

グルタミン酸受容体自己免疫の基礎的検討

分担研究者 森 寿

富山大学大学院医学薬学研究部分子神経科学講座教授

研究要旨

急性脳炎患者血清中に存在するNMDA型グルタミン酸受容体に反応する自己抗体のスクリーニング系を確立するために、培養細胞を用いてNMDA受容体複合体を発現させ、抗NMDA受容体抗体検出系を構築した。また患者血清中の自己抗体がNMDA受容体に結合し細胞内取り込みを引き起こす可能性があることを明らかにした。

分担協力者：森 寿、共同研究者：高野志保（富山大学大学院医学薬学研究部）

A. 研究目的

急性脳炎後の難治性てんかんにおいて、中枢神経系分子に対する自己免疫反応が関わる可能性が示唆されている。そこで我々はNMDA受容体に対する培養細胞を用いた自己抗体スクリーニング系を確立することを目的に研究を行った。

B. 研究方法

NMDA受容体は、GluR ϵ （GluN2、NR2）とGluR ζ 1（GluN1、NR1）の複合体として細胞表面上に発現するとされるが、培養液中のグルタミン酸とグリシンで活性化され、Ca²⁺透過により細胞死が誘導される。この細胞毒性の問題を解決するためにCa²⁺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。

（倫理面への配慮）

本研究には遺伝子組換え実験が含まれるの

で、本学の組換えDNA実験安全委員会に研究申請を行い、第二種使用等拡散防止措置の確認を受けて実施した。また、使用した患者血清は、本研究主任研究者の高橋幸利博士が、国立静岡てんかん・神経医療センター等における倫理委員会で承認を受けたものを使用した。

C. 研究結果

1. NMDA受容体に対する自己抗体スクリーニング系の確立

GluR ϵ 2N/RとGluR ζ 1N/R-EGFPを一過的に共発現させた細胞を、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。GluR ϵ 2N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GluR ϵ 2の発現を確認した。また、GluR ζ 1N/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、NMDA受容体に対する自己抗体スクリーニング系が確立した。患者血清は、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 ϵ 1と表記）の両方を用いて検討した。

2. 患者血清を用いた自己抗体のスクリーニング

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。

3. NMDARのinternalization（細胞内取りこみ）

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。血清反応を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。

D. 考察

1) 今回我々は、NMDAR発現培養細胞を確立し、GluR ϵ 2およびGluR ζ 1の細胞外領域をエピトープとする自己抗体のスクリーニングが可能になった。また、GluR ζ 1が単独で細胞表面に発現することが明らかになったため、GluR ζ 1のみに対する自己抗体を検出できた。

2) 辺縁系脳炎も、卵巣奇形腫に伴う傍腫瘍性脳炎も、患者血清の自己抗体はGluR ζ 1を認識することがわかった。卵巣奇形腫に伴う傍腫瘍性脳炎に関しては、Dalmouらとその病態とGluR ζ 1との関連性を示唆しているが、今回のデータはそれを明確に裏付けた。また、辺縁系脳炎は、これまでGluR ϵ 2N末が病態に深く関わると

考えられていたが、これらの患者からもGluR ζ 1に対する自己抗体が検出されたことから、NMDARに対する複数の抗体が病態に関与している可能性が示唆された。

3) 患者血清中の自己抗体は37°CでNMDARをinternalizationさせた。自己抗体によるinternalizationは、NMDARの機能低下を引き起こし、脳炎における意識障害や行動異常等の精神症状に関連しているかもしれない。

E. 結論

急性脳炎の病理、病態の自己免疫分子機構を明らかにするために、今回作成したNMDA受容体検出系が有効であると期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kishioka, A., Fukushima, F., Ito, T., Kataoka, H., Mori, H., Ikeda, T., Itoharu, S., Sakimura, K., Mishina, M.: A novel form of memory for auditory fear conditioning at a low-intensity unconditioned stimulus. PLoS ONE, e4157, 2009.
- 2) Fukushima, F., Nakao, K., Shinoo, T., Fukaya, M., Muramatsu, S-I, Sakimura, K., Kataoka, H., Mori, H., Watanabe, M., Manabe, T., Mishina, M.: Ablation of NMDA receptors enhances the excitability of hippocampal CA3 neurons. PLoS ONE, e3993, 2009.
- 3) 井上 蘭, 森 寿: グリシン部位のコ・アゴニストとしてのD-セリン. 生体の科学, 60: 352-353, 2009.

2. 学会発表

- 1) Mori H.: Generation and analyses of serine racemase knockout mice. The 1st International Conference of D-Amino Acid research, 2009, 7, 4, Awaji, Japan.
- 2) Mori H.: Regulation of NMDA-type glutamate receptor by endogenous D-serine, The 32nd Annual Meeting of The Japan Neuroscience Society, 2009, 9, 16, Nagoya, Japan.
- 3) 高野 志保, 高橋 幸利, 森 寿: NMDA受容体チャネル

サブユニットに対する新たな自己抗体スクリーニング系の開発. 第32回日本神経科学大会, 2009, 9, 16, 名古屋.

