

2009 35044 A (1/2)

厚生労働科学研究費補助金

こころの健康科学研究事業

急性脳炎・脳症の
グルタミン酸受容体自己免疫病態の解明・
早期診断・治療法確立に関する臨床研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

(1/2冊)

主任研究者 高橋幸利

平成22 (2010) 年 3月

目 次 (1/2冊)

I. 総括研究報告

急性脳炎・脳症のグルタミン酸受容体自己免疫病態の解明・早期診断・ 治療法確立に関する臨床研究	
高橋 幸利	-----1
(参照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）、 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 平成17年度-19年度総合研究報告書 (主任研究者：高橋 幸利)	-----27
(参照2) 厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）、 急性脳炎・脳症のグルタミン酸受容体自己免疫病態の解明・早期診断・ 治療法確立に関する臨床研究 平成20年度総括研究報告書 (主任研究者：高橋 幸利)	-----45
(参照3) 「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 20090816	-----64

II. 分担研究報告

1. 鳥取県における辺縁系脳炎・脳症の前向き疫学調査 (2009年)	
中島 健二	-----89
2. 急性脳炎・脳症に伴う画像変化の臨床病理学的研究	
熊本 俊秀	-----92
3. 非ヘルペス性辺縁系脳炎と診断された患者髄液におけるHSV以外の ヒトヘルペスウイルス検出状況	
吉川 哲史	-----97
4. 急性脳炎における血液脳関門の機能についての検討：MMP-9とTIMP-1の動態	
中嶋 秀人	-----100
5. 非ヘルペス性急性辺縁系脳炎・脳症における血液脳関門破綻の検討	
高橋 幸利	-----103
6. 非ヘルペス性急性辺縁系脳炎/脳症における血清neurofilamentの動態	
市山 高志	-----114
7. グルタミン酸受容体自己免疫の基礎的検討	
森 寿	-----117
8. 非ヘルペス性辺縁系脳炎患者の髄液中における新規抗神経抗体の同定	
犬塚 貴	-----120

9. 抗NAE抗体陽性脳症の臨床免疫学的検討		
栗山 勝	-----	122
10. 抗VGKC抗体陽性辺縁系脳炎に関する研究		
渡邊 修	-----	124
11. 抗NMDA受容体抗体陽性例の臨床的特徴に関する検討		
田中 恵子	-----	127
12. 抗グルタミン酸受容体抗体関連脳炎症例における卵巣奇形腫の 免疫組織学的検討		
岡本 幸市	-----	129
13. 卵巣奇形腫を合併する急性脳炎・脳症の抗NMDA型グルタミン酸受容体抗体の検討		
高橋 幸利	-----	132
14. 急性期に橋本脳症と鑑別を要した抗NMDA受容体脳炎の34歳女性例		
亀井 聡	-----	147
15. 軽度認知機能障害のみを呈した卵巣奇形腫関連傍腫瘍性脳炎の1例		
田畑 絵美	-----	15
3		
16. 抗グルタミン酸受容体抗体が介在する急性辺縁系脳炎に関する研究 血液浄化療法を取り入れた治療アルゴリズムの提案		
湯浅 龍彦	-----	155
17. 非ヘルペス性急性辺縁系脳炎の後遺症の検討		
庄司 紘史	-----	160
18. インフルエンザ脳症—新型インフルエンザ脳症の特徴—		
森島 恒雄	-----	164
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	167

目 次 (2/2冊)

IV. 研究成果の刊行物・別刷	
-----------------	--

I 総括研究報告

急性脳炎・脳症のグルタミン酸受容体自己免疫病態の解明・早期診断・ 治療法確立に関する臨床研究

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

辺縁系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。グルタミン酸受容体（GluR）の役割を主体に研究を行った。

【脳炎疫学】これまでの我々の急性脳炎罹患率研究では、成人19.0/100万人年、小児～56.4/100万人年と推定されているが、正確な罹患率を把握するには前向き調査が必要であり、鳥取県における急性辺縁系脳炎・脳症の前向き疫学調査を進めている。

【診断スキームの更新】2009年度は、「急性辺縁系脳炎等の自己免疫介在性脳炎・脳症」の診断スキームに、①MRI拡散強調画像による診断スキーム（参照3-資料7）、②非ヘルペス性急性辺縁系脳炎・脳症（NHALE）の発病初期の発作症状（seizure symptom）（参照3-資料6）、③抗GluR ϵ 2抗体（参照3-資料8）、④NHALEの予後（参照3-資料9）を加え、充実させた

（<http://www.shizuokamind.org/images/stories/pdf/06-1-2-15.pdf>）。

【NMDA型GluRサブユニット抗体測定法の改良】イムノプロット法より感度が高く簡便なELISAによるGluR ζ 1（NR1）のN末・C末抗体測定法を確立した。

【抗NMDA型GluR複合体抗体測定法（免疫染色法）の改良】カルシウム透過性の低い変異受容体サブユニットGluR ϵ 2N/RとGluR ζ 1N/R-EGFPを一過的に共発現させたHEK293細胞（ ϵ 2+ ζ 1）と、GluR ζ 1N/R-EGFPを単独で発現させた細胞（ ζ 1）を用いて、Dalmau法よりも安定したNMDA型GluR細胞外ドメインに対する抗体スクリーニングを可能とした。

【卵巣奇形腫を伴う非ヘルペス性急性脳炎（NHALE-OT）の抗NMDA型GluR抗体】NHALE-OTでは、GluR ϵ 2（NR2B）及びGluR ζ 1（NR1）のN末・C末に対する幅広いエピトープの抗体が末梢で産生され、髄液に移行し脳炎病態に関与すると推定した。

【卵巣奇形腫の免疫組織学的検討】卵巣奇形腫では神経組織の発現とリンパ球や単球・マクロファージの浸潤を認めるものの、脳炎例と非脳炎例の卵巣奇形腫の比較では、浸潤の程度や浸潤の部位について明らかな違いは見いだせなかった。

【新たな脳炎関連自己抗原・抗体】二次元免疫プロットと質量分析の手法を用いNHALE患者の急性期髄液中より抗Pyridoxal kinase抗体と抗Lamin A抗体を検出した。

【NHALEの血液脳関門病態】非傍腫瘍性NHALE急性期では、血液脳関門の破たんの程度の指標であるGluR ϵ 2分子の各ドメインに対する抗体の髄液/血清の比（R-M3-4, R-CT1）は脳炎発病4-5日後に最大となり、その程度が予後と相関することを明らかにした。

【NHALEの神経細胞障害】非傍腫瘍性NHALEには、血清リン酸化型NF-H（pNF-H）値が上昇し神経細胞脱落が示唆される症例と、血清pNF-H値が正常範囲で、神経細胞の脱落を認めない症例（約6割）が存在した。

【NHALEのウィルスの関与】非傍腫瘍性NHALE61例の髄液検体中、VZV、HHV-6、HHV-7、CMV DNA陽性検体はなかった。1検体で1184コピー/mlのEBV DNAが検出されたに過ぎない。

【NHALEの脳画像】NHALEのMRI拡散強調画像病変の特徴としては、①両側あるいは片側の内側側頭葉に淡いADCの低下を示すDWI高信号病変で、②14例中2例(14.3%)に出現し、頻度は比較的低い。③0~1病日と早期に出現することが上げられた。脳炎の経過中に痙攣発作を伴い、回復期に大脳皮質に層状のT1WI高信号域を伴った脳萎縮を認める頭部MRI画像病変は、脳炎に加えてけいれんによる影響も考慮する必要がある。

