

表6. グルタミン酸受容体の多様性と機能

サブファミリー	サブユニット		シナプス可塑性*	記憶学習†	神経パターン形成‡	自発運動§	発現部位
	マウス	ラット					
AMPA GluR α	$\alpha 1-\alpha 4$	GluR1-GluR4					
Kainate GluR β GluR γ	$\beta 1-\beta 3$ $\gamma 1, \gamma 2$	GluR5-GluR7 KA1, KA2					
NMDA	$\epsilon 1$	NR2A	○	○			びまん性
	$\epsilon 2$	NR2B	○		○		前脳
	$\epsilon 3$	NR2C					小脳顆粒細胞
	$\epsilon 4$	NR2D				○	視床、脳幹
	$\zeta 1$	NR1					びまん性
	$\chi 1$	NR3A					
	$\chi 2$	NR3B					
GluR δ	$\delta 1$	$\delta 1$					内耳有毛細胞
	$\delta 2$	$\delta 2$					小脳プルキンエ細胞

*LTP †Morris water maze ‡Brainstem trigeminal complex §Open field test

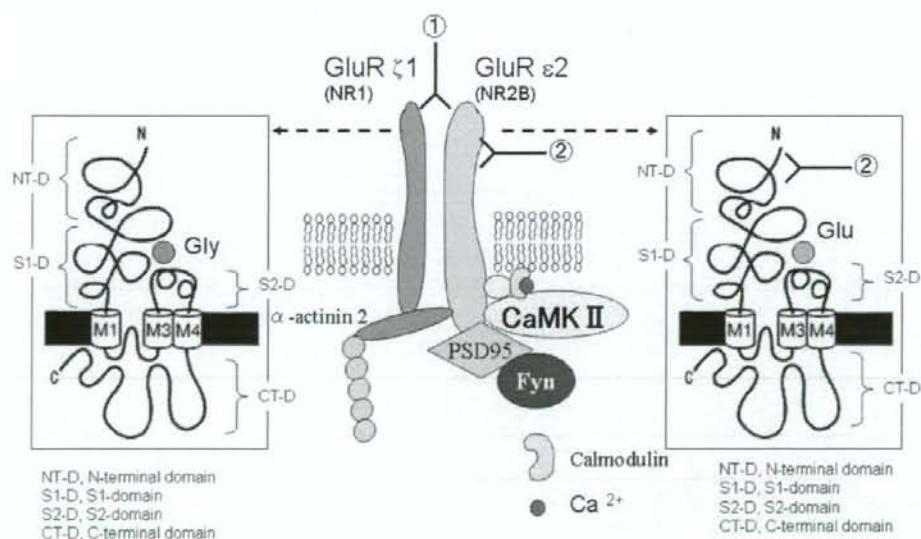


図3. NMDA型GluRの複合体構造と抗GluR $\epsilon 2$ 抗体エピトープ

Detection of autoantibodies to NMDA-type GluR

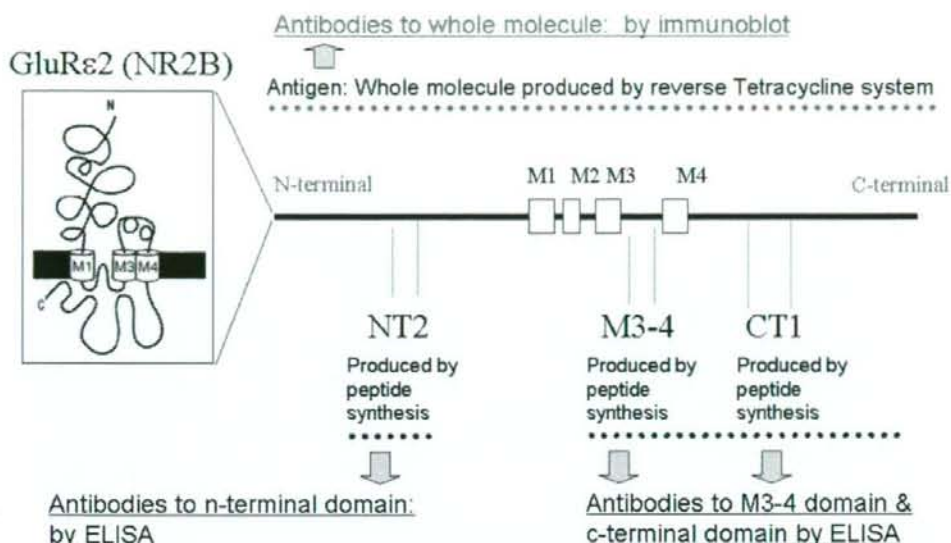


図4. 抗GluR ϵ 2抗体エピトープと疾患

NMDA受容体は異種のNMDA型GluRサブユニット (NR) が4つ会合した (ヘテロ4量体) 構造の陽イオンチャンネルで、GluR ζ 1 (NR1) にGluR ϵ 1-4 (NR2A-2D)、GluR χ 1-2 (NR3A, 3B) が会合している (表6. 図3)。最近、卵巣奇形腫を伴う傍腫瘍性辺縁系脳炎症例で、血清・髄液中にNR1+NR2B (NR2A) の複合体と反応する抗体が存在することがDalmauらにより報告された。我々の測定している抗GluR ϵ 2-NT2抗体はGluR ϵ 2 (NR2B) の細胞表面側ドメイン (NT2) を認識する抗体であるのに対し (図3-②) で示す抗体)、Dalmauらの抗体はGluR ϵ 2 (NR2B) 単独の細胞外ドメインを認識するのではなく、NR1+NR2B (一部はNR1+NR2A) の複合体の細胞外ドメインを認識しているとされている (図3-①) で示す抗体)。NMDA受容体のヘテロ4量体複合体は、GluR ζ 1 (NR1) とGluR ϵ 1-4 (NR2A-2D) が同時に発現しないと細胞表面に局在しないので、DalmauらのNMDA受容体サブユニットをHEK細胞に発現させて行なう抗体測定法では、単独サブユニットに対する抗体を検出することができない。我々の卵巣奇形腫を伴う傍腫瘍性辺縁系脳炎症例で、抗GluR ϵ 2抗体が陽性であり、Dalmauらの抗NMDA受容体複合体抗体の一部はGluR ϵ 2の細胞外ドメイン (おそらくはN末のどこか) をエピトープとしているものと思われる。

我々がスクリーニングに使っている全長GluR ϵ 2分子を抗原とした抗GluR ϵ 2抗体測定法は、抗原が幅広いため、N末からC末まで様々なエピトープの抗体を捉えることができる。そのため、GluR ϵ 2のN末に対する抗体が急性期に出現するNHLEのみならず、GluR ϵ 2のC末に対する抗体が主体のラスムッセン症候群急性期、小児広汎性脳炎慢性期、SSPEなどでも陽性となる (図4)。患者さんの疾患・検体採取時の病期・陽性エピトープの種類を総合的に考慮した上で、髄液中の抗GluR ϵ 2抗体の意義を判断する必要があると考えている。

E. 結論

MHALE症例は、かなりの頻度で抗NMDA型GluR複合体抗体、抗GluR2抗体、抗VGKC抗体、抗NAE抗体などが陽性で、髄液でのリアルタイムPCR法による検索ではウィルスが同定される症例は極めてまれであることが判明した。病理学的にもNHALEの海馬病変は、ミクログリアの増勢に加えて海馬CA1の実質内にCD8陽性T細胞が比較的多くみられことが分かった。よって、NHALEには自己免疫介在性脳症の病態を呈するものが多いと言える。

これまで経験的に行なわれ、NHALEに有効と考えられている免疫学的治療（ステロイドパルス治療など）が、早期であるほど有効である傾向が分かり、今後自己免疫病態が分子生物学的観点等から解明されることで、新たな治療法が見つかる可能性が出てきた。

抗GluR2抗体は、GluR2分子のN末・M3-4間・C末をエピトープとする抗体がほぼ等しく血清および髄液中に検出され、GluR2分子の幅広い領域をエピトープとする抗GluR2抗体が産生されていた。よって、感染ウィルス以外からのGluR抗原

提示が存在するものと思われ、新たな治療法・予防法への発展が期待される。

血液脳関門はMMP-9を主体とした病態で機能の低下に陥っていることが分かり、その防御が新たな治療に結びつく可能性がある。

卵巣奇形腫を伴うNHALEは、Dalmauの方法に準じたNMDA型GluR複合体に対する抗体の測定が、我々の研究班で可能となり、今後病態の解明が進むものと思われる。

2008年度に分かった知見を速やかに「急性辺縁系脳炎等の自己免疫介在性脳炎・脳症」の診断スキーム (<http://www.hosp.go.jp/~szec2/06/06-1-2.htm>) に盛り込み、NHALE等の自己免疫介在性脳炎の研究・予後改善に役立てたい。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