4) 森 寿: 遺伝子操作マウスを用いた情動制御の分子機

構解析、第4回 日本情動研究会. 2009, 10, 24, 富山.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

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

分担研究者 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

研究要旨

昨年度、我々は本研究班において非ヘルペス性辺縁系脳炎 (non herpetic limbic encephalitis: NHLE) と診断した45歳女性患者の急性期髄液中より二次元免疫ブロットと質量分析の手法を用いて合計6つの抗体反応スポットを検出した。この中の1つのスポットに該当する抗体認識抗原蛋白はLamin-A (LMNA)であった。その後、ヒトLMNAリコンビナント蛋白を用いたウエスタンブロットによりNHLE患者を含む多数の神経疾患患者の髄液中から同抗体の検出をこころみた。結果、その他患者の髄液からはLMNAを認識する抗神経抗体は検出されなかった。また今回新たに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 (herpetic limbic encephalitis: HLE) 患者の急性期髄液には存在しない分子量約40kD, pH5.9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。

A. 研究目的

NHLE患者の髄液中より新規に抗神経抗体を検出し、その認識抗原蛋白を同定することにより病態の解明と新たな診断マーカーの確立を目指す

B. 研究方法

- 1) 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 (×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。
- 2) 新規抗神経抗体の検出: ラット大脳ホモジネートをサンプルとして二次元免疫ブロットを施行し、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。二次元免疫ブ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 (×200) を用いた。

(倫理面への配慮)

二次元免疫ブロットのサンプルとして使用したラット大脳に関しては、岐阜大学大学院医学系研究科動物実験委員会の承認を得た上で施行した。

C. 研究結果

- 1) 髄液中抗LMNA抗体は、上記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。
- 2) 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, pH5.9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。

D. 考察

1) 髄液中抗LMNA抗体は、上記45歳女性NHLE患者において急性期の髄液中で陽性となり、その慢性期の髄液では検出されなかったことから、同患者の病態と何らかの関連性がある可能性が示唆された。しかし疾患特異性は見出せなかった。抗LMNA抗体の特異性の確立には今後もさらに多数のNHLEを含む神経疾患患者の髄液を用いた検討が必要と考えられた。

2) 今回3名のNHLE患者の急性期髄液中に共通して存在した抗PDXK抗体は、頭部MRI画像所見上辺縁系に異常をきたさない症例を含むNHLEの新たな補助的診断マーカーとなり得る可能性が示唆された。一方、PDXKはビタミンB6からGlutamic acid decarboxylase (GAD)の活性に関与するPyridoxal 5'-phosphate (PLP)への変換を触媒することによりGABAの生成に関与することが知られている(Choi et al. 1999)。またスナネズミの脳内での検討ではPDXKは、海馬では主にGABAergic neuronに存在し(Kang et al. 2002)、痙攣発症30分後のスナネズミの海馬では、発症前に比較しPDXKの発現が著明に低下することも報告されている(Kang et al. 2002)。以上の報告と今回抗PDXK抗体が陽性となった3例のNHLE患者がいずれも痙攣重積を呈したことから、抗PDXK抗体がNHLEの病態、とりわけ痙攣重積と関与している可能性も推測された。しかし、今後多数例の髄液検体に対し、リコンビナント蛋白を用いたウエスタンブロットによる特異性の検討が必要と考えられた

E. 結論

二次元免疫ブロットと質量分析の手法を用いNHLE患者の急性期髄液中より抗Pyridoxal kinase (PDXK)抗体と抗Lamin A (LMNA)抗体を検出した

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kimura A, Sakurai T, Yamada M, Hayashi Y, Tanaka Y, Hozumi I,

Tanaka R, Takemura M, Seishima M, Inuzuka T. High prevalence of autoantibodies against phosphoglycerate mutase 1 in patients with autoimmune central nervous system diseases. J Neuroimmunol 2010;219:105-108.

2. 学会発表

1. 第50回日本神経学会総会(2009年5月20日、仙台)抗Hsp60抗体と大脳白質病変に関する研究;木村暁夫、櫻井岳郎、山田 恵、林祐一、田中優司、保住 功、犬塚 貴
2. 第50回日本神経学会総会(2009年5月22日、仙台)プロテオミクス解析を用いた通常型多発性硬化症における疾患特異的抗神経抗体の検索;櫻井岳郎、木村暁夫、山田 恵、林 祐一、田中優司、保住 功、犬塚 貴
3. 第21回日本神経免疫学会学術集会(2009年3月13日、大阪)多発性硬化症患者における抗Phosphoglycerate mutase 1抗体の特異性に関する検討;木村暁夫、櫻井岳郎、山田 恵、林 祐一、田中優司、保住 功、犬塚 貴
4. 第21回日本神経免疫学会学術集会(2009年3月13日、大阪)プロテオミクス解析を用いた通常型多発性硬化症における疾患特異的抗神経抗体の検索;櫻井岳郎、木村暁夫、山田 恵、林 祐一、田中優司、保住 功、犬塚 貴

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

抗NAE抗体陽性脳症の臨床免疫学的検討

分担研究者 栗山 勝

福井大学 医学部 第二内科（神経内科）教授

研究要旨

これまでに我々は、橋本脳症患者血清中に、 α -enolaseのNH₂末端に対する自己抗体（抗NAE抗体）が特異的に存在し、血清診断の有用なマーカーとなることを報告してきた。全国多施設症例の抗NAE抗体陽性の脳症症例63例の臨床・免疫学的検討を行い、従来、橋本脳症として報告された症例との比較を行い、疾患スペクトラムを整理した。その結果、抗NAE抗体陽性脳症症例のうち、84%の患者で免疫療法が有効であった。免疫療法有効群では、急性・亜急性に発症し、意識障害、精神症状を有意に多く呈した。検査所見では脳波の徐波化を呈する症例が有意に多かった。また、従来報告された橋本脳症と抗NAE抗体陽性脳症とは、極めて共通のスペクトラムを有すると考えられた。

分担研究者：栗山 勝¹

共同研究者：松永晶子¹、米田 誠¹、井川正道¹、藤井明弘¹、（福井大学医学部第二内科（神経内科）¹

A. 研究目的

我々は、橋本甲状腺炎に伴う自己免疫性脳症（橋本脳症）において、プロテオーム解析を用いてNH₂末端側 α -enolase（NAE）に対する自己抗体が特異的に存在することを明らかにし、本症の血清診断を可能にした。