【抗NMDA型GluR複合体抗体陽性例の臨床的特徴】脳炎症状を呈する112例で抗体陽性・陰性例の臨床的特徴を比較すると、陰性群では発症年齢が高く、女性優位の傾向は陽性群より低く、痙攣・呼吸障害・不随意運動・自律神経症状を呈する頻度が低いことが確認された。

【抗VGKC抗体陽性辺縁系脳炎】非ヘルペス性辺縁系脳炎・脳症の約20%を占め、壮年期発症で、亜急性の臨床経過をたどり、SIADHを合併する場合は、抗VGKC抗体陽性辺縁系脳炎を積極的に疑う必要がある。病初期に腫瘍が検出されなくても、四肢のじんじん感を呈したり、再発再燃したり、治療抵抗性を呈する症例については引き続き、定期的に腫瘍の検索を行う必要がある。

【抗NAE抗体陽性脳症】臨床特徴として①急性・亜急性に発症、②意識障害、幻覚・妄想などの精神症状を呈する、③脳波の徐波化がみられる、④免疫療法に良好な反応性を有することが明らかとなった。

【治療】抗GluR抗体が介在するNHALEの治療では、抗GluR抗体をできるだけ早く除去することを目指し、血液浄化療法などを含めた治療アルゴリズムを今後検討する必要がある。

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：

- 湯浅 龍彦、医療法人社団木下会鎌ヶ谷総合病院千葉神経難病医療センター、難病脳(神経)内科センター長
- 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
- 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
- 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
- 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
- 田中 恵子、金沢医科大学脳脊髄神経治療学(神経内科学)、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

- 中島 健二、鳥取大学医学部脳神経医科学講座脳神経内科学分野、教授
- 森 寿、富山大学大学院医学系研究科分子神経科学、教授
- 渡邊 修、鹿児島大学大学院医歯学総合研究科、神経内科・老年病学、助教
- 市山 高志、山口大学大学院医学研究科小児科学分野、教授
- 吉川 哲史、藤田保健衛生大学医学部小児科、准教授

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、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)
- 佐々木 真理、岩手医科大学先端医療研究センター、

A. 研究目的

急性脳炎・脳症の病態には、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）。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。

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

1. 2005年度から2008年度研究のまとめ

2005-2007年度の厚生労働科学研究（こころの健康科学研究事業）「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）、それに続く2008年度の「急性脳炎・脳症のグルタミン酸受容体自己免疫病態の解明・早期診断・治療法確立に関する臨床研究」（主任研究者、高橋幸利）において、以下の点を明らかにできた（参照1・2）。

①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。鳥取県での調査による非ヘルペス性急性辺縁系脳炎・脳症（non-herpetic acute limbic encephalitis, NHALE）の罹患率は4.7/100万人年であり、まれな疾患ではないことを明らかにした。

②腫瘍を合併しない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、比較的海馬領域に局限した病変を示す例があることが分かった。NHALEの海馬病変は、マクローファージ/単球の増生に加えて海馬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。

③NMDA型GluRサブユニットのひとつであるG

luR2（NR2B）に対する抗体測定法を、これまでのイムノブロット法に比べて、より感度が高く簡便なGluR2（NR2B）のN末・M3-4間・C末ドメインペプチドを用いたELISAによる抗体測定法を確立した。

④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た。これらの事実から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に中枢神経系に至り、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。

⑤非傍腫瘍性NHALEにおける抗GluR2抗体のエピトープを検討するために、抗GluR2-NT2抗体、抗GluR2-M3-4抗体、抗GluR2-CT1抗体の検討を行った。抗GluR2抗体陽性のNHALEでは、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。よって感染ウイルス等に対する抗体が交差免疫でGluR2分子にも反応するというよりは、GluR2分子が幅広く断片化して抗原刺激となり、抗体産生が血液中で起こっている可能性が強い。

⑥Dalmauらの方法に準じた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った。さらに、カルシウム透過性の低い変異受容体サブユニットの発現ベクターを用い、より簡便な抗NMDA型GluR複合体抗体測定を開発中である。

⑦NOLC1（Nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1）が脳炎患者血清と反応する抗原の1つとなっていることが分かり、ELISA法が確立できた。高感度ナノLC-MS/MSシステムからも5つの新規のNHALE関連抗原が見つかった。

⑧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、炎症の原因はウイ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。

⑨非傍腫瘍性NHALE急性期での血清MMP-9、MMP-9/TIMP-1比高値および血清TIMP-1低値は、血液脳関門機能の低下を示唆した。回復期でも血清MMP-9、MMP-9/TIMP-1比高値および血清TIMP-1低値であり、血液脳関門機能の低下は長期間持続することが示唆された。

⑩非傍腫瘍性NHALE32例の髄液検体中、VZV、HHV-6、HHV-7、CMV DNA陽性検体はなかった。1検体で1184コピー/mlのEBV DNAが検出されたのみである。

⑪傍腫瘍性神経症候群 (PNS) において、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。

⑫成人非傍腫瘍性NHALEの後遺症では、ADL障害・精神症状・てんかん発作・知的障害・運動障害が約30%の症例に見られるのに対し、記憶障害は63.2%に見られた。ADL障害、てんかん発作、精神症状、知的障害、運動障害の程度は、正常の約80%程度のレベルに障害されていたが、記憶は約60%のレベルまで障害されており、他の障害に比べて記憶障害の頻度・程度が高度であった。パルス治療・IVIg治療ともに、治療開始が早いほど精神症状・急性期入院日数などの予後が良い傾向を示した。

⑬卵巣奇形腫を伴うNHALE 19例の臨床的検討では、若年女性に好発し、感染症が先行することが多く、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非傍腫瘍性NHALEと類似の症状を呈するが、非傍腫瘍性NHALEより重症であることが分かった。

⑭非ヘルペス性辺縁系脳炎・脳症 (NHLE) の約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。18例中9例の傍腫瘍群の腫瘍の内訳は、7例が胸腺腫で、その他、悪性リンパ腫と肺癌が各

1例ずつであった。傍腫瘍群の半数例で初発症状として四肢のじんじん感を呈していた。

⑮橋本脳症では、血清中に存在する抗神経抗体がα-enolase蛋白 (NAE) 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。

⑯若年女性に好発する急性非ヘルペス性脳炎 (AJFNHE) では抗GluR2抗体が66%で陽性、12例中8例で抗GluR2抗体が陽性で、卵巣腫瘍との関連を約30%で確認することができた。AJFNHE男性例の臨床像は女性例と極めて類似しているが、腫瘍の合併がないことが相違点であった。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。

⑰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.shizuokamind.org/images/stories/pdf/06-1-2-15.pdf>)、幅広く臨床家がアクセスできるようにした。2008年度はMRI画像の所見・診断的意義を検討した。

以上より、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。

2. 2009年度研究の目的

2009年度からの「急性脳炎・脳症のグルタミン酸受容体自己免疫病態の解明・早期診断・治療法確立に関する臨床研究」においては、図1に示すような戦略の下、自己抗体が脳炎症状を引き起こすメカニズムの解明、血液脳関門破綻のメカニズムの解明等を行い、新たな自己免疫的視点からの診断・治療法を開発するべく、取り組んでいる。