2008年3月18日現在該当なし。

<資料1>

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
（総合）研究報告書

急性脳炎のグルタミン酸受容体自己免疫病態の解明から 新たな治療法確立に向けた研究

主任研究者 高橋 幸利

独立行政法人国立病院機構 静岡てんかん・神経医療センター臨床研究部長

研究要旨

脳炎症状で発病する急性脳炎・脳症には複数の病態が存在し、個々の病態の正確な解明、鑑別診断の確立、病態ごとの固有の治療法の開発が望まれている。

【疫学】日本の成人における急性脳炎罹患率は、19.0/100万人年（年間2114例）と推計され、小児の罹患率は～56.4/100万人年と推定した。後方視的研究ではあるが成人・小児合計すると、急性脳炎・脳症は日本では年間3100人が罹患しているものと推定され、ウィルス直接侵襲が証明できない傍感染性の病態が多いと推測された。

【病理】非ヘルペス性急性辺縁系脳炎・脳症（NHALE）と考えられる症例の中には、大脳に広範囲に炎症の存在が示唆される病変がみられる症例と、比較的海馬領域に限局した病変を示す例があることが分かった。

【抗GluR2抗体】成人NHALEでは、血清抗GluR2抗体が急性期～慢性期に約55%の症例で陽性であった。髄液抗GluR2抗体は急性期（51.8%）、回復期（41.4%）、慢性期（28.6%）と、徐々に陽性率が低下し、全例末エピソードを含んでいた。抗GluR2抗体陽性NHALEの74.5%は15-34歳が占め、抗GluR2抗体は主として若年成人の脳炎に関与していた。抗GluR2抗体陽性NHALEの初発神経症状は、精神症状が主体で、抗GluR2抗体陰性NHALEに比べてけいれんが有意に少なかった。抗GluR2抗体陽性NHALEでは陰性NHALEに比べて、急性期症状のけいれん・けいれん重積の出現が遅く、髄液細胞数が多かった。

【若年女性に好発する急性非ヘルペス性脳炎（AJFNHE）】AJFNHEでは12例中8例で抗GluR2抗体が陽性で、14例中4例で卵巣腫瘍との関連を確認、その一部はDalmauらの報告する卵巣奇形腫に合併する抗NMDA型GluR複合体抗体脳炎に包含された。

【抗VGKC抗体】非ヘルペス性辺縁系脳炎・脳症（NHLE）の20%で抗VGKC抗体が高値を呈し、抗VGKC抗体陽性NHLE症例は平均54.8±12.2歳で発病、亜急性の記憶障害・見当識障害、胸腺腫合併、ステロイド反応性などを特徴とした。

【抗NAE抗体】橋本脳症では、血清中に存在する抗神経抗体が α -enolase蛋白のN末端部位に対して特異的に反応することが明らかとなり、抗NAE抗体陽性の橋本脳症では平均発病年齢は53歳（23-83歳）で、急性脳症型が73%（辺縁系脳炎型=9%）を占めた。

【サイトカイン】傍感染性のNHALEの髄液では、IL-6とIL-10が上昇、IFN- γ が正常であり、炎症の原因はウィルスが主役ではないことを示した。一方、HHV6感染の証明できたHHV-6脳炎・脳症の髄液では、HHV-6 DNAの検出頻度・量は少なく、IL-8、IL-6が高値を示し、局所での炎症性サイトカインが病態に重要な役割を演じていることが推測された。

【傍腫瘍性神経症候群（PNS）】免疫寛容に重要な働きをするCD4⁺CD25^{high}制御性T細胞（Treg）は、PNSでは癌のみで神経症状なしのコントロール担癌患者群に比べ機能の低下が認められ、Hu-PNS（脳炎症状主体）で血管新生や大脳皮質形成に関与しているFGF basicが上昇していた。

【新たな脳炎関連自己抗原・抗体】ヒト脳由来cDNAを組み込んだT7ファージライブラリーを用

いて、T7 phage biopanningを行い、NOLC1 (Nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1)が脳炎患者血清と反応する抗原のひとつとなっていることが分かった。

【診断スキームの作成】急性辺縁系脳炎等の自己免疫介在性脳炎・脳症の診断治療を迅速に進め、病態研究を加速するために、「急性辺縁系脳炎等の自己免疫介在性脳炎・脳症」の診断スキームを作成した。このスキームはホームページに掲載され (<http://www.hosp.go.jp/~szec2/06/06-1-2.htm>)、幅広く臨床家がアクセスできるようにした。

【結語】急性脳炎・脳症の中には、かなりの頻度で抗GluR2抗体、抗VGKC抗体、抗NAE抗体などの自己抗体が陽性の脳炎・脳症が存在することが判明した。これらの自己抗体が陽性となる急性脳炎・脳症は、サイトカインなどの免疫機構が関与し、ステロイド治療が有効である共通性を持つことが分かり、早期診断・治療が望まれる。

これらの研究結果は、学問的に検討過程にあり即臨床応用できる段階ではないことに、ご注意願いたい。

分担研究者：

- 森 寿、富山大学大学院医学系研究科分子神経科学、教授
- 湯浅 龍彦、国立精神神経センター国府台病院、神経内科、部長
- 森島 恒雄、岡山大学大学院医歯学総合研究科病態機構学 小児医科学、教授
- 犬塚 貴、岐阜大学大学院医学系研究科神経内科・老年学分野、教授
- 岡本 幸市、群馬大学大学院医学系研究科脳神経内科学、教授
- 梶 龍兒、徳島大学医学部附属病院高次脳神経診療部、教授
- 熊本 俊秀、大分大学医学部脳・神経機能統御講座 (内科学第三)、教授
- 栗山 勝、福井大学第2内科 (神経内科)、教授
- 庄司 紘史、国際医療福祉大学リハビリテーション学部、教授
- 田中 恵子、国立病院機構西新潟中央病院

統括診療部・神経部長

- 中島 健二、鳥取大学教授医学部附属脳幹性疾患研究施設脳神経内科部門、教授
- 古川 漸、山口大学医学部生殖・発達・感染医科学講座、小児科学、アレルギー学、教授
- 細矢 光亮、福島県立医科大学医学部小児科、教授

研究協力者：

- 亀井 聡、日本大学医学部内科学系神経内科学分野、准教授
- 吉川 哲史、藤田保健衛生大学医学部小児科、准教授
- 中嶋 秀人、清恵会病院内科 部長 (大阪医科大学第一内科)
- 有村 公良、鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 神経病学・老年病学 准教授

A. 研究目的

急性脳炎・脳症は、軽微な感染症から急性期に意識障害・けいれん重積など重篤な症状に発展し、回復後も多くの症例で認知機能などの後遺症を残すため、予防法・より有効な治療法の確立が求められている。その病態には、①ウイルス直接侵襲 (1次性) 脳炎、②感染後であってもウイルスが中枢神経系で見つからない傍感染性脳炎・脳症、③傍腫瘍性脳炎・脳症、④全身性膠原病合併脳炎・脳症、⑤その他・分類

不能があると思われる (表1)。

表1. 急性 (亜急性) 脳炎・脳症の病態分類 (案)

- ①ウイルス直接侵襲 (1次性) 脳炎
- ②傍感染性脳炎・脳症
- ③傍腫瘍性脳炎・脳症
- ④全身性膠原病合併脳炎・脳症
- ⑤その他・分類不能

一般に“ウイルス性脳炎”の多くは感染後の免疫的機序による傍感染性脳症と推定されている。近年、抗GluR ϵ 2抗体などを有する傍感染性急性脳炎においてステロイド有効例が報告され、自己免疫が介在すると思われる脳炎の病態に関して、抗GluR ϵ 2抗体、抗GluR δ 2抗体、抗VGKC抗体、抗Yo抗体、抗Hu抗体、抗NAE抗体などの自己抗体の関与が報告されているが、各抗体の病態に果たす意義等は不明な点が多い。多くの脳炎症例における自己免疫機転の解明はまだ緒についたばかりで、未解明な点が山積している。

我々は、グルタミン酸受容体 (GluR) ϵ 2に対する自己抗体を代表とする各種神経自己抗体と、サイトカイン、ウイルス因子、宿主因子等について研究を進め、自己免疫介在脳炎の診断法の確立、免疫学的な観点からの新たな脳炎治療法の確立につなげることは、大きな意義があると考えている (図1)。

①ウイルス直接侵襲に分類される単純ヘルペス脳炎等では抗ウイルス剤による治療法があるが、多くの脳炎は対症療法的に治療されているのが現状で、病態に応じた治療法の確立が望まれている。

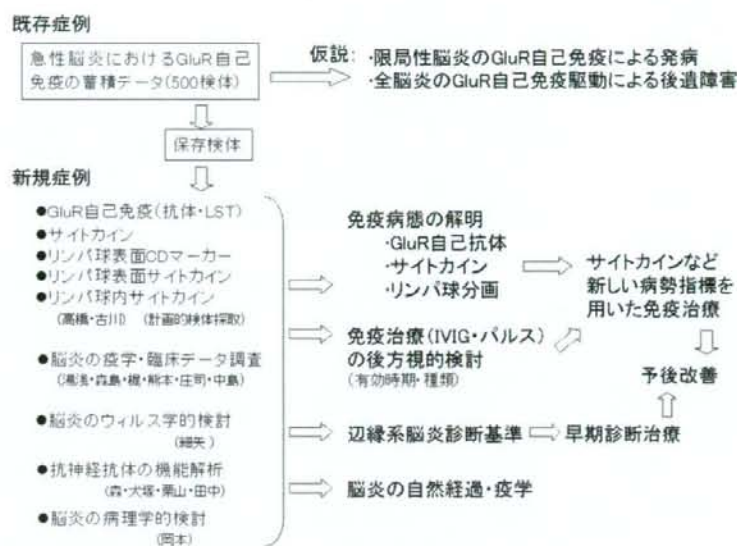


図1. 研究戦略

B. 研究方法

急性脳炎・脳症の疫学研究・自己免疫研究・画像研究等の目的を達成するためには、多数症例を集積し、臨床情報を統一した基準で整理し、血清髄液などの検体を研究リソースとして保存していく必要がある。そのために当研究班では急性辺縁系脳炎・脳症の多施設共同研究を立ち上げ、多施設共同研究のための症例登録基準(資料1)に合わせて幅広く症例を集積し、各種ウイルス検索、臨床データ解析、神経画像評価に加えて、血清・髄液の自己抗体(抗GluR ϵ 2抗体、抗GluR δ 2抗体、抗VGKC抗体、抗Yo抗体、抗Hu抗体、抗Ri抗体、抗CV2(CRMP-5)抗体、