解析依頼があった多数症例に対して、抗NAE抗体陽性の脳症患者の臨床・免疫学的特徴を検討し、従来、橋本脳症として報告された症例との比較を行った。

B. 研究対象と方法

(1)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。

(2)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。

（倫理面への配慮）

本研究は福井大学の倫理委員会において承認を受け、患者本人への十分な説明を行い、文書での同意を得ている。個人の情報の保護に留意し、プライバシー保護は十分に配慮した。

C. 研究結果

臨床・検査画像所見の解析

・抗NAE抗体陽性脳症63例のうち、免疫療法の

効果があつた群（有効群）は53例（84%）、10例は無効であつた（無効群）。

・年齢・性（以下有効群/無効群）：平均年齢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13：40/2：8。

・甲状腺関連：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35%/30%。

・発症様式：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つた（ $p<0.01$ ）。

・臨床徴候：意識障害 72%/20%（ $p<0.01$ ）、精神症状 62%/10%（ $p<0.01$ ）、認知症 43%/50%、痙攣 38%/10%、不随意運動 34%/10%、失調 23%/30%。

・臨床病型：急性脳症型 64%/20%、精神病型21%/30%、失調型 11%/30% CJD様型 4%/10%。

・検査・画像：頭部MRI：正常 63%/33%。脳脊髄液：髄液中蛋白/IgG上昇 49%/20%。脳波：基礎波の徐波化 80%/33%（ $p<0.05$ ）。

・免疫療法反応性：著効 52%、中等度効果 19%、軽度 23%、自然治癒 6%。

D. 考察

過去の文献の集計例である報告と比較検討を行うと、抗甲状腺抗体を有し、意識障害や脳波異常が高率で、頭部MRIの異常頻度が低い点など共通の結果であつた。一部異なる部分もあるが、従来報告された橋本脳症と抗NAE抗体陽性脳症は、ほぼ一致している結果となり、極めて共通のスペクトラムを有すると考えられた。

E. 結論

抗NAE抗体陽性脳症で頻度の高いもの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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kinomoto K., Okamoto Y., Yuichi Y., Kuriyama M. Acute encephalomyelitis associated with acute viral hepatitis type B. Intern Med, 48: 241-243, 2009.
2. M. Ikawa, M. Yoneda, A. Matsunaga, H. Nakagawa, A. Kazama-Suzuki, N. Miyashita, H. Naiki, T. Kitamoto, M. Kuriyama. Unique clinicopathological features and PrP profiles in the first autopsied case of dura matter graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease with codon 219 lysine allele observed in Japanese population. J Neurol Sci 2009;285:265-267.
2. N. Takahashi, H. Kimura, R. Kitai, M. Sato, M. Yoneda, C. Yamamoto, D. Mikami, M. Kuriyama, T. Kubota, H. Itoh, H. Yoshida. Acute on chronic subdural hematoma as a rare complication in a microscopic polyangitis patient receiving antithrombotic treatment. J Clin Nephrol 2009; 72:211-215.
4. 千葉悠平, 勝瀬大海, 高橋幸利, 米田誠, 山田高裕, 岸田日帯, 杉山美紀子, 都甲崇, 平安良雄. ステロイドパルス療法により認知機能障害が改善した、抗グルタミン酸受容体 $\epsilon 2$ 抗体陽性の橋本脳症の1例. 精神科治療学24, 1405-1410, 2009.
5. 米田誠. Clinical Topic橋本脳症. BIO Clinica 24, 70-76, 2009.

2. 学会発表

- 1) 松永晶子, 米田誠, 井川正道, 横山広美, 藤井明弘, 栗山勝. 橋本脳症の多数例解析による臨床免疫学的検討(続報). 第50回日本神経学会総会. 仙台, 2009.5.
- 2) 村松倫子, 米田誠, 松永晶子, 井川正道, 横山広美, 藤井明弘, 濱野忠則, 栗山勝, 末田芳雅, 高松和弘, 櫻井岳郎, 犬塚貴. Creutzfeldt-Jakob病様の臨床像を呈する橋本脳症の検討. 第27回日本神経治療学会, 熊本, 2009.6.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

抗VGKC抗体陽性辺縁系脳炎に関する研究

主任研究者 渡邊 修

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科神経病学・老年病学 助教

研究要旨

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SIADHを合併し、免疫治療によく反応する一つのclinical entityである。しかしながら、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。非ヘルペス性辺縁系脳炎（NHLE）症例から抗VGKC抗体の高力価を呈する18症例をVGKC-LEとして抽出し、自己免疫性と傍腫瘍性の二群に分けて臨床像について解析した。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。発症から入院までの期間は、傍腫瘍群で短い傾向だった。経過中の中核症状に差はなかったが、傍腫瘍群の半数例で初発症状として四肢のじんじん感が認められた。傍腫瘍群において再燃・再燃症例および治療抵抗性を呈する症例が認められた。病初期、自己免疫性と考えられるVGKC-LE症例でも繰り返し腫瘍のサーベイを行う必要がある。

また、チャンネルを直接標的とする抗体以外にチャンネルの clusteringに関与する蛋白に対する自己抗体についても検討を要する。

共同研究者 高田良治¹、有村公良¹、（鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 神経病学・老年病学¹）

A. 研究目的

VGKC-LEは、①亜急性の経過をとる、②壮年期発症、③高頻度に低ナトリウム血症を合併、④髄液所見は、通常正常、⑤自己免疫性の側面と傍腫瘍性の側面を併せ持つなどの特徴を有し、免疫療法によく反応する、一般に予後良好の疾患であるとされている。しかしながら、VGKC-LEは、自己免疫性にも、傍腫瘍性にも分類されており、混乱が生じている。VGKC-LEを自己免疫性と傍腫瘍性群の二群に分けて、両群間の異同を明らかにした。