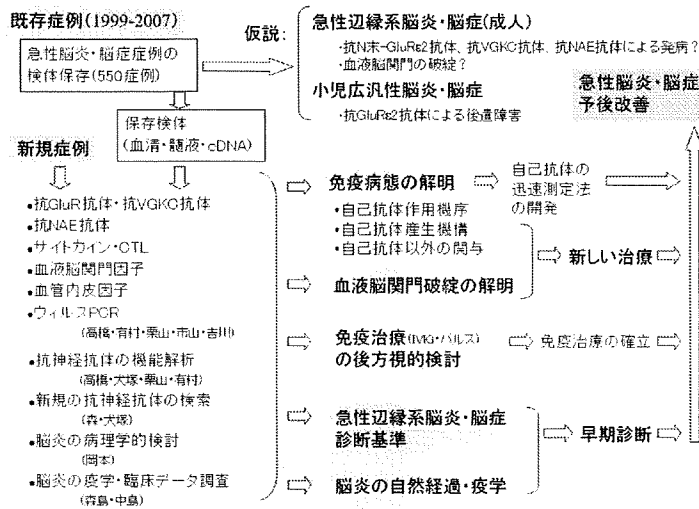


図1. 2009年度研究戦略

表2. 2009年度研究計画内容

- ①. 自己抗体が脳炎症状を引き起こすメカニズムについての研究
 - 抗GluR2抗体(高橋幸利担当)、抗VGKC抗体(渡邊修担当)について、IgGサブクラスを検討し、障害メカニズムを推定する。
 - 抗NAE抗体の生物学的効果を検討する(栗山勝担当)。
- ②. 自己抗体の迅速測定法の開発
 - 抗NMDAR1(GluR1)抗体をELISA法で測定できるようにする(高橋幸利担当)。
 - 抗NMDAR複合体抗体測定法を確立する(森寿、田中恵子担当)。
 - 脳炎における新規自己抗原(抗体)の検索のために、T7 Phage Display System(森寿担当)やラット脳の二次元免疫プロットングおよび高感度ナノLC-MS/MSシステム(犬塚貴担当)を用いて検討を行う。
- ③. 自己抗体産生機構(高橋幸利担当)
 - リンパ球のGluRが抗原となっていることが推定され、リンパ球細胞死に細胞障害性T細胞の関与があるか否かを検討するために、Granzyme Bを測定する。
 - 脳炎患者末梢Tリンパ球のGluR発現を検討する。
 - 脳炎患者末梢Tリンパ球のCaspase-3を検討する。
 - 脳炎患者末梢制御性T細胞の機能を評価する。
 - 全ゲノム対象タイピングによる辺縁系脳炎発症因子検索の可能性の予備的検討。
- ④. 血液脳関門破綻のメカニズム
 - サイトカイン、MMP-9、TIMP-1などを脳炎患者の血清・髄液で経時的に測定する(市山高志担当)。
 - 動物モデルでサイトカインの影響を検討する(森島恒雄担当)。
 - tight junctionに関する分子の検討。
- ⑤. 卵巣奇形腫合併急性辺縁系脳炎の免疫病態研究
 - 抗NMDAR複合体抗体のエピトープとなっているサブユニットを決定する(高橋幸利担当)。
 - 卵巣奇形腫内のGluR発現、炎症細胞浸潤を検討する(高橋幸利担当)。
 - 卵巣奇形腫の画像の検討(湯浅龍彦担当)。
- ⑥. 免疫学的治療(ステロイド治療・IVIg・血漿交換等)の有効性の検討
多施設共同研究の中で、急性辺縁系脳炎症例を前方視的に登録、免疫学的治療の有効性およびそのタイミングを、自己抗体・サイトカインなどの指標を考慮して詳細に検討する(湯浅龍彦、岡本幸市、犬塚貴、熊本俊秀、庄司紘史、高橋幸利担当)。
- ⑦. ウィルス因子の検討
PCRを用いた検出・ウィルス学的解析を行う(吉川哲史担当)
- ⑧. 自己免疫介在脳炎の診断スキーム作成(湯浅龍彦、岡本幸市、熊本俊秀、高橋幸利担当)
 - 多施設共同研究によりMRI所見に関する診断スキームを完成させる。
 - 多施設共同研究により辺縁系脳炎の予後のデータを加える。
 - 多施設共同研究により初発症状のデータを加える。
- ⑨. 脳炎の疫学検討
成人領域の前方視的疫学調査を行なう(中島健二担当)。
- ⑩. 脳炎症例の病理学的検討
これまでの脳炎剖検例を主体に、研究協力を得て引き続き脳組織標本を解析する(岡本幸市担当)。

表3. 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GluRε2・GluRδ2抗体	静岡てんかん・神経医療センター
抗NMDAR複合体抗体	金沢医科大学神経内科、富山大学
抗VGKC抗体	鹿児島大学神経内科・老年病学
抗NAE抗体	福井大学第2内科
サイトカイン（IL-6、IFN γ 、等）、MMP9、TIMP1	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
ウイルス検出	藤田保健衛生大学小児科
HLA	静岡てんかん・神経医療センター

表4. 多施設共同研究の症例収集状況

脳炎関連集積症例数（20081101-20091031）＝337症例

症例情報登録（20081101-20091031）＝212例

分類	20060807-20070917	20070917-20081031	20081101-20091031
急性脳炎脳症	142	185	181
亜急性脳炎	14	28	51
傍腫瘍性辺縁系脳炎	12	21	30
再発性脳炎	9	20	12
膠原病合併脳炎脳症	6	7	14
橋本脳症	5	5	5
ADEM	3	4	2
MS		3	0
インフルエンザ脳症	2	2	2
SSPE	1	0	1
血球貪食症候群	1	1	0
白質脳症		2	1
化膿性髄膜炎	1	1	0
HHE	1	0	0
OMS		10	6
小脳炎		14	22
傍腫瘍性脳幹小脳炎		7	5
脳幹脳炎	1	3	4
脊髄炎	2	0	0
その他		1	1
合計	200	314	337

B. 研究方法

今年度は、表2に示すような研究内容計画を策定し、研究活動を行った。多施設共同研究のための症例登録基準(参照3の中の資料1-4)に合わせて前方視的に幅広く急性辺縁系脳炎・脳症の症例を集積し、自己抗体等の測定は表3に示すような施設で分担して行った。

1. 急性辺縁系脳炎・脳症の多施設共同研究による症例の収集

分担研究者・研究協力者の施設を中心に、2005-2007年度の当研究班で作成した多施設共同研究のための症例登録基準(参照3の中の資料1-4)に合わせて前方視的に幅広く急性辺縁系脳炎・脳症の症例を集積し、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・髄液の自己抗体の測定、サイトカイン・ケモカイン等を経時的に測定し、自己免疫病態を検討した(班員・研究協力者全員)。

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生率、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、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10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(参照3の中の資料1-4)を送付し、辺縁系脳炎前向き調査体制を整備し、2008年9月から2009年8月までの期間、鳥取県における急性辺縁系脳炎を調査した(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(森島)。

3. 「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

この診断スキームは先行研究班で作成開始し、自己免疫介在性脳炎・脳症の正確な診断法、より良い治療法を情報提供するために、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、広く臨床に役立ててもらふことを目的としている。

2009年度は2008年度の4回の検討会議に引き

続き、①MRI拡散強調画像による診断スキーム(岩手医科大学佐々木真理先生の監修)、②非ヘルペス性急性辺縁系脳炎・脳症(NHALE)の発病初期の発作症状(seizure symptom)、③抗GluR ϵ 2抗体の特徴、④非ヘルペス性急性辺縁系脳炎・脳症(NHALE)の予後を、担当者の草稿を下に郵送により協議した(湯浅、岡本、熊本、森、佐々木、高橋)。

4. NMDA型GluRサブユニット抗体測定の改良

2008年度のGluR ϵ 2(NR2B)に対する抗体の測定法をイムノプロットからELISAに改良して高感度化したのと同様に、GluR ζ 1(NR1)分子のN末細胞外ドメイン(NT)、C末細胞内ドメイン(CT)のペプチドを合成し、それらを抗原としたELISA法による抗GluR ζ 1-NT抗体、抗GluR ζ 1-CT抗体の測定を検討した。対照血清および疾病対照髄液の平均+2SD以上を陽性とした(高橋)。