抗Ma-2抗体、抗amphiphysin抗体、抗NAE抗体など)の測定、サイトカイン(IL-4, IFN γ , TNF α 等)・ケモカイン等の測定を行なう。

1. 急性辺縁系脳炎・脳症の多施設共同研究

分担研究者・研究協力者の施設を中心に前方視的に多数例の登録を行い、急性辺縁系脳炎・脳症症例を中心に臨床症状・自己抗体などを検討し、自己免疫病態の解明、辺縁系脳炎の診断基準・早期治療マニュアルを作成することを目指している。(分担:班員・研究協力者全員)。

自己抗体等の測定は表2に示すような施設で分担して行う。

2. 疫学研究

急性脳炎症状を呈する症例の日本における発症率、自己免疫介在性脳炎・脳症の頻度、急性脳炎の予後を含めた自然経過を明らかにするために、後方視的・前方視的疫学調査を行う。

成人症例の急性（亜急性）脳炎・脳症の発生

率を把握するために、鳥取県の各地域（東部・中部・西部）の11基幹病院神経内科に当研究班にて作成された診断登録基準（資料1）を送付し前方視的に調査を行う。（分担：中島）。

小児は、後方視的アンケート調査により全国調査を行い、疫学データを集積解析する（分担：森島）。

表2. 研究班における自己免疫病態解析の分担

検査項目	分担施設
抗GluRe2・GluR82自己抗体	静岡てんかん・神経医療センター
傍腫瘍症候群関連自己抗体 抗Yo抗体、抗Hu抗体、抗Ri抗体、抗Ma-2抗体、抗CRMP-5抗体、抗amphiphysin抗体、等	新潟大学脳研究所神経内科
抗VGKC抗体	鹿児島大学神経病学
抗NAE抗体	福井大学第2内科
サイトカイン（IL-6、IFN γ 、等）	山口大学医学部小児科学 静岡てんかん・神経医療センター
サイトカインなどのRNA遺伝子発現	静岡てんかん・神経医療センター
ウィルス検出	藤田保健衛生大学小児科 福島県立医科大学小児科
HLA	静岡てんかん・神経医療センター

3. 病理研究

発熱、意識障害、全身痙攣などがみられ、単純ヘルペス性脳炎が否定的な剖検例を検索する。また、老年病研究所附属病院での剖検例から虚血による海馬病変のみられた11例と海馬に病変のみられない対照5例も検討する（分担：岡本・栗山）。

4. 新しい抗神経抗体・自己抗原の検索

辺縁系脳炎患者の血清・ラット大脳を用い、二次元免疫プロットングを施行した後、抗体が認識する抗原蛋白を高感度ナノLC-MS/MSシステムを用いて分析する（分担：犬塚）。

ヒト脳由来cDNAを組み込んだT7ファージライブラリーを用いて、正常者血清抗体とは反応せず、脳炎患者血清抗体と特異的に反応するクローンの選択を行う（分担：森）。

5. 抗神経自己抗体の測定

① 抗GluRe2自己抗体の検討：

抗GluRe2・GluR82自己抗体はNIH3T3細胞中にてreverse tetracycline-controlled transactivator (rtTA)を用いた遺伝子発現系により合成したGluRe2・GluR82の全長蛋白を抗原として、自己抗体の有無を判定する（分担：高橋）。

抗GluRe2自己抗体のエピトープ解析は、GluRe2蛋白のN末の細胞外ドメイン（NT1）と、C末の細胞内ドメイン（CI-3）の3箇所をコードするDNAシークエンスを大腸菌発現ベクター-pGEXまたはpMALに組み込み、IPTG誘導により蛋白を合成させ抗原とし、測定する（分担：高橋）。

② 抗Hu、抗Yo、抗Ri、抗Ma-2、抗CRMP-5、抗amphiphysin抗体の検討：

融合蛋白を抗原としたELISAで確定診断を行う（分担：田中）。

③ 抗VGKC抗体の検討：

抗VGKC抗体は、家兔脳ホモジネートと¹²⁵I-alpha-dendrotoxinのmixtureに希釈した患者血清を加え、インキュベート後、ヒツジ抗ヒトIgG抗体を加え、免疫沈降をおこなって測定する(分担:有村)。

④ 抗NAE抗体の検討

α -enolase蛋白のN末端部位抗体の測定は、哺乳類細胞で作製・精製した α -enolase蛋白のN末端部位を用いて免疫プロットを行い同定する(分担:栗山)。

6. サイトカイン・ケモカインの役割の検討

凍結保存髄液を用いてinterferon- γ (IFN- γ)、tumor necrosis factor- α (TNF- α)、interleukin-2 (IL-2)、IL-4、IL-6、IL-10をcytometric bead arrayで、soluble TNF receptor 1 (sTNFR1)をELISA法で測定した。IL-8、MIP-1 α 、RANTES等をELISAキットで測定する(分担:古川、亀井、中嶋秀、高橋)。

傍腫瘍症候群では、Bio-Plex Suspension Array Systemを用いてIL-1b、IL-1ra、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12(p70)、IL-13、IL-15、IL-17、IP-10、Eotaxin、FGF basic、G-CSF、GM-CSF、IFN- γ 、MCP-1 (MCAF)、MIP-1a、MIP-1b、PDGF-bb、Rantes、TNF- α 、VEGFの各サイトカイン濃度を検討する。測定は、Human Cytokine 27-plex Premixed Kitのサイトカインスタンダードを、0.20、0.78、3.13、12.5、50、200、800、3200 pg/mlの8濃度について標準曲線を作成し、サンプルの蛍光値を外挿して計算する(分担:田中)。

7. ウィルスに関する検討

中枢神経系へのウィルス直接侵襲の有無について、PCR法を用いて検討する(分担:細矢・吉川)。

8. 単純ヘルペスウィルス型特異抗体測定法の開発

単純ヘルペスウィルス型特異抗体(蛍光ELISA法)は、HSV-1、2型構造糖蛋白gG (ABI社)を抗原として用い、二次抗体はビオチン標識抗

ヒトIgM (SB社)、ビオチン標識抗ヒトIgG (CMN社)を用いて測定する。

9. BBB機能(血清MMP-9・TIMP-1)の検討

急性期の血清MMP-9およびTIMP-1値をELISA法(Amersham Biosciences社)で測定する(分担:古川、吉川)。

10. CD4⁺CD25^{hi}制御性T細胞(Treg)の検討

免疫寛容に重要な働きをするCD4⁺CD25^{hi}制御性T細胞(Treg)の検討は、ヘパリン加で10ml採血し、Fico11比重遠心法で単核球を採取し、CD4(FITC)、CD25(APC)、CD62L(PE)蛍光抗体でラベルし、FACS Ariaセルソーターを用いてCD4⁺リンパ球分画からCD25^{hi}CD62L^{hi}分画を分取した。ソーティングした細胞からRNeasy Mini Kit(QIAGEN社)でRNAを抽出、QuantiTect Reverse Transcription Kit(QIAGEN社)で逆転写し、対照遺伝子をGAPDHとしてABI PRISM7900を用いQuantiTect Probe Kit(QIAGEN社)、QuantiTect SYBR Green Kit(QIAGEN社)により定量的RT-PCRを施行した(分担:田中)。

(倫理面への配慮)

①組換えDNA実験について:マウスDNAを組み込んだ細胞を用いており機関承認実験に該当し、静岡てんかん・神経医療センターのP2レベル実験室にて、機関承認を経て行なっている。

②臨床研究倫理指針について:本研究は、厚生労働省の臨床研究倫理指針(平成15年7月)に従い、静岡てんかん・神経医療センター院長の許可の下、被験者の人権に十分に留意しながら、書面による説明同意を得た上で自己抗体測定を行っている。

③「急性辺縁系脳炎等の自己免疫介在性脳炎・脳症に関する多施設共同研究」は、倫理委員会の承認の方法にて行っている。

C. 研究結果

1. 急性辺縁系脳炎多施設共同研究の立ち上げとその後の経過

2005年7月末の交付基準額決定通知を受けて、2005年度は表3に示すように幹事会・キックオフミーティング等を行い、研究計画を策定し、2006年度の本格的な研究活動に向けて議論を行ってきた。