B. 研究方法

対象は、NHLEの臨床診断で、平成17-21年に当科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。（倫理面への配慮）

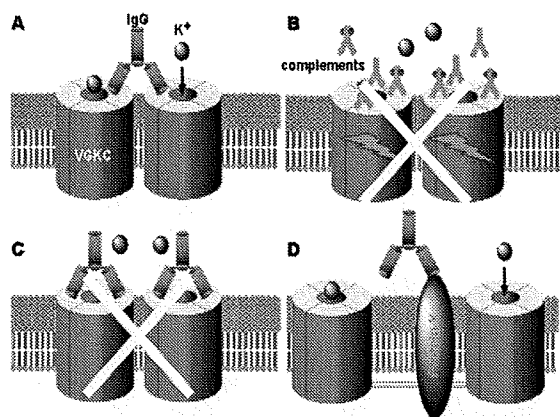
本研究は、鹿児島大学の倫理規定を遵守して行った。患者さんからは、各施設の主治医よりインフォームド・コンセントを得、同意を得られた場合にのみ研究をおこなった。

C. 研究結果

経過中、腫瘍の存在が明らかになったのは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。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った。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、図に示す症例の様に、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intensivel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、有村 Kチャンネル異常(Isaacs症候群). 内科89 156-159 2002

D. 考察

傍腫瘍群において、半数例で初発症状として四肢のじんじん感を呈しているのは興味深い。抗VGKC抗体以外の自己抗体の存在も含めて検討する必要がある。いずれにしても病初期に腫瘍を検出できない場合でも、再発・再燃症例や四肢のじんじん感を呈する症例、あるいは、ステロイドなどの免疫療法に抵抗する治療経過を呈する場合は、改めて、積極的に腫瘍のサーベイを行う必要があると考えられる。

VGKC-LEの剖検例では、海馬CA4で、マクロファージの増加、反応性アストロサイトの増加およびリンパ球浸潤が認められた。リンパ球のプロファイルはCD20陽性のB細胞が目立った (Neurology 2009)。

今後、病理像についても両群間の異同を検討する必要がある。

さらに、進行性認知機能障害、ミオクローヌス、錐体外路症状、幻視を認め、WHOのCJDの診断基準を満たす抗VGKC抗体陽性で、CJD類似症候を呈する一群も存在する (Neurology 2008)。症例の蓄積が必要である。

抗VGKC抗体の作用は、従来、二価のIgGが二つのVGKCをcouplingし、degradationを生じることで、膜上のVGKCの総数を減じることによってK⁺電流の抑制が起こる (図A) と考えられていたが、LGI-1やADAMといったチャンネルのclusteringに関わる蛋白 (図D) に対する自己抗体の有無が今後の課題である。

E. 結論

壮年期発症で、亜急性の臨床経過をたどり、SIADHを合併するNHLEの場合は、VGKC-LE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、定期的に腫瘍のサーベイを行う必要がある。

F. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 論文発表

1. 渡邊 修. 抗VGKC抗体陽性非ヘルペス性辺縁系脳炎. 神経治療学 26 : 23-29, 2009
2. 有村公良、渡邊 修. 抗VGKC抗体関連神経疾患. 神経免疫学 17 : 237-24, 2009

2. 学会発表

1. 第21回日本神経免疫学会学術集会, 2009 大阪 : 抗VGKC抗体陽性辺縁系脳炎の臨床的検討
2. 第50回日本神経学会総会, 2009 仙台 : 本邦における抗VGKC抗体関連辺縁系脳炎～今後の展望も含めて～

3. 第 39 回日本臨床神経生理学会シンポジウム 2009

北九州：免疫介在性 K⁺チャネル病の病態と生理

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし



Figure 1. Immunohistochemical analysis of K⁺ channels in the brain. The top panel shows a low-magnification view of a brain section stained for K⁺ channels. The bottom panel shows a high-magnification view of the same area, highlighting the cellular localization of the channels. Scale bars are provided for both panels.

抗NMDA受容体抗体陽性例の臨床的特徴に関する検討

分担研究者 田中 恵子

金沢医科大学脳脊髄神経治療学（神経内科）教授

研究要旨

卵巣奇形腫を伴う傍腫瘍性辺縁系脳炎（NHLE-OT）は比較的頻度が高い疾患であることが明らかになってきた。本症は若年女性に多く、卵巣などに潜在する奇形腫を伴う頻度が高く、腫瘍の摘除により神経症状の速やかな改善が得られる場合があることから、特徴的な自己抗体の早期診断が重要である。しかし、本邦症例についての臨床スペクトラムの広がりや、抗体陰性例との病像の差については充分明らかになっていないため、抗体陽性群・陰性群で比較を行った。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し、陽性群の臨床的特徴は、既報に一致して比較的均質であり、一方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。

共同研究者：松井 真（金沢医科大学脳脊髄神経治療学（神経内科）

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受容体抗体陽性と判断した。

（倫理面への配慮）

本研究班のプロジェクトとして、倫理審査で承認され、インフォームドコンセントのもと収集された検体について抗体検査を行った。

A. 研究目的

最近、抗NMDA受容体抗体を有する脳炎の多数例が報告され、その臨床的特徴が明らかになってきた。本邦でも J.Dalmau らのもとで検索された抗NMDA受容体抗体陽性脳炎例の報告が増加しており、比較的頻度の高い疾患と考えられるに至っている。しかしながら、本邦症例についての臨床スペクトラムの広がりや、本邦抗体陰性例との病像の差については充分明らかになっていない。