5. 抗NMDA型GluR複合体抗体測定法の改良

NMDA受容体は、GluR ϵ 2+GluR ζ 1の複合体として細胞表面上に発現するが、細胞培養液中に存在するグルタミン酸とグリシンに反応して活性化し、カルシウム透過により細胞死が誘導されてしまう。Dalmauら、田中らはMK801でこの問題に対処しているが、患者血清スクリーニングのためには、より安定したNMDA受容体発現株の樹立が必要であり、細胞毒性の問題を解決するためにカルシウム透過性の低い変異受容体サブユニット(GluR ϵ 2N/R, GluR ζ 1N/R-EGFP)の発現ベクターを構築し、HEK293細胞に導入した。また、同様にGluR ζ 1N/R-EGFPを単独でHEK293細胞に導入した。これらの細胞株を用いて患者血清の抗NMDA型GluR複合体抗体、抗GluR ζ 1(NR1)抗体の測定を検討した(森)。

6. 新しい抗神経抗体・抗原の検索

ラット大脳ホモジネートをサンプルとして二次元免疫プロットを施行し、PVDFメンブレン上の抗体反応スポットと一致したゲル上のスポットを切り出しトリプシン消化後MALDI-TOF-MSを用いてその認識抗原蛋白の同定を試みた。二次元免疫プロットでは一次抗体としてNHLE患者3名とHLE患者2名の急性期の髄液($\times 200$)を用いた(犬塚)。

7. 卵巣奇形腫合併急性脳炎 (AE-OT) におけるNMDA型GluRに対する各種抗体の検討

抗GluR抗体検索目的で静岡てんかん・神経医療センターに依頼のあった脳炎女性例の中で、急性脳炎・脳症と診断され卵巣奇形腫が経過中に見つかった53例を対象とした。

全長GluR2分子を抗原とする抗GluR2抗体の測定はimmunoblot法で行い、自己抗体の有無を陽性バンドの分子量とそのパターンの違いから、判定した(図2・3)。

GluR2分子の各ドメインに対する抗体の測定は、N末細胞外ドメイン (NT2)、M3-4間細胞外ドメイン (M3-4)、C末細胞内ドメイン (CT1) のペプチドを合成し、それらを抗原としてELISA法により吸光度 (OD) を測定した。NT2、M3-4、及びCT1を抗原とする抗体を、抗GluR2-NT2抗体 (ELISA)、抗GluR2-M3-4抗体 (ELISA)、抗GluR2-CT1抗体 (ELISA) と呼ぶ。対照血清および疾病対照髄液の平均+2SD以上を陽性とした。

抗GluR ζ 1-NT抗体、抗GluR ζ 1-CT抗体は方法4に述べた。

抗NMDA型GluR複合体抗体 (Dalmau法) は、すでにクローニングされたGluR ζ 1 (NR1) およびGluR ϵ 1 (NR2A)、GluR ϵ 2 (NR2B) それぞれのcDNAを発現ベクターpEF-BOSに挿入したプラスミドを、HEK293細胞にtransfectして、MK-801 10 μ Mを添加したDMEM/10% FCS中で18時間培養し、それぞれに患者髄液を反応させ、FITC-抗ヒトIgGを二次抗体として抗体を検出した。なお、NMDA型GluR各subunitの発現は、ウサギに免疫して得られた抗GluR ζ 1抗体および抗GluR ϵ 1抗体、抗GluR ϵ 2抗体を用いて確認した(図4、表5)。

臨床経過との関連は、脳炎症状出現日を0日として検討した(高橋)。

8. 抗LMNA抗体の検討

髄液中抗LMNA抗体の検出: ヒトLMNAリコンビナント蛋白 (Abnova社製) をサンプルとして対象患者の髄液 ($\times 200$) を用いてウエスタンブロットを行った。対象患者はNHLE患者14名、感染性髄膜脳炎患者10名、多発性硬化症患者10名、アルツハイマー型認知症患者10名とした(犬塚)。

9. 卵巣奇形腫の免疫組織学的検討

卵巣奇形腫のホルマリン固定したパラフィ

ン包埋切片をHE染色の他、免疫染色としてTリンパ球マーカーであるCD3、CD4、CD8、Bリンパ球マーカーのCD20、マクロファージ/単球のマーカーCD68、及び神経組織のマーカーGFAP・SMI-31に対する抗体を用いて通常の方法で染色した(岡本)。

10. 急性脳炎におけるMMP-9、TIMP-1、ケモカインの検討

対象は急性脳炎 16例と正常健常者 (NC) 13例、また疾患対照群として多発性硬化症 (MS) 16例、視神経脊髄炎 (NMO) 16例、ギラン・バレー症候群 (GBS) 10例、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 7例。いずれも大阪医科大学第一内科入院中に患者の同意のもと血清と髄液を採取して一般検査施行後に -80°C 保存した検体を使用した。MMP-9とTIMP-1、ケモカインとしてIL-8、IP-10、MCP-1はELISAキットを用いて、一次抗体吸着した96-well ELISAプレートに髄液50 μ lを添加。二次抗体反応後に発色反応を行いマイクロプレートリーダーにて吸光度を測定してMMP-9とTIMP-1の濃度 (ng/ml) を求めた(中嶋)。

11. 非ヘルペス性急性辺縁系脳炎 (NHLE) 等における血液脳関門破綻の検討

言動の異常で神経症状が始まった15歳以上のNHLE 48例を対象とした。

GluR2分子の各ドメインに対する抗体の測定は、N末細胞外ドメイン (NT2)、膜貫通部分M3-4間の細胞外ドメイン (M3-4)、C末細胞内ドメイン (CT1) のペプチドを合成し、それらを抗原としてELISA法により吸光度 (OD) を測定し、評価した。NT2に対する抗体を抗GluR2-NT2抗体、M3-4に対する抗体を抗GluR2-M3-4抗体、CT1に対する抗体を抗GluR2-CT1抗体と呼ぶ。症例の血清と髄液で、GluR2分子の各ドメインに対する抗体 (抗GluR2-NT2抗体、抗GluR2-M3-4抗体、抗GluR2-CT1抗体) をELISA法で測定し、各ドメイン抗体の髄液/血清の比 (R-NT2, R-M3-4, R-CT1) をBBB破綻の指標とした。脳炎症状出現日を0日として、BBB破綻の急性期推移等を検討した。ADL予後はBarthel score (20点満点) で、てんかん発作 (4点満点)、精神症状 (2点満点)、知的障害 (5点満点)、記憶障害 (2点満点)、運動障害 (3点満点) の予後は、それぞれのスコアで、急性期病院退院時あるいは最終観察時に評価した(高橋)。

12. NHALEにおける血清neurofilamentの動態

対象はNHALE 26例（男性8例、女性18例；15～79歳、平均37歳）。正常対照群は健康成人41例（男性5例、女性36例；15～78歳、平均40歳）。方法は急性期および回復期（21～247病日、平均94病日）における血清pNF-H値をサンドイッチタイプのELISAキット（EnCor Biotechnology 社、USA）で測定した。検定はMann-Whitney検定、Wilcoxon検定で行った（市山）。