これらの会議の中で、急性脳炎のグルタミン酸受容体自己免疫病態の解明から新たな治療法確立に向けた研究のために、①急性脳炎の自

然経過・疫学調査、②急性脳炎症例の免疫病態の解明、③免疫治療法（ステロイド治療・パルス治療・IVIg治療）の効果の検討、④自己免疫介在性脳炎の診断基準・早期治療マニュアルの作成という4つの大きな研究項目を策定し、研究方法を検討、分担について話し合いを行った。

2005年度班会議で、多施設共同研究を行うことに合意し、会議以外にもメール等で協議を重ね、多施設共同研究の診断登録基準（資料1）を

表3. 多施設共同研究の立ち上げ

会議名	日付	内容
研究班幹事会	2005年8月25日	研究の進め方を討議
研究班キックオフミーティング	2005年10月21日	研究の進め方を討議
2005年度班会議	2005年12月2日	多施設共同研究実施決定
2005年度症例登録準備会議	2006年3月11日	多施設共同研究実施要領の検討
倫理委員会 (主任研究者施設)	2006年7月31日	主任研究者施設での倫理委員会承認、多施設共同研究の開始、分担研究者施設での倫理委員会申請開始
2006年度多施設共同研究 打ち合わせ会議	2006年10月14日	多施設共同研究の進捗状況・問題点確認
2006年度班会議	2006年12月2日	多施設共同研究の進捗状況・問題点確認

作成した。2006年7月31日に主任研究者施設（静岡岡てんかん・神経医療センターにおいて倫理委員会の承認を得て、共同研究を開始した。その後多くの分担研究者施設でも倫理委員会の承認を得て、開始後4か月間で42症例を登録できた。登録42症例の内、38症例が急性期検体で、急性脳炎は27症例であった。

2007年度はその後多くの分担研究者施設でも倫理委員会の承認を得て、開始後14か月間（2006年8月～2007年9月）で200症例を登録できた（表4）。今後これらの登録症例の、自己抗体等の検査を行い、臨床経過とともに検討し、急性辺縁系脳炎の中の自己免疫介在性のものについて、診断基準・早期治療マニュアルを作成する予定である（担当：湯浅・庄司・熊本・岡本・田中・犬塚・高橋）。

表4. 多施設共同研究の症例収集状況

急性脳炎・脳症	142
亜急性脳炎	14
傍腫瘍性辺縁系脳炎	12
再発性脳炎	9
膠原病	6
橋本脳症	5
ADEM	3
脊髄炎	2
インフルエンザ脳症	2

2. 「急性辺縁系脳炎等の自己免疫介在性脳炎・脳症」の診断スキームの作成

2007年度、自己免疫介在性急性辺縁系脳炎について、診断基準・早期治療マニュアルを作成するまでに至らなかったため、最終年度でも

あるので、急性辺縁系脳炎等の自己免疫介在性脳炎・脳症の診断治療を迅速に進め、病態研究を加速するために、「急性辺縁系脳炎等の自己免疫介在性脳炎・脳症」の診断スキームを作成した(資料2)。この診断スキームでは、自己免疫介在性脳炎・脳症の正確な診断法、より良い治療法を早期に確立するために、現時点で必要かつ可能と思われる検査について記載し、これまでの知見・文献などを整理してある。このスキームは、ホームページ (<http://www.hosp.go.jp/~szec2/06/06-1-2.htm>) に掲載され、幅広く臨床家がアクセスできるようにした。急性脳炎・脳症で自己免疫機序を検討するための一助となれば幸いである。

3. 急性脳炎・脳症の疫学調査

鳥取県における2001年から2005年の5年間の発症年齢16歳以上の成人に発症した急性脳炎の疫学調査を行った。2001年から2005年の5年間に成人49例の急性脳炎の発症が報告され、16歳以上成人における急性脳炎罹患率は全体で19.0/100万人年であった。年齢・性を標準化し日本人口における発症を推測すると、急性脳炎は年間2114例と推計された。

急性脳炎の内訳は、単純ヘルペス性10例(20.4%)で、傍感染性12例(24.8%)、傍腫瘍性4例(8.2%)、膠原病性2例(4.1%)、ウィルス性(単純ヘルペス以外)1例(2.0%)で、その他・分類不能20例(40.8%)であった。傍感染性辺縁系脳炎は全体の24.8%で、罹患率は4.7/100万人年であった。日本では傍感染性辺縁系脳炎・脳症は年間549例の発症があるものと推定された(中島)。

正確な罹患率を把握するには前向き調査が必要である。そこで、我々は鳥取県内の基幹病院に当研究班において作製された『急性辺縁系脳炎症例登録基準』を配布し前向き調査の体制を整え疫学研究を開始した。平成19年1月から8月までの間に、傍感染性辺縁系脳炎・脳症1例、全身性膠原病合併脳炎・脳症2例(橋本病1例、SLE1例)の3例の辺縁系脳炎・脳症症例が登録された。辺縁系脳炎・脳症の罹患率を明らかにするためには、引き続き前向き調査を行う必要がある(中島)。

小児における後方視的疫学調査は、調査期間:2005年1月~12月および2006年1月~10月の急性脳炎・脳症を対象とし、2848施設にアンケートを送付し、1339施設より回収し、354施設の1085症例を集積した。小児急性脳炎・脳症の原因はインフルエンザ(25%)、HHV-6,7(11%)、ロタウイルス(4%)、マイコプラズマ(3%)、ムンプス(3%)の順で、原因不明が27.6%を占めた(森島)。

平成15年1月から平成16年12月の2年間に、我が国で発生した突発性発疹症(突発疹)関連脳炎・脳症の実態を把握するためアンケート調査を実施した。回収率は70.2%であり、脳炎・脳症患者86症例が報告された。その結果、本邦における年間発生数は約60例と推定された。患児に性差は認めず、平均月齢は14.0±8.8ヵ月であった。神経症状は66%の症例で発疹出現前に認められた。頭部MRI検査では69%に異常所見を認め、このうち71%で後遺症を残した。髄液検査所見はほとんどの症例が正常であり、各種の画像診断でも特異的な所見に乏しいことが明らかとなった(吉川)。

4. 急性脳炎後遺症の実態

急性脳炎後の慢性期の患者が多く外来・入院診療を受けている国立病院機構の病院で、199症例の調査を行った。急性脳炎・脳症発病から約17年経過した状況を調査し、ADLの後遺症評価ではBarthel scoreが平均14.5±8.1、てんかん発作の後遺症スコアでは、平均2.0±1.4

(月単位でのてんかん発作)で、精神症状の後遺症評価では、平均1.4±0.8と軽度の障害があり、知的障害の評価表スコアは、平均2.6±1.9と軽度から中等度の知的障害があり、記憶障害の評価表スコアは、平均1.1±0.8と軽い障害が存在した。運動障害の評価表スコアは、平均2.2±1.2と歩行はできるが何らかの障害があるレベルであった。知的障害・運動障害は発病年齢が若いほど障害が強く、てんかん発作・知的障害は徐々に慢性期に悪化する経過を示した(高橋)。

5. 辺縁系脳炎の新たな枠組みの提案

従来はウイルスによる一次性脳炎の考え方が主流であった辺縁系脳炎に、様々な自己抗体が関与するということが認識されるようになった。辺縁系脳炎の原因を(A)ウイルス、(B)自己抗体の係る病態、(C)所属不明に分類し、(B)をさらに①傍腫瘍性辺縁系脳炎(paraneoplastic limbic encephalitis:PNLE)、②自己免疫疾患に関連する辺縁系脳炎(limbic encephalitis with autoimmune disease:LEAD)、③自己抗体介在性急性可逆性辺縁系脳炎(autoantibody-mediated acute reversible limbic encephalitis:AMEDARLE)に分類する(湯浅)。

6. 成人非ヘルペス性急性辺縁系脳炎における抗GluR α 2抗体の役割

我々は15歳以上の成人非ヘルペス性急性辺縁系脳炎(non-herpetic acute limbic encephalitis, NHALE)91症例について、急性期・回復期・慢性期に分けて抗GluR α 2抗体を検討した。血清中の抗GluR α 2抗体は急性期から慢性期までほぼ同じ約60%の症例で陽性で、IgM型は急性期から回復期は47%の症例で陽性、回復期に36%と陽性率は低下した(図2)。髄液中の抗GluR α 2抗体は急性期51.8%から慢性期28.6%と、徐々に陽性率が低下することが分かり、陽性症

例ではIgG抗体が7.3 \pm 5.2病日、IgM抗体が4.9 \pm 5.0病日で陽性となっていた(図2)。

7. 抗GluR α 2自己抗体のエピトープの検討

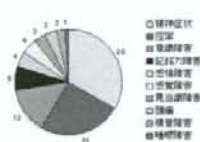
GluR α 2全長蛋白を用いたスクリーニングでIgG型またはIgM型自己抗体陽性を示した広汎型急性脳炎型(12例)・限局型急性脳炎型(5例)の保存血清・髄液を用い抗GluR α 2抗体のエピトープ解析を行った。急性期の検体では、限局性脳炎型を呈した髄液中の抗GluR α 2抗体陽性のNHALEの4例中4例でN末エピトープ(NT1)を含んでいたが、広汎性脳炎型の7例では見られなかった。回復期から慢性期の検体では、NHALEの1例中1例でN末エピトープが認められ、広汎性脳炎型では10例中2例で陽性であった。

