 children who were admitted to Osaka City General Hospital between January 1999 and December 2010. Of these children, 41 (44.1%) were found to have acute encephalopathy with febrile convulsive status epilepticus (AEFCSE), and 26 (28.0%) had hemorrhagic shock and encephalopathy syndromes (HSES). Human herpesvirus-6 (HHV6) was the most common pathogen causing preceding infection (13 cases, 31.7%), followed by influenza virus (9 cases, 22.0%). Among the children with HSES, only 3 cases (11.5%) had preceding infections caused by HHV6 and influenza virus, as compared with the AEFCSE cases, in which most infections in children with HSES were due to other pathogens. Infections preceding acute encephalopathy are most commonly due to HHV6 and influenza virus. However, other pathogens, such as human parainfluenzavirus, human metapneumovirus, and human bocavirus, were identified by multiplex real-time PCR using nasal swabs. In conclusion, HHV6 and influenza virus are the pathogens most commonly associated with acute encephalopathy. However, acute encephalopathy can also be caused by other viruses. Hence, further studies at the national level are necessary in order to identify the pathogens associated with acute encephalopathy and understand its pathology.

(受付 : 2013 年 6 月 10 日, 受理 : 2014 年 1 月 29 日)