13. NHALEにおける髄液中ウイルスの検討

国立静岡てんかん・神経医療センターに検査依頼のあったNHALE61名（男性27名、女性34名、年齢：36.9±22.9歳）の髄液61検体を対象とした。髄液200 μ lからDNAを抽出（QIAamp Blood kit, QIAGEN）し、最終的に50 μ lのelution bufferに溶解し、そのうち10 μ lをリアルタイムPCR法に使用した。VZV、HHV-6、HHV-7、CMV、EBV、HHV-8についてのreal-time PCR法の詳細は既に報告した通りである。HSV-1、2を除く6種類のヒトヘルペスウイルスDNA量を測定した（吉川）。

14. 画像病理比較研究

脳腫瘍が疑われ、脳生検により最終的に限局性脳炎と診断された1例と、辺縁系脳炎で剖検された1例の臨床所見、頭部MRI所見の経時的变化を検討するとともに、生検、または剖検脳組織の病理組織学検索を行い、画像所見と病理所見について比較検討した。病理組織学的検討では、H.E染色および抗GFAP抗体、抗CD68抗体を用いた免疫組織化学を行った（熊本）。

15. 抗NMDA型GluR複合体抗体陽性例の臨床的特徴に関する検討

本邦諸施設から抗NMDA型GluR複合体抗体検査を目的に当施設に寄せられた髄液・血清112例の検体について、以下の方法で抗NMDA受容体抗体の検討を行った。

方法は、NMDA受容体を形成するサブユニットNR1、NR2AおよびNR2BそれぞれのcDNAを発現ベクターに組み込み、Human embryonic kidney (HEK)細胞にトランスフェクトし、患者検体および市販の抗NR1/NR2抗体を反応させた。その後、FITCでラベルした抗ヒトIgGおよびPEでラベルした抗ウサギIgGを反応させて、蛍光顕微鏡で観察し、両者がco-localizeする染色が得

られた場合、抗NMDA型GluR複合体抗体陽性と判断した（田中）。

16. 抗VGKC抗体陽性辺縁系脳炎に関する検討

抗VGKC抗体陽性辺縁系脳炎は、壮年期の患者に起こる亜急性の辺縁系脳炎で、高頻度にSIA DHを合併し、免疫治療によく反応する1つのclinical entityであることが明らかになってきたが、病因論的に自己免疫性にも傍腫瘍性にも分類されることから、混乱が生じている。

対象は、NHLEの臨床診断で、平成17-21年に鹿児島大学に血清が送付された300症例。定法の¹²⁵I-alpha-dendrotoxin (IaDTX)を用いた免疫沈降により抗VGKC抗体を測定して、>400 pMの高力価を呈する18例を抽出した。便宜的に観察期間（最長4年、最短6ヶ月）内に腫瘍の存在を指摘できなかった症例を自己免疫群に割り当てた（渡邊）。

17. 抗NAE抗体陽性脳症の臨床免疫学的検討

対象症例：多施設の抗NAE抗体陽性脳症で、ステロイド治療をはじめとする免疫療法を行い、十分な臨床症状が得られた63例（自験11例；年齢19-87歳、男：女=15：48）を対象とした。

方法：免疫ブロット：NH₂末端側の α -enolase (NAE) (1-157アミノ酸) cDNAをヒト由来培養細胞に導入し組換え蛋白として精製、免疫ブロットにより血清中の自己抗体の有無を検討した。

臨床像の解析：対象症例の年齢・性、甲状腺機能、抗甲状腺抗体、発症様式、臨床徴候（意識障害、認知症、精神症状、けいれん、不随意運動、小脳失調）、脳波、頭部MRI、髄液蛋白/IgG上昇、免疫療法反応性を比較検討した。また、臨床病型を急性脳症型（辺縁系脳炎含む）、精神病型、その他（純粹小脳失調、CJD様）に分類し検討した（栗山・米田）。

18. 新型インフルエンザ脳症の特徴

新興感染症の新型インフルエンザ (H1N1 swine flu) に伴う脳症の特徴を明らかにするため、厚生労働省・日本小児科学会の集計をもとに検討した（森島）。

19. 治療アルゴリズムの提案

抗GluR抗体が介在する急性辺縁系脳炎 (AGURA-MaLe) には、抗GluR α 2抗体が関与するAMEDALE (autoantobody-mediated acute

reversible limbic encephalitis) (根本・湯浅・高橋2005)とDalmauらが報告した抗NMDA受容体抗体陽性例(2007)がある。GluR ϵ 2(NR2)とDalmauらのいう抗NMDA受容体抗体(NR1とNR2)は、同じNMDA型GluRの構造上の認識部位の差をいうもので、前者は後者の一部である。従って両者の基本的な考え方は同じであると見做される。両者の違いは、Dalmauらが卵巣奇形腫OTの存在を重視して、傍腫瘍性疾患と考えた点にある。前者はあくまでも急性の辺縁系脳炎に自己抗体が関与するという新たな概念を提唱した所に意義がある。

OT (+) 例の治療に関して、特に若年女性例にあつては、直ちに卵巣を摘出するかどうかは時に応じて慎重に判断すべきである。即ち、卵巣摘出に関する考え方は今後も症例を積み重ねた上で最終結論をまとめるべきという立場である。まずなすべきは出現している抗グルタミン酸受容体抗体を発症早期に可及的速やかに除去することであろう。

そうした立場から本年度は、まず抗AQP4抗体と抗GluR ϵ 2抗体が共に陽性であった特異な例を報告し、その症例を通して考察した抗体の意義そして血液浄化療法へのヒントを述べ、次い

で、発症早期から血液浄化療法を取り入れた治療アルゴリズム(案)を提案する(湯浅)。

20. 非ヘルペス性急性辺縁系脳炎(NHALE)の後遺症の検討

NHALEおよび類縁疾患3症例の後遺症に関し、知能、記憶、日常生活活動(ADL)を中心に神経心理学的評価を実施した。(庄司)。

(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。

A) NMDA型GluR複合体抗体 (established by Dalmau)

- ① [GluR ζ 1(NR1)+GluR ϵ 1(NR2A)]に対する抗体
- ② [GluR ζ 1(NR1)+GluR ϵ 2(NR2B)]に対する抗体

B) NMDA型GluRサブユニット抗体

・全長サブユニットに対する抗体

- ③抗GluR ϵ 2(NR2B)抗体

・サブユニットのドメインに対する抗体

- ④抗GluR ζ 1(NR1)-NT抗体
- ⑤抗GluR ζ 1(NR1)-CT抗体
- ⑥抗GluR ϵ 2(NR2B)-NT2抗体
- ⑦抗GluR ϵ 2(NR2B)-M3-4抗体
- ⑧抗GluR ϵ 2(NR2B)-CT1抗体