我々は、昨年来抗NMDA受容体抗体の検出系を作製し、安定した検出が可能になったことから、抗体陽性例と陰性例との臨床像の比較を行った。

C. 研究結果

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、NR2A/NR2B のみを単独に発現

B. 研究方法

本邦諸施設から抗NMDA受容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

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。

D. 考察

奇形腫を伴う辺縁系脳炎においては、著明な精神症状が発現した時点では腫瘍の存在に気づかれないことが多い。腫瘍の早期摘出により神経症状の改善も得られうることから、NMDAR 抗体の早期診断は重要である。抗体診断が可能になって以来、国内外で本症と診断される症例が増加している。しかし、臨床の現場で、病初期にどのような例について積極的に抗体診断を施行すべきかの判断の材料として、抗体陽性・陰性例の臨床的特徴の情報が求められている。本研究では、安定した抗体検出系が作成できたことにより、多数例での情報収集が可能になった。今後、さらに多数例の情報を収集することにより、臨床現場への情報の還元が可能になると考えられる。

E. 結論

抗NMDA受容体抗体陽性脳炎の臨床的特徴は、既報に一致し、比較的均質であることが確認された。

G. 研究発表

1. 論文発表

別項

2. 学会発表 別項

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

分担研究者 岡本幸市¹

群馬大学大学院脳神経内科学教授

研究要旨

抗グルタミン酸受容体抗体が介在する脳炎では卵巣奇形腫の合併が多いとされ、傍腫瘍性症候群の可能性があると指摘されている。今回、本脳炎の発症に抗グルタミン酸受容体抗体の産生について卵巣奇形腫がいかなる役割を有するのかを免疫組織学的に検討した。本脳炎と診断した3症例および脳炎を有しない11症例において、手術的に摘出された卵巣奇形腫を神経組織マーカー、リンパ球マーカー、単球・マクロファージマーカーで染色を行った。全例で卵巣奇形腫内に神経組織の発現を認めた。また、リンパ球や単球・マクロファージの浸潤を認めるものの、脳炎症例と非脳炎症例においては有意な差を認めなかった。また、浸潤する部位について神経組織や血管周囲に特に多いという所見は認められなかった。Bリンパ球、Tリンパ球についても共に脳炎・非脳炎の症例で差を認めなかった。

研究協力者：田代裕一¹、峰岸 敬²、岡本幸市¹（群馬大学大学院脳神経内科学¹、同産科婦人科学²）

A. 研究目的

抗グルタミン酸受容体抗体関連脳炎、特にNMDA型グルタミン酸受容体に対する抗体が陽性の脳炎症例では卵巣奇形腫の合併が多いとされ、傍腫瘍症候群としての可能性が考えられている¹⁾。脳炎を惹起するとされるグルタミン酸受容体に対する抗体の産生について卵巣奇形腫の関与が強く示唆されている。しかしながら、具体的な産生機序や脳炎発症機序については必ずしも明らかとなっているわけではない。そこで、この脳炎に合併した卵巣奇形腫と非脳炎症例における卵巣奇形腫について免疫組織学的に検索を行い、脳炎発症の最初の契機と目される卵巣奇形腫においていかなる変化が生じているのかを検討し、脳炎発症のメカニズム解明の一助としたい。

B. 研究方法

1. 対象

当院に入院した脳炎で、感冒症状と精神症状で発症し、血清もしくは髄液で抗グルタミン酸 ϵ 2受容体抗体あるいは抗NMDA受容体抗体が陽性であった症例のうち、合併した卵巣奇形腫を外科的に摘出した症例3例（以下、脳炎症例）。脳炎症例は10歳代の女性で、卵巣奇形腫の合併を除き、基礎疾患は有していなかった。髄液のヘルペスDNAは陰性、頭部MRIで明らかな異常所見を認めなかった。一方、コントロールとしては、脳炎は認めず過去に卵巣奇形腫により当院産科婦人科に入院し摘出手術を受けた症例から最近の11例（以下、非脳炎症例）を無作為に抽出した。

2. 方法

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。

(倫理面への配慮)

匿名化して, 当大学で手術的に摘出された卵巣奇形腫を病理学的に検討した。

C. 研究結果

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(表1)。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(表2)。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。

D. 考察

卵巣奇形腫へのリンパ球やマクロファージなど免疫担当細胞の浸潤を認めたが, 脳炎症例, 非脳炎症例の比較では明らかな差異は認めなかった。DalmauらのグループはBリンパ球の浸潤が脳炎症例で顕著である旨の報告²⁾を行っているが, 我々の経験例では脳炎症例と非脳炎症例とでは明らかな差は認められず, 今後の症例の蓄積と検討が必要と考えられた。

E. 結論

抗グルタミン酸受容体関連脳炎における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, 非脳炎症例の卵巣奇形腫と比較して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。

F. 研究発表

参考文献

1. Dalmau J et al: Ann Neurol 2007;61:25-36.
2. Tüzün E et al: Acta Neuropathol 2009;118:737-743.

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

表1

症例		脳炎症例			非脳炎症例									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
外胚葉	神経組織	+	+	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+
	膠細胞	+												
	扁平上皮	+	+	+	+	+		+		+	+	+	+	+
	歯牙		+					+						
	気管支様		+									+	+	
	皮膚・毛髪		+	+		+	+	+	+		+	+		+
内胚葉	腸管様	+	+	+				+	+				+	
	甲状腺様						+							
	腎・尿管様		+					+						
中胚葉	脂肪織	+		+	+			+	+	+	+	+	+	
	筋組織	+							+	+	+		+	+
	骨・軟骨	+	+					+		+	+		+	+

表2

症例	脳炎症例			非脳炎症例									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
T	±	±	+	+	+	±	+	+	++	±	+	+	+
B	++	+	+	+	±	+	++	+	+	±	±	+	+
単球	++	++	++	+	+	++	++	+	++	++	++	++	+