脳炎発病時に少し先行する形で血液中にできた抗GluR α 2抗体が血液脳関門の破綻などにより中枢神経系に至り、N末エピトープが主にGluR α 2分子の細胞外ドメインであるN末に作用し、何らかの急性期脳炎症状に寄与するが、回復期・慢性期になると血液脳関門の回復により髄液中から抗GluR α 2抗体が消失する病態仮説を考えている(図3)(高橋)。

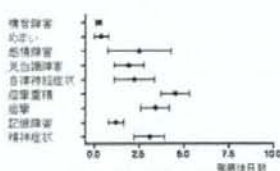
A. 辺縁系症状の定義

1. 精神症状等
行動異常、思考減退、興奮状態、幻覚、幻聴、精神運動興奮状態、統合失調症様状態、せん妄、性欲亢進、など
 2. 記憶障害
 3. 見当識障害
 4. 感情障害
- *1-4のうち3以上の症状を急性期に示し、5未満

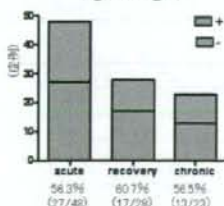
B. 初発神経症状



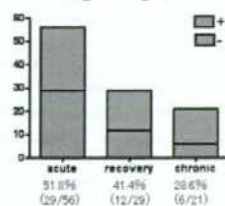
C. 急性期神経症状



D. 血清抗GluR α 2抗体 (IgG or IgM)



E. 髄液抗GluR α 2抗体 (IgG or IgM)



F. 髄液抗GluR α 2抗体陽性症例数 (IgG・IgM)

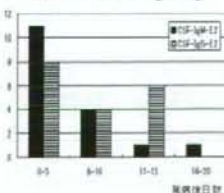


図2. 非ヘルペス性急性辺縁系脳炎・脳症の特徴

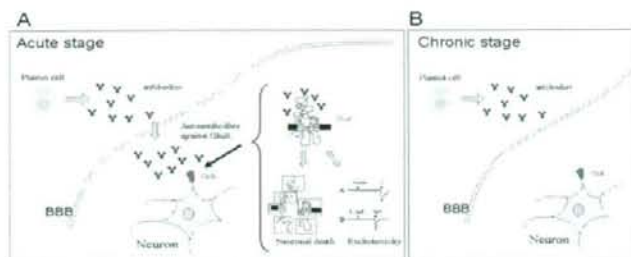


図3. 非ヘルペス性急性辺縁系脳炎・脳症の病態仮説

8. 非ヘルペス性急性辺縁系脳炎・脳症の臨床症状と抗GluRe2抗体の関連の検討

成人非ヘルペス性急性辺縁系脳炎・脳症 (non-herpetic acute limbic encephalitis, NHALE) における抗GluRe2抗体の役割を検討する目的で、抗GluRe2抗体陽性NHALE (陽性群53例) と抗GluRe2抗体陰性NHALE (陰性群16例) の臨床症状・検査所見・予後を比較した。

発病年齢は陽性群が陰性群より若年でMann-Whitney's U test, $p=0.01$ 、陽性群の74.5%は15-34歳であった。陽性群の初発神経症状は精神症状 (言動の異常) が最も多く、陰性群ではけいれんが多かった。急性期のけいれん・けいれん重積は陽性群で出現が遅かった (Mann-Whitney's U test, $p=0.007$)。髄液細胞数は陽性群で高値であったが (Mann-Whitney's U test, $p=0.02$)、髄液蛋白・IgGには差がなく、拡散強調画像MRIでの陽性所見は陰性群でやや高率であった。予後については両群とも記憶の面での障害が強かった (高橋)。

9. 急性脳炎・脳症後の後遺症病態と慢性期GluRe2抗体

我々は、小児-成人の急性脳炎・脳症後の91症例で、慢性期の予後 (ADL、てんかん発作、精神症状、知的障害、記憶障害、運動障害) と発病年齢、抗GluRe2抗体 (GluR, glutamate r

eceptor) 等との関係を検討した。

ADL障害・精神障害・知的障害・運動障害は年齢依存性の傾向を認め、小児例では発病年齢が低いほど重度であった。一方、てんかん発作頻度・記憶障害の程度は発病年齢とは関連がなく、抗GluRe2抗体陽性例で有意に重度であった。血清抗GluRe2抗体は低年齢発病症例で陽性率が高く、病因とは関連が乏しかった。急性期ステロイドパルス治療症例で慢性期血清抗GluRe2抗体の陽性率が低い傾向が見られ、てんかん発作頻度は有意に軽症であった (高橋)。

10. 抗GluRe2抗体の作用機序

IgM型抗GluRe2抗体陽性の患者血清を一次抗体とし、ラット脳を用いて施行した免疫組織化学的分析では、海馬および大脳皮質の神経細胞体および樹状突起近位部が染色性を示した (犬塚)。

NMO症例に現れた抗Aqp4抗体陽性と、抗GluRe2自己抗体の併存例における緩やかな臨床経過が示唆する所は、抗GluRe2自己抗体が組織障害にのみ作用するばかりでなく、ある状況では、つまり、細胞表面の受容体を挟んで競合的に作用する時には障害緩和に作用する可能性があるかも知れないということなのかもしれない。このように本抗体の真の意義については今後更なる検討を要すものである。(湯浅)。

11. 奇形腫を伴う傍腫瘍性辺縁系脳炎の臨床的検討

自験例を含むこれまで報告された奇形腫に伴った傍腫瘍性辺縁系脳炎31例について臨床的検討を行った。本症は、若年女性に好発し、精神症状、意識障害、痙攣、不随意運動、自律神経症状および中枢性低換気など比較的類似の症状を呈し、血液や髄液のEFA6A, NMDAR, またはGluRの各抗体が陽性で、免疫療法や腫瘍摘出が極めて有効であることが示された(熊本)。

12. 若年女性に好発する急性非ヘルペス性脳炎の病態の検討

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: AJFNHE)と診断した14症例における抗GluR抗体の検出と卵巣腫瘍の有無を検討した。12例中8例で抗GluR2抗体は陽性で、11例中7例で抗GluR82抗体は陽性だった。14例中4例で、卵巣腫瘍との関連を確認することができ、脳炎発症から卵巣腫瘍の診断までの期間は、脳炎発症1年前から発症後10年6ヵ月の間に分布した。脳炎発症1年前に卵巣腫瘍が発見された例では、腫瘍核出術が行われていた。4例中1例で組織型が確認され、成熟奇形腫だった。これらの4症例における髄液の抗GluR2抗体は4例中3例で陽性で、 δ 2抗体は4例中2例で陽性だった。これまでにAJFNHEと診断された症例の一部が、Dalmauらの報告した卵巣奇形腫に合併する抗NMDA型GluR複合体抗体関連脳炎に含まれる可能性があると考えられた(亀井)。

13. 単純ヘルペス脳炎と抗GluR抗体

庄司らの単純ヘルペス脳炎(HSVE)における抗GluR2・GluR82抗体いずれかの出現頻度は9/11例{血清(6/9)・髄液(2/7)}と高いが、抗GluR抗体が陽性であったのは8病日以降であり二次的な関与と推定した(庄司)。

亀井らのHSVEでの抗GluR抗体の検出頻度は7/10例であった(亀井)。

14. 非ヘルペス性辺縁系脳炎における抗VGK

C抗体に関する研究

NHLE60例中、12例で抗VGKC抗体400pMを超える強陽性を呈した。強陽性群は、壮年期発症で、亜急性の経過を呈していた。低ナトリウム血症については、7例で認められたが、S-IADHと判断された。約1/3の例で胸腺腫を合併していた。症状および抗体価は、ステロイド療法によく反応した。また、特筆すべき点として2例で再発・再燃が認められた。VGKC Ab+ NHLEは、免疫療法に反応し、比較的予後は良いものの、一過性の疾患ではなく、長期のフォローアップが必要であることが明らかになった(有村)。

15. 辺縁系脳炎と橋本脳症・抗NAE抗体

二次元免疫プロットとプロテオミクス法を用いて、6例の橋本脳症患者血清中に存在する抗神経抗体が α -enolaseを標的抗原とすることを明らかにした。さらに哺乳類細胞で発現・精製した組み換え α -enolase蛋白を用いた免疫プロットを行い、 α -enolase蛋白のN末端部位に対してのみ、橋本脳症患者血清が疾患特異性に反応(5/6, 84%)することが示唆された。

橋本脳症では急性脳症型が73%(辺縁系脳炎型が9%)を占め、急性脳炎・脳症の鑑別疾患として重要であった。(栗山)。

16. 非ヘルペス性急性辺縁系脳炎における髄液サイトカイン解析

非ヘルペス性急性辺縁系脳炎(NHALE)12例と疾患コントロール群として単純ヘルペス脳炎(HSE)13例の髄液を用いた。NHALE群のIL-6、IL-10およびHSE群のIL-6、IL-10、IFN- γ 、sTNFR1値は、非感染性非炎症性神経疾患(コントロール群)に比して有意に高値だった。NHALE群とHSE群の比較では、IFN- γ 、sTNFR1値が後者で有意に高値だった(IFN- γ : $p = 0.014$; sTNFR1: $p = 0.011$)。IL-6、IL-10値は両群間で有意差を認めなかった。TNF- α 、IL-2、IL-4値は両群とも有意な上昇を認めなかった。よって、両者とも炎症性サイトカインであるIL-6と抗炎症性サイトカインであるIL-10の有意な上昇を認め、中枢神経系内での炎症の存在を示唆した。NHALEでIFN- γ が上昇しないこと