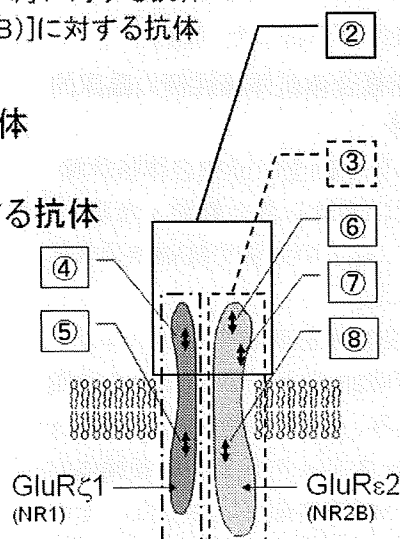


図2. NMDA型GluR サブユニット、複合体に対する抗体の分類

Detection of autoantibodies to NMDA-type GluR

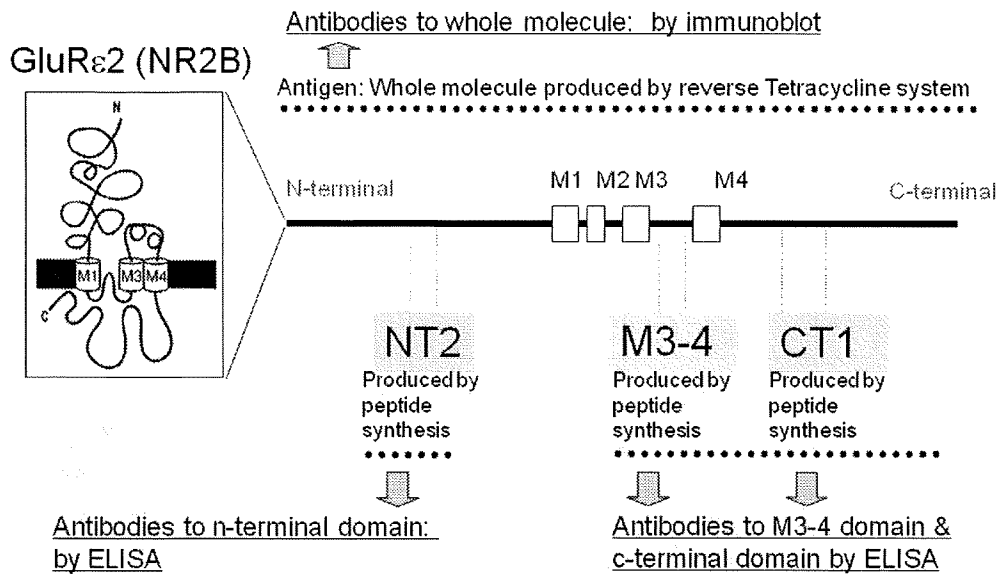
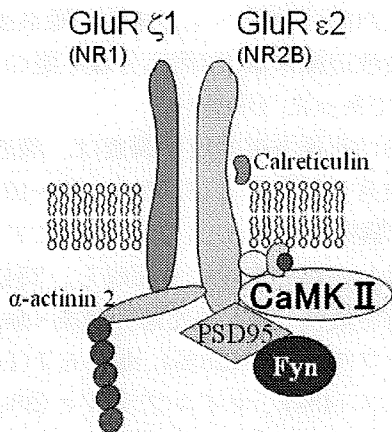


図3. GluR ϵ 2 (NR2B) に対する抗体測定のための抗原エピトープ

Detection of autoantibodies to NMDAR subunits complex

Dalmau J, et al., Ann Neurol, 2007; 61: 25-36.

NMDA type-GluR subunits complex



HEK 293 cells

Transfection of plasmids (NR1, NR2A, NR2B, NR1+2A, or NR1+2B)

Culture with ketamine

Immunocytochemistry

- Serum (1:400), CSF (1:10), overnight, 4°C
- Alexa Fluor secondary antibodies

HEK 293 cells transfected with NR1 and NR2B can reveal

- Antibodies to extracellular domain of NR1 (GluR ζ 1) and or NR2B (GluR ϵ 2)
- Bispecific antibodies to extracellular domain of NR1 (GluR ζ 1) and NR2B (GluR ϵ 2)

図4. 免疫染色によるNMDA型GluR複合体に対する抗体測定法 (Dalmau法)

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	$\alpha 1-\alpha 4$	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

C. 研究結果

1. 急性辺縁系脳炎多施設共同研究の経過

2005-2007年度の先行研究班において、数回の会議を経てプロトコール等を策定し、2006年7月31日に主任研究者施設（静岡てんかん・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、2006年8月から2007年9月で200症例を、2007年9月から2008年10月までに314例、2008年11月から2009年10月までに337症例を登録できた（表4）。

2. 急性脳炎・脳症の疫学調査

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先行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。2008年9月から2009年8月までに4例の急性辺縁系脳炎が登録

され、その内訳は単純ヘルペス性辺縁系脳炎1例、傍感染性辺縁系脳炎2例、分類不能の辺縁系脳炎1例であった（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）。

3. 「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

今年度は①MRI拡散強調画像による診断スキーム（参照3-資料7）、②非ヘルペス性急性辺縁系脳炎・脳症（NHAE）の発病初期の発作症状（seizure symptom）（参照3-資料6）、③抗

GluRε2抗体(参照3-資料8)、④非ヘルペス性急性辺縁系脳炎・脳症(NHALE)の予後(参照3-資料9)を、「急性辺縁系脳炎等の自己免疫介在性脳炎・脳症」の診断スキームに加え、2009年8月にホームページに掲載した(参照3)

(<http://www.shizuokamind.org/images/stories/pdf/06-1-2-15.pdf>) (湯浅、岡本、熊本、森、佐々木、高橋)。

4. 非ヘルペス性急性辺縁系脳炎・脳症

(NHALE)のMRI拡散強調画像(DWI)標準化判定法

施設や操作者(技師・医師)によりウィンドー幅やレベルが異なるため、誤った判断になる可能性があるため、標準化した以下の方法でDWI画像を表示・判定する(参照3-資料7)。

- 装置コンソールやDICOM画像表示端末上で、b0(ビーゼロ)画像(DWIと同時に取得されるEPI T2強調画像)における正常脳実質(視床など)のIntensityを測定し、SI b0とする。
- DWI画像ディスプレイのウィンドー幅をSI b0とし、ウィンドーレベルを0.5×SI b0とする。
- 小児ではADCが大きいので、ウィンドーレベルは0.6×SI b0程度とする。

低磁場機器のDWI画像は評価しないほうが良い。1.5T以上の機器で判断する。DWIは正常者でも高信号となる部位があり、側頭葉内側部、前頭葉内側部、島は高信号に出やすい。DWI高信号病変であっても、SPECTなどで血流増加した部位は、けいれん重積等を反映した病変である可能性がある。といった点に注意が必要であることが分かった。また、再発性脳炎症例には、DWI高信号病変を認めるが、ADCの低下はない症例があった(湯浅、岡本、熊本、佐々木、高橋)。

5. NMDA型GluRサブユニットのGluRζ1(NR1)に対する抗体測定法の確立

GluRζ1(NR1)分子のN末およびC末ドメインを抗原としてELISAで測定したところ、抗GluRζ1-NT抗体、抗GluRζ1-CT抗体は、卵巣奇形腫を合併する急性脳炎・脳症では対照に比べて有意に高値で、髄液では71.4%、80.0%

の検体が陽性であり、この方法は診断に有用と考えた(高橋)。

6. 卵巣奇形腫を合併する急性脳炎・脳症(AE-OT)の各種NMDA型GluR抗体のエピトープと陽性率

全長GluRε2(NR2B)分子を抗原とする抗GluRε2抗体(immunoblot法)の血清IgG型の陽性率は、急性期46.9%、回復期33.3%、慢性期43.8%であった。髄液IgG型の陽性率は、急性期39.6%、回復期38.9%、慢性期53.8%であった。GluRε2(NR2B)分子のN末およびC末ドメインを抗原とする抗体(抗GluRε2-NT2抗体、抗GluRε2-CT1抗体)は、AE-OTでは対照に比べて有意に高値で、髄液では81.3%、68.2%の検体が陽性であった。GluRζ1(NR1)分子のN末およびC末ドメインを抗原とする抗体(抗GluRζ1-NT抗体、抗GluRζ1-CT抗体)は、AE-OTでは対照に比べて有意に高値で、髄液では71.4%、80.0%の検体が陽性であった。抗NMDA型GluR複合体抗体(Dalmau法)は、急性期82.6%、回復期100.0%、慢性期20.0%で陽性であった。