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

主任研究者 高橋 幸利^{1,2}

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

卵巣奇形腫に合併する急性脳炎（AE-OT）の抗NMDA受容体抗体のエピトープを明らかにする目的で、NMDA型GluRのGluR2（NR2B）及びGluR1（NR1）の各ドメインに対する抗体、抗NMDA受容体複合体抗体を、ELISA法、Dalmau法により測定した。対象は、AE-OT53例である。

全長GluR2（NR2B）分子を抗原とする抗GluR2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。GluR2（NR2B）分子のN末およびC末ドメインを抗原とする抗体（ELISA）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。GluR1（NR1）分子のN末およびC末ドメインを抗原とする抗体（ELISA）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受容体複合体抗体（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。髄液中の抗GluR2-NT2抗体/抗GluR1-NT抗体の比、抗GluR2-CT1抗体/抗GluR1-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GluR2に対する抗体が優位となっていった。

AE-OTでは、GluR2（NR2B）及びGluR1（NR1）に対する抗体が、卵巣奇形腫内の神経分子を抗原として末梢で産生され、髄液に移行し、脳炎病態に関与しているものと推定される。GluR2（NR2B）及びGluR1（NR1）のN末ペプチドを用いたELISAによる抗体測定は、抗NMDA受容体複合体抗体（Dalmau法）とほぼ同じ80%の感度で、測定が容易である。

研究協力者：高橋幸利^{1,2}、山崎悦子¹、西村成子¹、角替央野¹、丹羽憲司³、田中恵子⁴、高野志保⁵、森 寿⁵、井上有史¹（1国立病院機構静岡てんかん・神経医療センター、2岐阜大学医学部小児病態学、3岐阜大学腫瘍制御学講座女性生殖器学分野、4金沢医科大学脳脊髄神経治療学（神経内科学）、5富山大学大学院医学薬学研究部分子神経科学。）

A. 研究目的

2007年、卵巣奇形腫を伴う非ヘルペス性急性辺縁系脳炎（Nonherpetic acute limbic encephalitis with ovarian teratoma, NHALE-OT）症例12例の血清・髄液中に、HEK細胞に発現させた[NR1+NR2B（NR2A）]のNMDA受容体複合体と

は反応するが、NR1あるいはNR2B（NR2A）単独分子とは反応しない抗体が存在することが報告され、Antibodies to NR2B- and NR2A-containing heteromers of the NMDARと記載された。この抗NMDA受容体複合体抗体は、autoimmune NMDAR-related encephalitisの原因とされ、狭義で“抗NMDA受容体抗体”と呼ばれてきた。抗NMDA受容体複合体抗体検出抗原としては、[GluR1（NR1）+GluR2（NR2B）]と、[GluR1（NR1）+GluR2（NR2B）]を発現させたHEK細胞が通常使われ、免疫細胞化学的に抗体の有無は判定される（図1-①②）。

Dalmauらは、この方法により検出される抗体はGluR1またはGluR2の単独サブユニットとは反応せず、複合体の細胞外立体構造を認識している特殊なbispecific antibodyの

ような抗体と、当初は考えていたようであるが、GluRε1・GluRε2などの単独サブユニットはHEK細胞表面に発現できないことを考慮していなかったための誤解が含まれていた。つまり患者抗体が単独サブユニット発現HEK細胞と反応せず陰性であっても、そのサブユニットをエピトープとしないとは言えなかったのである。たとえばGluRε2を発現させたHEK細胞とは反応しないが、[GluRε1+GluRε2]を発現させたHEK細胞と反応する抗体であれば、GluRε1サブユニットあるいはGluRε2サブユニットの細胞外ドメインを、またはその両方のサブユニットの細胞外ドメインを、エピトープとしている可能性がある。

2008年7月、我々はDalmauにより抗NMDA受容体複合体抗体陽性と診断された5症例 (NHALE-OT、3例；OTなし、1例；OT不明、1例) の髄液について抗GluRε2抗体 (図1-③) を検討し、5例全例で検出でき、抗NMDA受容体複合体抗体の一部はGluRε2をエピトープとしていることを報告した。その後さらに我々は、19例のNHALE-OTの急性期髄液についてNMDARに関係する抗体を検討し、抗GluRε2抗体 (図1-③) は40.0%の症例で陽性、抗GluRε2-NT2抗体 (図1-⑥) は69.2%の症例で陽性、Dalmauらの測定による抗NMDA受容体複合体抗体 (図1-②) は90.9%の症例で陽性であることを報告した。よってNHALE-OT症例の少なくとも2/3はGluRε2のN末を認識する抗体を有しており、抗NMDA受容体複合体抗体の多くがGluRε2のN末をエピトープしていると推測される。

2008年Lancet Neurology12月号で、Dalmauらは抗NMDA受容体複合体抗体陽性例100例を検討し、抗NMDA受容体複合体抗体の多くがNR1 (GluRε1) の細胞外ドメイン (N末25-380) をエピトープとする抗体で、これらの抗体が中枢神経系で産生され、ニューロンのNMDA型GluRの細胞表面発現を可逆的に減じることを報告した。

卵巣奇形腫に合併する急性脳炎 (AE-OT) の抗NMDA受容体抗体エピトープを明らかにする目的で、NMDA型GluRのGluRε2 (NR2B) 及びGluRε1 (NR1) の各ドメインに対する抗体、抗NMDA受容体複合体抗体を測定した。

B. 研究方法

【対象】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。対照血清は健康成人の血清を、疾病対照髄液は炎症性神経疾患の否定された症例の髄液を用いた。

【方法】

1. 全長GluRε2分子を抗原とする抗GluRε2抗体 (immunoblot法) (図1-③)