はウイルス主体の病態でないことが示唆された。NHLE群で髄液sTNFR1値の上昇を認めなかったことは組織破壊が顕著でないことを示唆し、HSE群に比し予後が良好なこととの関連が考えられた(古川)。

17. 傍腫瘍性神経症候群における血清サイトカインの検討

傍腫瘍性神経症候群(paraneoplastic neurological syndrome: PNS)は悪性腫瘍患者の1%前後に発症するまれな疾患である。本症の多くの例で腫瘍と罹患神経組織に反応する特徴的な自己抗体が産生され、診断に有用である。サイトカインのうち、Hu-PNSで増加しCa onlyとの間で優位差を認めたものはFGF basicのみであり、Yo-PNSで増加しCa onlyとの間で優位差を認めたものはIL-5であった。また、Hu-PNSで増加しYo-PNSとの比較で優位差が見られたものはFGF basicおよびPDGF-bbであった。このほか統計学的に優位差は得られなかったものの、Hu-PNS群でCa-onlyに比し増加が見られたものはIL-5, IL-7, IL-9, IL-13, Yo-PNSでCa-onlyに比し増加していたのはIP-10であった。PNS患者血清中のサイトカインパターンは、抗体産生系の亢進、細胞傷害性T細胞増加、腫瘍増大を反映するサイトカイン群の増加が認められた(田中)。

18. 非ヘルペス性辺縁系脳炎における髄液中ケモカインの解析

非ヘルペス性辺縁系脳炎(NHLE)の髄液を用いてIL-8, MIP-1 α , RANTES, IP-10, MCP-1, sTNF-R1など7つのケモカイン、サイトカインを測定し、ヘルペス脳炎(HSE)、無菌性髄膜炎(AM)、脱髄性疾患・急性散在性脳脊髄炎のケモカイン・サイトカイン値と比較した。NHLE, HSE, AM間では、IL-8とsTNF-R1がNHLEで高値を、MIP-1 α , RANTESがAMで高くなる傾向が見られたが、ケモカインの上昇パターンに明らかな偏りは認められなかった。また、NHLEの抗GluR抗体陽性群と陰性群との比較では、全てのケモカイン、サイトカインで陰性群に比し陽性群で高くなる傾向が認められた。(中嶋秀)。

19. HHV-6脳炎・脳症の発症メカニズム解析

HHV-6脳炎の髄液中ウイルス量、サイトカイン濃度の解析を行った。HHV-6脳炎・脳症19例中5例(26.3%)で髄液中からHHV-6 DNAが検出(2.25-178.5 copies/ml)されたが、コントロール群では陽性例はなかった。髄液中サイトカイン及びMMP-9については、HHV-6脳炎・脳症のCSF中IL-8, IL-6, MMP-9が非HHV-6 FC群と比較して有意に高値を示した。さらにHHV-6脳炎・脳症患児のCSF中IL-8濃度は、HHV-6 FC群より有意に高値を示した。HHV-6脳炎患児髄液では、ウイルスDNAが検出されるとしてもその量は少なく、局所での炎症性サイトカインが病態に重要な役割を演じていることが推測された(吉川)。

20. 急性脳炎の新たな自己抗原スクリーニング系の開発

急性脳炎の新たな自己抗原スクリーニング系の開発を目的に、T7ファージディスプレイ法を用いて、急性脳炎患者血清抗体に反応する抗原分子のスクリーニングを行い、NOLC1蛋白質を同定した。抗NOLC1抗体のELISA法による検出系を構築した(森)。

21. 高感度ナノLC-MS/MSシステムを用いた新規抗神経抗体の検出と認識抗原の同定

抗GluR2抗体陰性の非傍腫瘍性非ヘルペス性辺縁系脳炎患者の血清を用い二次元免疫プロットングを施行し、ラット大脳に反応する自己抗体を検出した。その後、これらの抗体が認識する抗原蛋白につき高感度ナノLC-MS/MSシステムを用いて分析したところ4種類の抗原蛋白(Peroxiredoxin-2, Phosphoglycerate mutase 1, Beta-actin, Alpha-actin-2)を同定した。

CNSループス患者6名と健常者12名の血清中に存在する抗神経抗体を二次元免疫プロットングにより検出した。一人あたりの抗体反応スポット数はCNSループス患者で約6~12個、健常者で約2~38個であった。そのうち健常者の血清に反応せずCNSループス患者の血清に反応した抗体反応スポットは9個であった。これらのスポットに対する質量分析の結果、6個の抗

原蛋白を同定した。CNSループス患者6名と健常者12名の血清中に存在する抗神経抗体を二次元免疫ブロット法により検出した。一人あたりの抗体反応スポット数はCNSループス患者で約6~12個、健常者で約2~38個であった。そのうち健常者血清に反応せずCNSループス患者の血清に反応した抗体反応スポットは9個であった。これらのスポットに対し高感度ナノLC-MS/MSシステムを用い、このうちの6個の抗原蛋白を同定した。質量分析を施行した結果、Stress-70 protein、Rab GDP dissociation inhibitor alpha、Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha、L-lactate dehydrogenase B chain、F-actin-capping protein subunit alpha-2、Rab GDP dissociation inhibitor betaの計6種類の蛋白と同定した(犬塚)。

22. NMDA型GluR複合体に対する抗体検出系の確立

NMDA型GluR複合体に対する抗体測定系を開発するため、GluR2N/R-EGFP + GluR2N/RのNMDA型GluR複合体を発現する細胞を遺伝子組み換えにより構築中である(森)。

23. CD4+CD25^{high}制御性T細胞 (Treg)

免疫寛容に重要な働きをするCD4⁺CD25^{high}制御性T細胞 (Treg) に注目し、傍腫瘍性神経症候群 (PNS) 患者末梢血のTreg-rich分画において機能遺伝子のmRNA発現を定量的に解析し検討を加えた。その結果、PNS患者群ではコントロール担癌患者群に比べ複数の機能遺伝子で発現の低下が認められ、免疫制御系の低下により腫瘍、神経を標的とした活発な免疫反応がおきている可能性が推測された(田中)。

24. 血液脳関門機能

正常対照群の血清MMP-9値、TIMP-1値、MMP-9/TIMP-1比は 81.0 ± 54.9 ng/ml、 146.0 ± 85.4 ng/ml、 0.71 ± 0.61 だった。NHLE群の血清MMP-9値、TIMP-1値、MMP-9/TIMP-1比は 314.9 ± 75.3 ng/ml ($p = 0.0001$)、 263.0 ± 108.1 ng/ml ($p = 0.0117$)、 1.37 ± 0.63 ($p = 0.0266$) といずれの項目も正常対照群に比し、有意に高値

だった。急性期での血清MMP-9およびMMP-9/TIMP-1比高値は、血液脳関門 (BBB) 機能の低下を示唆した。血清TIMP-1値も有意に高値であり、BBB機能を保護するための防御反応が示唆された。MMP-9/TIMP-1比上昇は血液脳関門機能の低下を示唆し、末梢血中の免疫担当細胞の中枢神経系内への侵入を容易にし、中枢神経系内炎症を促進しやすい状態と考えられた。(古川)。

25. 剖検例の海馬の免疫組織学的検討

急性辺縁系脳炎・脳症が疑われた5剖検例と虚血による海馬病変のみられた11例の海馬領域を病理組織学的に比較検討した。急性辺縁系脳炎・脳症と考えられる症例の中には、大脳に広範囲に炎症の存在が示唆される病変がみられる症例と、比較的海馬領域に局限した病変を示す例がある。海馬病変は、残存神経細胞の形態と抗GluR2抗体に対する染色性からは、単なる虚血によるものとしては説明困難と思われた(岡本)。

26. 非ヘルペス性急性辺縁系脳炎の剖検例の病理学的検討

非ヘルペス性急性辺縁系脳炎 (NHLE) の剖検例を経験し、病理学的検討を行った。脳病理所見は、臨床症状が極めて重篤である割に軽度であり、海馬・扁桃体の一部に軽度~中等度の神経細胞の萎縮・変性、脱落、gliosisを認めたがりンパ球浸潤などの炎症性変化はごく軽度であった。これは、岡本らの報告症例(平成18年度本学会報告)の病理所見と類似しており、NHLEの中で一つの臨床病理学的一群を形成すると考えられた(栗山)。

27. 限局性病変を伴う無菌性髄膜炎

限局性病変を呈した3例の無菌性髄膜炎は、感染症状が先行し、血液検査で炎症所見が軽度であり、急性期は大脳皮質の炎症と浮腫が主に主体であり、次第に白質病変が出現し、慢性期に限局性の脳萎縮をきたしたことが特徴で、2例で見当識障害が残存した。血中抗GluR抗体は、2例でIgG α 2、1例でIgG δ 2抗体が陽性であったが、髄液抗体は陰性であった。病理所見からは血管周囲の炎症細胞浸潤、神経貪食像や壊死な