髄液抗NMDA型GluR複合体抗体陽性の17例中16例が、抗GluRε2-NT2抗体抗体・抗GluRζ1-NT抗体ともに陽性であり、NR2B、NR1両者に対する抗体を含んでいた。

髄液中の抗GluRε2-NT2抗体/抗GluRζ1-NT抗体の比、抗GluRε2-CT1抗体/抗GluRζ1-CT抗体の比で判断すると、急性期は症例ごとに異なっていて一定の傾向が見られなかったが、慢性期になるとGluRε2に対する抗体が優位となっていた(高橋)。

7. 抗NMDA型GluR複合体抗体測定(免疫染色法)の改良

カルシウム透過性の低い変異受容体サブユニットGluRε2N/RとGluRζ1N/R-EGFPを一過的に共発現させたHEK293細胞を、1次抗体、2次抗体と4℃で反応させた後に固定しNMDA受容体を検出した。GluRε2N末に対するコントロールウサギ抗体を用いた蛍光免疫染色により、GFPを発現している細胞表面でのみGluRε2の発現を確認した。また、GluRζ1N/R-EGFPを単独で発現させた細胞でも、M3-M4間を認識す

るマウス抗体を用いた蛍光免疫染色で、GluR ζ 1の染色を確認した。よってGluR ζ 1は単独でも細胞表面上に発現すると考えられた。これらの結果より、GluR ϵ 2N/RとGluR ζ 1N/R-EGFPを共発現させた細胞(以下 ϵ 2+ ζ 1と表記)と、GluR ζ 1-EGFPを単独で発現させた細胞(以下 ζ 1と表記)によるNMDA型GluRに対する安定した自己抗体スクリーニング系が確立した(森)。

8. 抗NMDA型GluR複合体抗体の改良免疫染色法による実際の測定

本研究班に抗体検査のため送付された辺縁系脳炎の患者血清7検体、および卵巣奇形腫に伴う傍腫瘍性脳炎の患者血清5検体の供与を受け、診断名等ブラインドの状態、200倍希釈血清について、GluR ϵ 2N/RとGluR ζ 1N/R-EGFPを共発現させた細胞(以下 ϵ 2+ ζ 1と表記)と、GluR ζ 1-EGFPを単独で発現させた細胞(以下 ζ 1と表記)を用いて、蛍光免疫染色を行った。免疫染色判定後に臨床診断とELISAの結果の開示を受けた。卵巣奇形腫に伴う傍腫瘍性脳炎と診断された5検体は、全ての検体で ϵ 2+ ζ 1、 ζ 1ともに陽性であり、ELISAの結果とも概ね一致した。また、辺縁系脳炎と診断された7検体中5検体は ϵ 2+ ζ 1、 ζ 1ともに陽性、2検体はともに陰性と判定した(森)。

9. 抗NMDA型GluR抗体によるNMDA型GluRのinternalization(細胞内取りこみ)

GluR ϵ 2N/RとGluR ζ 1N/R-EGFPを一過的に共発現させたHEK293細胞(ϵ 2+ ζ 1細胞)において、NMDARは細胞の表面をとり囲むclusterとして観察された。患者血清との反応を37°Cの条件で行うと、NMDARがinternalizationしている像が観察された。これは辺縁系脳炎、および卵巣奇形腫に伴う傍腫瘍性脳炎のどちらの検体でも認められた(森)。

10. 髄液中抗LMNA抗体

髄液中抗LMNA抗体は、45歳女性NHLE患者を除き、その他のNHLE患者ならびに感染性髄膜脳炎患者、多発性硬化症患者、アルツハイマー型認知症患者の髄液中では確認できなかった(犬塚)。

11. 高感度ナノLC-MS/MSシステムを用いた新規抗神経抗体・抗原の同定

3名のNHLE患者の急性期髄液中に共通して存在し2名のヘルペス脳炎患者の急性期髄液には存在しない分子量約40kD, pI5.9に位置する抗体反応スポットを検出し、その認識抗原蛋白としてPyridoxal kinase (PDXK)を同定した(犬塚)。

12. 卵巣奇形腫の免疫組織学的検討

HE染色では卵巣奇形腫内には外胚葉・中胚葉・内胚葉の各胚葉由来の種々の組織を認めた。GFAP・SMI-31陽性の神経組織は脳炎症例・非脳炎症例のいずれにおいても卵巣奇形腫内に認められた。Tリンパ球の浸潤は脳炎症例・非脳炎症例ともに認められたが軽度であり、また、両者で明らかな差は認めなかった。Bリンパ球及びマクロファージ/単球の浸潤を認めたが、いずれも細胞浸潤は神経組織や血管周囲に特別に多いという傾向はなく、また、脳炎症例・非脳炎症例で明らかな差も認めなかった(岡本)。

13. 非ヘルペス性急性辺縁系脳炎(NHALE)における血液脳関門破綻の検討

GluR ϵ 2(NR2B)分子の各ドメインに対する抗体の髄液/血清の比(R-NT2, R-M3-4, R-CT1)は脳炎発病4-5日後に最大となり、その後低下する経過を示した。R-NT2は発病5日後くらいにピークがあったが、R-M3-4, R-CT1よりはピークが小さかった。R-NT2, R-M3-4, R-CT1は髄液蛋白と正の相関があり、髄液細胞数とは有意な関連が見られなかった。R-NT2が高いほどは記憶・運動スコアが低い関係が見られたが、Barthel score、てんかん発作、精神症状、認知機能とは関連が見られなかった。R-NT2, R-M3-4, R-CT1が高値であると、急性期入院日数が長くなる関連が見られた(高橋)。

14. 急性脳炎におけるMMP-9, TIMP-1についての検討

急性脳炎のMMP-9はNCとALS、さらにMSに比べて有意に高く、またNMOとギラン・バレー症候群に比べても高い傾向が見られた。TIMP-1では明らかな差は認められなかったが、MMP-9の上昇に

併せて高くなる傾向が認められた。
MMP-9/TIMP-1比はNC, ALSに比べ有意に高値であった。変性疾患であるALSのMMP-9, TIMP-1値はNCと全く差がなく、中枢性・末梢性に関わらず炎症性疾患であるMS, NMO, GBSではNCに比べMMP-9は高くなる傾向が認められた。

次に急性脳炎におけるMMP-9とBBB障害との関連について検討するため、BBB障害を反映するとされる髄液/血清 アルブミン比を算出して血清MMP-9値と比較したところ両者に有意な相関が認められた(中嶋)。

15. 炎症性ケモカインの血液脳関門への影響の検討

急性脳炎の血清MMP-9濃度と髄液中の3つのケモカイン(IL-8, IP-10, MCP-1)濃度には明らかな相関を認めなかった(中嶋)。

16. NHALEにおける血清neurofilamentの動態

正常対照群の血清pNF-H値は 0.24 ± 0.15 ng/ml(平均値±標準偏差)だった。NHALE群の急性期および回復期血清pNF-H値は正常対照群に比し、有意に高値だった($p < 0.001$, $p = 0.008$)。NHALE群の急性期および回復期血清pNF-H値が正常対照群の平均値+2SDを越えていた例数はそれぞれ8例および7例だった。また急性期・回復期ともに正常対照群の平均値+2SDを越えていた例数は4例だった。一方で急性期・回復期とも血清pNF-H値の上昇を認めない例数は16例だった(市山)。

17. NHALE患者髄液におけるHSV以外のヒトヘルペスウイルス検出状況

61検体中VZV, HHV-6, HHV-7, CMV, HHV-8 DNA陽性検体はなかった。1検体で1184コピー/mlのEBV DNAが検出された。EBVが検出された患者は、臨床的に伝染性単核症の症状を欠き、EBVの関与は考慮されていなかった(吉川)。