NIH3T3細胞にreverse tetracycline-controlled transactivator (rtTA)を発現する遺伝子をエレクトロポレーションにより導入した後、G418を用いてstable transformant cellを選択し、最も効率よくrtTAを発現するクローン (A1) をβ-galactosidaseレポーター遺伝子を用いて決定した。次に、A1にNMDA型GluRε2 (NR2B) のcDNAとテトラサイクリンオペレーターなどから構築したベクター (pε2) をエレクトロポレーションにより導入し、ピューロマイシンを用いて選択した後に、遺伝子導入株をPCR法により決定した。次にテトラサイクリンに反応してGluRε2全長分子を発現する細胞株 (B18) を、家兎由来抗GluRε2抗体を用いたイムノブロットにて選択した。B18のホモジネート上澄をSDS-PAGEにて電気泳動した後、ウェスタンブロットし、そのニトロセルロースメンブレンを抗原として患者血清・髄液中の自己抗体の検出を行なった。即ち、患者血清 (20倍希釈) ・髄液 (15倍希釈) と48時間反応させたメンブレンを、アルカリフォスファターゼ標識抗ヒトIgG・IgM・IgA抗体 (ヤギ由来) で処理した後、発色させ、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。

2. GluRε2 (NR2B) 分子の各ドメインを抗原とする抗体 (ELISA) (図1-⑥⑧)

GluRε2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) 、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(図2)。すなわち、ペプチド抗原を一晩コートしたプレートを、患者血清(10倍希釈)・髄液(無希釈)と2時間反応させ、protein A-conjugated with HRPで発色させ、450nmのELISA plate readerでODを測定した。

N末ドメイン、M3-4間細胞外ドメイン、及びC末ドメインのペプチドを抗原とする抗体を、抗GluRε2-NT2抗体(ELISA)(図1-⑥)、抗GluRε2-M3-4抗体(ELISA)(図1-⑦)、抗GluRε2-CT1抗体(ELISA)(図1-⑧)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。

3. GluRζ1分子(NR1)の各ドメインを抗原とする抗体(ELISA)(図1-④⑤)

GluRζ1分子のN末ドメイン及びC末ドメインのペプチドを抗原とする抗GluRζ1-NT抗体(ELISA)(図1-④)、抗GluRζ1-CT抗体(ELISA)(図1-⑤)を、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、それらを抗原としてELISA法により吸光度(OD)を測定した。すなわち、抗原ペプチドを一晩コートしたプレートを、患者血清(10倍希釈)・髄液(無希釈)と2時間反応させ、protein A-conjugated with HRPで発色させ、450nmのELISA plate readerでODを測定した。

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。

4. 抗NMDA受容体複合体抗体(Dalmau法)(図1-②)。

抗原は、すでにクローニングされたGluRζ1(NR1)およびGluRε1(NR2A)、GluRε2(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 μM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、NMDAR各subunitの発現は、ウサギに免疫して得られた抗GluRζ1抗体および抗GluRε1抗体、抗GluRε2抗体を用いて確認した。

(倫理面への配慮)

倫理委員会にて承認された方法で同意を得た後、匿名化して症例情報・検査結果を検討した。

C. 研究結果

1. 全長GluRε2(NR2B)分子を抗原とする抗GluRε2抗体(immunoblot法)

卵巣奇形腫に合併する急性脳炎(AE-OT)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%、血清IgM型の陽性率は急性期21.9%、回復期20.0%、慢性期31.3%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%、髄液IgM型の陽性率は急性期17.3%、回復期22.2%、慢性期30.8%であった(図3)。

2. GluRε2(NR2B)分子の各ドメインを抗原とする抗体(ELISA)

AE-OTでは、血清・髄液中の抗GluRε2-NT2抗体、抗GluRε2-CT1抗体(ELISA)は対照に比べて有意に高値で、疾病対照の平均+2SDを基準とすると、髄液では81.3%、68.2%の検体が陽性であった(図4)。経過とともに、これらのサブユニット抗体は低下した(図5)。

3. GluRζ1(NR1)分子の各ドメインを抗原とする抗体(ELISA)

AE-OTでは、血清・髄液中の抗GluRζ1-NT抗体、抗GluRζ1-CT抗体(ELISA)は対照に比べて有意に高値で、疾病対照の平均+2SDを基準とすると、髄液では71.4%、80.0%の検体が陽性であった(図6)。経過とともに、これらのサブユニット抗体は低下した(図7)。

4. 抗NMDA受容体複合体抗体(Dalmau法)

髄液の抗NMDA受容体複合体抗体の陽性率は、急性期82.6%、回復期100.0%、慢性期20.0%であった。

5. 全長GluRε2(NR2B)分子を抗原とする抗GluRε2抗体(immunoblot法)、GluRε2及びGluRζ1(NR1)のドメインに対する抗体(ELISA)、抗NMDA受容体複合体抗体(Dalmau法)の感度の比較

AE-OT症例の急性期髄液での全長GluRε2分子を抗原とするIgG型-GluRε2抗体(immunoblot法)は40%の症例で陽性、抗GluRε2-NT2抗体

は81.3%の症例で陽性、抗GluR ζ 1-NT抗体は71.4%の症例で陽性、抗NMDA受容体複合体抗体 (Dalmau法)は82.6%の症例で陽性であった(図8)。

髄液中の抗GluR ϵ 2-NT2抗体と抗GluR ζ 1-NT抗体の陰性/陽性の不一致例はなかった。抗GluR ϵ 2-NT2抗体(抗GluR ζ 1-NT抗体)と抗NMDA受容体複合体抗体(Dalmau法)の不一致例は24例中3例あり、陰性/陽性が1例(0病日)、陽性/陰性が2例(6、1800病日)であった(図9)。

6. 抗GluR ϵ 2抗体と抗GluR ζ 1抗体の優位性

髄液中の抗GluR ϵ 2-NT2抗体/抗GluR ζ 1-NT抗体の比、抗GluR ϵ 2-CT1抗体/抗GluR ζ 1-CT1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GluR ϵ 2に対する抗体が優位となっていた(図10)。