どはなく、軽度のミクログリアの浸潤とアストロサイトの増生を認め、自己免疫機序が考えられ、ステロイド治療により軽快した(熊本)。

28. 脳炎、脳症に対する新しいMRI撮像方法による画像解析の試み

徳島の非ヘルペス性急性辺縁系脳炎症例では、痙攣がない第2病日の時点で両側海馬に高信号変化(DWI-MRI)が見られ、早期診断に有用であった。

脳炎・脳症の症例において、拡散テンソル画像(DTI)によるADC(apparent diffusion coefficient)およびFA(fractional anisotropy)解析、MRスペクトロスコピー(MRS)を検討したところ、DTI・MRSが臨床経過を反映しており、病態の把握、モニタリングに有用である可能性が高いことが分かった(梶)。

29. 単純ヘルペス型特異抗体(蛍光ELISA法)

単純ヘルペス脳炎4例と急性辺縁系脳症(ALE)1例において、蛍光ELISA法でHSV型特異

抗体を検討した。ヘルペス脳炎4例中3例で1型と同定され、1例のALE例では、逆に2型に対し有意な上昇をみとめ、HSV-2型の再活性化・再燃が示唆された。HSV型特異抗体(蛍光ELISA法)は、回復期血清でのHSV型別診断および複合感染等の識別に有用と考えられる(庄司)。

30. 無菌性髄膜炎より分離したエコーウイルス30型の遺伝子系統解析

エコーウイルス30型の髄膜炎は数年おきに流行を繰り返している。福島県内で分離されたエコー30型の遺伝子を系統解析し、県内における無菌性髄膜炎の流行と遺伝子変異との関連、および世界の他の地域で流行したウイルスとの関連を検討した。その結果、数年おきの流行には遺伝子的に系統の異なるウイルスの出現が関与し、それらが世界的に伝播していることが示された(細矢)。

D. 考察

【疫学】

2006年度の我々の研究で、日本の成人(16歳以上)における急性脳炎罹患率は、19.0/100万人年(年間2114例)と推計され、2007年度の小児に関する急性脳炎・脳症の疫学研究では22か月間に1085症例報告され、罹患率は~56.4/100万人年と推定した。後方視的研究ではあるが成人・小児合計すると、急性脳炎・脳症は日本では年間3100人が罹患しているものと推定される。

急性脳炎・脳症発病から約17年経過した患者を調査すると、ADLの後遺症評価ではBarthel scoreが14.5/20、てんかん発作の後遺症スコアが2.0/4、精神症状の後遺症評価が1.4/2、知的障害の評価表スコアが2.6/5、記憶障害の評価表スコアが1.1/2、運動障害の評価表スコアが2.2±1.2/3と何らかの障害があるレベルであった。高次機能が6-7割に制限される障害が平均的には見られ、高頻度の後遺症発症を考えると急性脳炎・脳症の対策はきわめて

重要である。

病態別に見ると、2006年度成人研究ではウイルス直接侵襲が主体と思われる単純ヘルペス脳炎20.4%、ウイルス性(単純ヘルペス以外)2.0%、傍感染性24.8%、傍腫瘍性8.2%、膠原病性4.1%、その他・分類不能40.8%であった。小児ではインフルエンザ(25%)、HHV-6,7(11%)、ロタウイルス(4%)、マイコプラズマ(3%)、ムンプス(3%)の順で、原因不明が27.6%を占めた。成人ではウイルス直接侵襲が証明できる症例は22.4%と少なく、傍感染性の病態が重要と思われ、小児においてもウイルス直接侵襲が証明できないインフルエンザ脳症、75%の症例では髄液中ウイルスが証明できないHHV6脳炎・脳症などが多かった。よって、ウイルス直接侵襲以外の、免疫などが関与している可能性の強い脳症病態が、急性脳炎・脳症では多いと推測された。

【病理学的検索】

最近非ヘルペス性辺縁系脳炎の報告例が増加し注目されているが、その剖検例の報

告は少なく、その病理所見は十分解明されていない。我々の検討では、急性辺縁系脳炎・脳症と考えられる症例の中には、大脳に広範囲に炎症の存在が示唆される病変がみられる症例と、比較的海馬領域に限局した病変を示す例があることが分かった。後者の2例では主病変は海馬と扁桃核の神経細胞脱落とastrogliaの増生であり、海馬ではCA1に海馬硬化があり、炎症所見は明らかでなかった。他の発病早期の剖検文献例で炎症性細胞浸潤が確認されており、検討した2例の所見は、非ヘルペス性辺縁系脳炎の慢性期の所見である可能性がある。海馬病変は、残存神経細胞の形態と抗GluR2抗体に対する染色性からは、単なる虚血によるものとしては説明困難と思われ、急性期のけいれん重積などによる2次的な病理像の可能性は低いと推測した。

IgM型抗GluR2抗体陽性の非ヘルペス性急性辺縁系脳炎・脳症 (NHAE) 患者血清を一次抗体としたラット脳での免疫組織化学的分析では、海馬および大脳皮質の神経細胞体および樹状突起近位部が染色性を示すことが分かっている。今後NHAEの神経自己抗体や抗体以外の免疫機構が神経病変形成にどのような役割を果たしているのか、剖検組織で検討していきたい。

【抗GluR2抗体】

成人非ヘルペス性急性辺縁系脳炎・脳症 (NHAE) では、血清抗GluR2抗体が急性期-回復期-慢性期に約55%の症例で陽性であった。髄液抗GluR2抗体は急性期に51.8%の症例で陽性で、回復期は41.4%で陽性、慢性期は28.6%の症例で陽性と、徐々に陽性率が低下する傾向を示した(図2)。また、髄液抗GluR2抗体は、全例N末エピトープを含んでいた。NHAE急性期での血清MMP-9およびMMP-9/TIMP-1比高値は、血液脳関門 (BBB) 機能の低下を示唆した。以上より、感染その他の刺激により血清中に産生された抗GluR2抗体が、血管透過性の亢進した脳炎急性期中枢神経系に至り、GluR2分子の細胞外ドメインと何らかの反応を起こし、脳炎病態形成に何らかの役割を果たしている病態仮説を見出した(図3)。

抗GluR2抗体産生機構、N末エピトープを有する抗GluR2抗体のCNSでの作用、BBB機能

低下のメカニズムを解明することにより、革新的な脳炎治療が確立できる可能性がある。

【抗GluR2抗体陽性NHAEの臨床特徴】

抗GluR2抗体陽性NHAEは、15-34歳が74.5%を占め、15-45歳の抗GluR2抗体陽性率は80-100%であった。よって、抗GluR2抗体が若年成人の脳炎に主として関与していることが分かった。今後なぜ若年成人にこの抗体ができやすいのか検討していきたい。

初発神経症状は、抗GluR2抗体陽性NHAEでは精神症状が主体で、抗GluR2抗体陰性NHAEに比べてけいれんが有意に少なかった (Fisher's exact probability test, $p=0.0001$)。その後の急性期症状でも、けいれん・けいれん重積の出現が遅いことが分かった (Mann-Whitney's U test, $p=0.007$, $p=0.005$)。よって、抗GluR2抗体は痙攣に関しては抑制的、つまりは脳に対して保護的に働いている可能性がある。今後基礎的実験で検討していきたい。

抗GluR2抗体陽性NHAEの髄液細胞数は陰性NHAEに比べて有意に多く (Mann-Whitney's U test, $p=0.02$)、髄液蛋白・IgGには有意差がなかった。Barthel score、てんかん発作、精神症状、知的障害、記憶障害、運動障害でみた後遺症に、抗GluR2抗体の有無による有意差はなかった。

若年女性に好発する急性非ヘルペス性脳炎 (AJFNHE) と診断した12例中8例で抗GluR2抗体は陽性、11例中7例で抗GluR82抗体は陽性、14例中4例で卵巣腫瘍との関連を確認することができ、AJFNHEの一部が、Dalmauらの報告する卵巣奇形腫に合併する抗グルタミン酸受容体抗体関連脳炎に包含される可能性があると考えられた。

【抗GluR2抗体と抗NMDAR抗体】

最近、卵巣奇形腫を伴う傍腫瘍性辺縁系脳炎症例で、血清・髄液中にNR1+NR2B (NR2A) の複合体と反応する抗体が存在することがDalmauらにより報告された。これまで報告された奇形腫に伴った傍腫瘍性辺縁系脳炎31例について文献的に検討したところ、若年女性に好発し、精神症状、意識障害、痙攣、不随意運動、自律神経症状および中枢性低換気など比較的類似の症状を呈し、血液や髄液のEFA6A, NMDAR, またはGluRの各抗体が陽性で、免疫療法や腫瘍

摘出が極めて有効であることが示された。よって、急性辺縁系脳炎・脳症の臨床像示す若年女性の脳炎においては、早期に奇形腫の検索・自己抗体の検討を進める必要がある。日本におけるNMDA型GluR複合体に対する抗体測定システムの構築が望まれる。