18. NHALEのMRI拡散強調画像(DWI)の特徴

特徴としては、①両側あるいは片側の内側側頭葉(海馬など)に淡いADCの低下を示すDWI高信号病変が出現する。②特徴的病変が出現しない症例が多く、我々の典型的臨床症状を示したNHALE14例の内2例(14.3%)に典

型的な側頭葉内側部のDWI高信号病変出現が確認された。③典型的DWI所見が出たのは、0~1病日と早期であった。所見出現時期については今後症例を増やして検討する必要がある。④一過性脳梁膨大部所見が典型的臨床症状のNHALE 14例中2例(14.3%)に見られた(参照3-資料7)。

NHALEを疑われた症例の中に、新皮質のDWI高信号病変が見られた症例が3例あったが、2例はNHALEではない症例で発作重積型の脳炎症例、認知症あるいはposterior reversible encephalopathy syndrome(PRES)と思われる症例であった。1例は臨床症状がNHALEではあるが、微小血栓症の合併によるDWI高信号病変と推定された。新皮質のDWI高信号病変はNHALEの特異的所見ではないと思われる。

再発性脳炎に見られた側頭葉内側部のDWI高信号病変はNHALEのものに似るが、NHALEとは異なりADCの低下がなく、ADCの低下の確認が重要である(湯浅、岡本、熊本、佐々木、高橋)。

19. 画像病理比較研究

症例1: 62歳、男性。慢性肝炎の既往あり。発熱の3日後より左同名半盲、左半側空間無視、構成失行が出現した。血液検査では特記所見なく、髄液検査では蛋白の上昇(91mg/dl)のみを認めた。頭部MRIでは右側頭葉~後頭葉、右海馬傍回、皮質に強い造影効果と腫大を認めた。脳生検で採取された大脳皮質では、神経細胞脱落や血管周囲の炎症細胞浸潤は認めず、軽度のグリオーシスを認めるのみであった。最終診断は、成因不明の限局性脳炎と診断した。プレドニゾン60mg/日にて治療が開始され、症状は次第に改善し、頭部MRIでも脳萎縮を伴うことなく病変は消失した。

症例2: 58歳、男性。肝硬変にて加療中である。感冒後に全身性けいれん発作が出現した。意識障害、左同名半盲が出現し、けいれん重積状態となった。急性期の頭部MRIでは右側頭葉、海馬、海馬傍回、島皮質、後頭・頭頂葉皮質に造影効果を伴わない多発性のDWI、T2WI、FLAIR高信号域を認めた。意識障害は改善なく、けいれんの頻発、脳波異常も持続し、頭部MRIでは病変の拡大を認めたため、ステロイドパルス

療法を施行したところ、症状の軽快を認め、頭部MRIでも病変の縮小を認めた。慢性期の頭部MRIでは、急性期に認められたT2WI、FLAIR、DWIでの高信号は消失したが、同部位の大脳皮質は、T1WIで高信号を伴う萎縮を示した。経過中に右視床枕にも同様の变化を認めた。最終的に非ヘルペス性の辺縁系脳炎と診断した。入院10日目に急性膵炎、肝不全にて死亡し、剖検が施行された(脳重は1390g)。病理組織学的には、右の海馬ではCA1のみにH.E染色で著明な神経細胞脱落を認め、GFAP染色では、多数の反応性アストロサイトの増生を認めた。CD68の免疫染色では、CA1に多数のミクログリアを認めた。

2例の比較から、脳炎の経過中にけいれん重積を伴い、回復期に大脳皮質に層状のT1WI高信号域を伴った脳萎縮を認める頭部MRI画像病変は、脳炎に加えてけいれんによる影響も考慮する必要がある(熊本)。

20. 抗NMDA型GluR複合体抗体陽性例の臨床的特徴に関する検討

NMDA受容体 NR1/NR2A または NR1/NR2B を co-transfect した HEK cell に対して反応した陽性例は 49 例 (43.8%) であり、陽性例はすべて抗 NR2A/NR2B 抗体と局在が一致した。一方、NR1 のみと、NR2A/NR2B のみを単独に発現させた HEK cell では、NR1 については細胞質が顆粒状に染色される例があったが、健常対照の中にも同様な反応を呈する例があった。NR2 単独 transfection での染色性は得られなかった。

このうち臨床情報が得られた36例(陽性13例、陰性23例)で陽性・陰性例の特徴を比較すると、陽性・陰性群はそれぞれ、女:男12:1/17:6、平均発症年齢 23歳/46歳と有意な差を認め、臨床的特徴も、陽性群では陰性群に比べ、痙攣・呼吸障害・不随意運動・自律神経症状の合併頻度が高かった(田中)。

21. 抗VGKC抗体陽性辺縁系脳炎に関する検討

経過中、腫瘍の存在が明らかになった傍腫瘍群は18例中9例であった。腫瘍の内訳は、胸腺腫7例(うち浸潤性胸腺腫5例)、悪性リンパ腫、肺癌(組織型不明)各1例であった。他の9例は自己免疫群とした。平均年齢は、自己免疫群56.8歳、傍腫瘍群54.0歳で差が認められなかつ

た。男女比はいずれの群も4:5であった。発症から入院までの期間の平均は、自己免疫群111.9日、傍腫瘍群61.2日と傍腫瘍群で短い傾向だった。髄液所見、てんかん発作の様式、SIADHによる低ナトリウム血症の合併頻度に大差は認められなかった。再発・再燃例が3例存在したが、いずれも浸潤性胸腺腫を合併していた。経過中の中核症状に差異は認められなかったが、傍腫瘍群では、半数例で四肢のじんじん感を病初期に訴えていることが明らかになった。

自己免疫群では、免疫治療に速やかに反応を呈したが、傍腫瘍群では、免疫療法のみでは症状の改善や抗体の減少は認められず、治療期間が長期におよぶ傾向にあった。胸腺腫切除や化学療法、放射線照射のみでは、辺縁系の症状の改善や抗VGKC抗体の著減はしない。ステロイド療法などの免疫治療が必要である。逆に、なんらかの理由で、胸腺腫に対する治療が行われないと免疫療法をintensiveに行っても十分な治療効果が得られないことが明らかになった(渡邊)。

22. 抗NAE抗体陽性脳症の臨床免疫学的検討

抗NAE抗体陽性脳症63例のうち、免疫療法の効果があった群(有効群)は53例(84%)、10例は無効であった(無効群)。以下有効群/無効群としてデータを示す。平均年齢は、60歳[20-85歳]/74歳[51-87歳]、有効群で二峰性のピークを認めた。男女比は13:40/2:8であった。両群ともに甲状腺機能は正常例が70%を占め、抗甲状腺抗体は抗TPO抗体、抗TG抗体ともに陽性例が半数以上を占めた。自己免疫性甲状腺疾患の既往は35%/30%に認めた。発症様式は、急性 57%/20%、亜急性 34%/10%、慢性 9%/70%と有効群では急性、亜急性に発症する例が有意に多かった($p<0.01$)。臨床徴候のうち意識障害は 72%/20%($p<0.01$)、精神症状は 62%/10%($p<0.01$)、認知症は 43%/50%、痙攣は 38%/10%、不随意運動は34%/10%、失調は23%/30%に見られた。臨床病型としては、急性脳症型 64%/20%、精神病型21%/30%、失調型 11%/30% CJD 様型 4%/10%であった。検査・画像所見では、頭部MRI: 正常 63%/33%。脳脊髄液: 蛋白/IgG 上昇 49%/20%。脳波: 基礎波の徐波化 80%/33% ($p<0.05$) であった。免疫療法反応性では、