NMDA受容体は異種のNMDA型GluRサブユニット(NR)が4つ会合した(ヘテロ4量体)構造の陽イオンチャネルで、GluR ϵ 1(NR1)にGluR ϵ 1-4(NR2A-2D)、GluR χ 1-2(NR3A, 3B)が会合している(表5, 図4)。我々の測定している抗N末-GluR ϵ 2抗体はGluR ϵ 2(NR2B)の細胞表面側ドメイン(NT1)を認識する抗体であるのに対し(図4-②で示す抗体)、Dalmauらの抗体はGluR ϵ 2(NR2B)単独の細胞外ドメインを認識するのではなく、NR1+NR2B(一部はNR1+NR2A)の複合体の細胞外ドメインを認識しているとされている(図4-①で示す抗体)。NMDA受容体のヘテロ4量体複合体は、GluR ϵ 1(NR1)とGluR ϵ 1-4(NR2A-2D)が同時に発現しないと細胞表面に局在しないので、DalmauらのNMDA受容体サ

ブユニットをHEK細胞に発現させて行なう抗体測定法では、単独サブユニットに対する抗体を検出することができない。我々の卵巣奇形腫を伴う傍腫瘍性辺縁系脳炎症例で、抗GluR ϵ 2抗体が陽性であり(未発表)、Dalmauらの抗NMDA受容体複合体抗体の一部はGluR ϵ 2の細胞外ドメイン(おそらくはN末のどこか)をエピトープとしているものと思われる。

我々がスクリーニングに使っている全長GluR ϵ 2分子を抗原とした抗GluR ϵ 2抗体測定法は、抗原が幅広いため、N末からC末まで様々なエピトープの抗体を捉えることができる。そのため、抗N末-GluR ϵ 2抗体が急性期に出現するNHLEのみならず、抗C末-GluR ϵ 2抗体が主体のラスムッセン症候群急性期、小児広汎性脳炎慢性期、SPEなどでも陽性となる(図5)。患者さんの疾患・検体採取時の病期・陽性エピトープの種類を総合的に考慮した上で、髄液中の抗GluR ϵ 2抗体の意義を判断する必要があると考えている。

表5. グルタミン酸受容体の多様性と機能

サブファミリー	サブユニット		シナプス可塑性*	記憶学習†	神経パターン形成‡	自発運動§	発現部位
	マウス	ラット					
AMPA GluR α	α 1- α 4	GluR1- GluR4					
Kainate GluR β GluR γ	β 1- β 3 γ 1, γ 2	GluR5-GluR7 KA1, KA2					
NMDA	ϵ 1	NR2A	○	○			びまん性
	ϵ 2	NR2B	○		○		前脳
	ϵ 3	NR2C					小脳顆粒細胞
	ϵ 4	NR2D				○	視床、脳幹
	ζ 1	NR1					びまん性
	χ 1	NR3A					
	χ 2	NR3B					
GluR δ	δ 1	δ 1					内耳有毛細胞
	δ 2	δ 2					小脳プルキンエ細胞

*LTP †Morris water maze ‡Brainstem trigeminal complex §Open field test

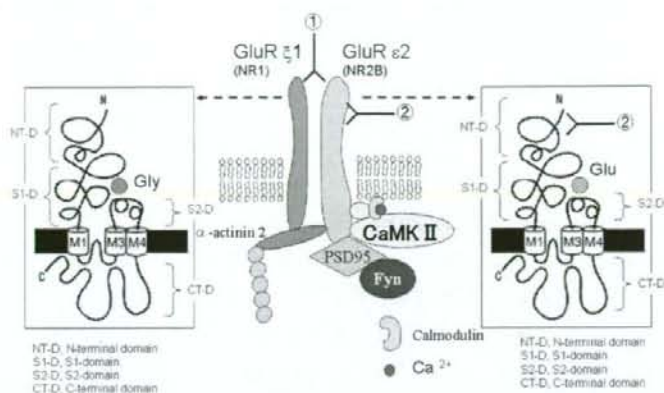


図4. NMDA型GluRの複合体構造と抗GluR2抗体エピトープ

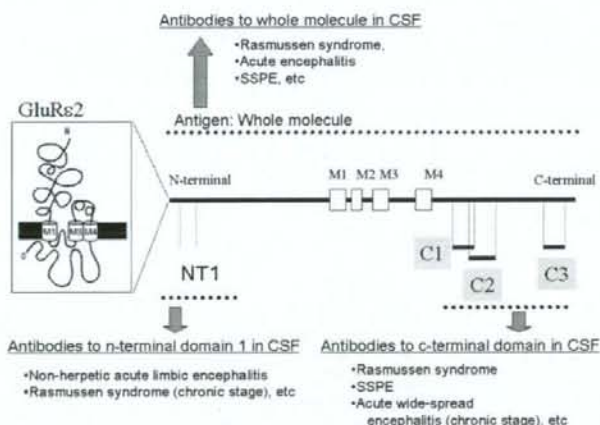


図5. 抗GluR2抗体エピトープと疾患

【抗VGKC抗体】

抗VGKC抗体陽性の非ヘルペス性辺縁系脳炎はVincentらによって提唱されたものである。我々の日本での調査で、非ヘルペス性辺縁系脳炎・脳症の20%を占め、発病は34-82歳（平均54.8±12.2歳）で、亜急性の記憶障害・見当識障害、胸腺腫合併などを特徴とし、パルス療法および後療法としてのプレドニゾン漸減療法によく反応することが分かった。辺縁系脳炎・脳症の臨床像示す症例では、この抗体を早期に測定し、腫瘍の検索・治療法の選択に活か

して行く必要がある。

【抗NAE抗体】

橋本脳症患者血清中に存在する抗神経抗体がα-enolaseを標的抗原とすることを明らかにし、さらにα-enolase蛋白のN末端部位に対してのみ、橋本脳症患者血清が特異的に反応することを見出した。

抗NAE抗体陽性の橋本脳症では平均発病年齢は53歳(23-83歳)で、急性脳症型が73%（辺縁系脳炎型が9%）を占め、急性脳炎・脳症の鑑別疾患として重要であった。

【サイトカイン・ケモカイン】

傍感染性の非ヘルペス性急性辺縁系脳炎 (NHALE) の髄液では、炎症性サイトカインであるIL-6と抗炎症性サイトカインであるIL-10が上昇し、炎症の存在が示唆されるが、単純ヘルペス脳炎 (HSE) で上昇するIFN- γ が正常であり、炎症の原因はウィルスが主役ではないことが分かった。一方、HHV6感染の証明できたHHV-6脳炎・脳症の髄液では、HHV-6 DNAの検出頻度・量は少なく、IL-8、IL-6が高値を示し、局所での炎症性サイトカインが病態に重要な役割を演じていることが推測された。よってウィルス感染が契機となるNHALEであっても中枢神経系ではウィルスよりサイトカインなどが病態の主役を務めている可能性があるものと思われる。

また、NHALEの抗GluR抗体陽性群と陰性群との比較では、全てのケモカイン、サイトカインで陰性群に比し陽性群で高くなる傾向が認められ、自己免疫が介在する脳炎・脳症ではサイトカインのみならずケモカインの関与も考えられ、今後多数例での検討を必要とすると考えている。

【傍腫瘍性神経症候群】

免疫寛容に重要な働きをするCD4⁺CD25^{high}抑制性T細胞 (Treg) は、傍腫瘍性神経症候群

(PNS) では癌のみで神経症状なしのコントロール担癌患者群に比べ複数の機能遺伝子で発現の低下が認められ、免疫制御系の低下により腫瘍、神経を標的とした活発な免疫反応がおきている可能性が推測された。Hu-PNS(脳炎症状主体)で血管新生や大脳皮質形成に関与しているFGF basicが上昇していて、脳炎急性期の病態あるいは回復過程の機構に関与している可能性があると考えられた。今後さらに検討し、傍腫瘍性の脳炎発病機構を解明していきたい。

【NMDA型GluR複合体抗体、新たな脳炎関連自己抗原・抗体の検索】

NMDA型GluR複合体抗体の検出システムの構築のために、Caを透過しない変異を組み込んだGluR21N/R-EGFP + GluR2N/R複合体を発現する培養細胞系を構築中である。この細胞形が完成するとDalmauと同じ方法の抗体測定が可能となる。ヒト脳由来cDNAを組み込んだT7ファージライブラリーを用いて、T7 phage biopanningを行い、NOLC1 (Nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1)が脳炎患者血清と反応する抗原のひとつとなっていることが分かった。今後さらに新たな自己抗体がないか、検索していく予定である。

急性脳炎のグルタミン酸受容体自己免疫病態の解明から新たな治療法確立に向けた研究

★急性脳炎・脳症は軽微な感染症に合併して起こる脳の病気で、虚寒・意識障害など重篤な急性期症状と、てんかん・知的障害・記憶障害などの永続的な後遺症が起る重要な疾患です。以前は、脳炎はすべてウィルスなどの病原体が脳に直接侵入して起こるとされていましたが、ウィルスが免疫を介して間接的に脳に障害をもたらす病態が考えられるようになってきていました。
★我々の研究で、急性辺縁系脳炎・脳症の病態には、グルタミン酸受容体(GluR)などに対する自己抗体・サイトカインなどが関与する自己免疫介在脳炎・脳症が存在することが明らかになりました。急性脳炎・脳症の新たな治療法に結びつくものと期待されます。



図6. 研究班の成果