D. 考察

卵巣奇形腫に合併する急性脳炎(AE-OT)の抗NMDA型GluR抗体は、NMDA型GluR複合体のどの部分を抗原認識する抗体なのかを解明するために、NMDA型GluRのGluR ϵ 2(NR2B)及びGluR ζ 1(NR1)サブユニットの各ドメインに対する抗体、Dalmau法による抗NMDA受容体複合体抗体を測定し、以下の結果を得た。①AE-OT症例の急性期血清・髄液での抗GluR ϵ 2-NT2・CT1抗体は対照に比べて有意に高値で、抗GluR ζ 1-NT・CT抗体も対照に比べて有意に高値である(図4・6)。②抗GluR ϵ 2-NT2・CT1抗体や抗GluR ζ 1-NT・CT抗体は脳炎の経過とともに血清・髄液中で低下していった(図5・7)。③血清は10倍希釈、髄液は無希釈でELISAを行っているが、ほぼおなじOD値となることから、血清中の方が抗体価が高いものと思われた。以上より、NMDA型GluRのGluR ϵ 2(NR2B)及びGluR ζ 1(NR1)サブユニットに対する抗体は脳炎に伴って末梢血中で産生され、髄液に移行したものと推定した。Dalmauらは抗NR1抗体のサンドイッチ法ELISAのデータで血清より髄液の方が高値であり、抗NMDA受容体複合体抗体が中枢神経系で産生されていると推察しているが、DalmauのサンドイッチELISAは、抗NR1抗体をプレートにコート

し、NR1発現HEK細胞のlysate supernatantを乗せ、その上に検体を反応させて抗NR1抗体を定量しているため、HEK細胞の表面発現分子やNR1と会合した分子への抗体も感知している可能性がある。Dalmauらのこの考察に対して、Vincentらは中枢神経系優位にこの抗体が産生されているとは言えないのではないかとコメントしている。

AE-OTでは、抗GluR ϵ 2抗体、抗GluR ζ 1抗体ともN末、C末ほぼ均等に抗体ができており、非ヘルペス性辺縁系脳炎と同じく、感染源に対する抗体がGluRに交叉反応している抗体というより、卵巣奇形腫内のNMDA型GluR分子が抗原となり、NMDA型GluR各サブユニットのN末からC末まで幅広いドメインに対する抗体が産生されているものと推定した。

抗NMDA型GluR抗体が病態におけるどんな役割を果たしているのかについて、DalmauらはNMDA型GluR複合体の細胞表面から細胞内への内在化を提唱している。我々の研究班の共同研究者の森らも、2009年度報告で同様の報告している。今後さらなる見当が待たれる。

Dalmauらの抗NMDA受容体複合体抗体は、GluR ζ 1(NR1)サブユニットのN末(25-380)をエピトープとしているとされているが、今回のAE-OT53例では、髄液での抗GluR ϵ 2-NT2抗体は81.3%の症例で、抗GluR ζ 1-NT抗体は71.4%の症例で陽性、抗NMDA受容体複合体抗体(Dalmau法)は82.6%の症例で陽性であった。髄液中の抗GluR ϵ 2-NT2抗体と抗GluR ζ 1-NT抗体の陰性/陽性の不一致例はなかった(図8)ことより、AE-OTの抗NMDA型GluR抗体は、NMDA型GluRのGluR ϵ 2(NR2B)及びGluR ζ 1(NR1)サブユニットに対する抗体を両方有しているものと推定された。抗NMDA受容体複合体抗体(Dalmau法)の陽性率が約82.6%とやや高いのは、GluR ϵ 2の細胞外ドメインのみならず、GluR ζ 1の細胞外ドメインに対する抗体も同時に検出できるためかもしれない(図8)。AE-OTではGluR ϵ 2、GluR ζ 1の細胞外ドメインのみならず、複数のNMDA型GluRサブユニットや他の神経分子をエピトープとする抗体が存在する可能性がある。

抗NMDA受容体抗体(AE-OT)の検出感度としては、急性期髄液での全長GluRε2分子を抗原とするIgG型-GluRε2抗体(immunoblot法)は40%とかなり感度が低いが、抗GluRε2-NT2抗体(ELISA)は81.3%、抗NMDA受容体複合体抗体(Dalamau法)は82.6%の症例で陽性で、ほぼ同等であった(図8)。抗NMDA受容体複合体抗体(Dalamau法)は特殊な細胞を構築する必要があり、またその細胞のviabilityの問題もあり、どんな施設でも一晩で測定可能なELISA法が便利である。

髄液中のGluRε2(NR2B)及びGluRζ1(NR1)に対する抗体の優位性は急性期では症例ごとに様々であったが、回復期以降はGluRε2(NR2B)に対する抗体が優位となっていく。どのような機序なのかは不明であるが、中枢神経系ではGluRζ1(NR1)の発現が広範囲で多いため、抗GluRζ1(NR1)抗体が吸着されてしまうためかもしれない。

E. 結論

卵巣奇形腫を合併する急性脳炎では、GluRε2(NR2B)及びGluRζ1(NR1)に対する抗体が、卵巣奇形腫内の神経分子を抗原として末梢で産生され、髄液に移行し、脳炎病態に関与しているものと推定される。GluRε2(NR2B)及びGluRζ1(NR1)のN末ドメインペプチドを用いたELISAによる抗体測定は、抗NMDA受容体複合体抗体(Dalamau法)とほぼ同じ80%の感度で、測定が容易である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Takahashi Yukitoshi, Jyun Mine, Yuko Kubota, Etsuko Yamazaki, Tateki Fujiwara, A substantial number of Rasmussen syndrome patients have increased IgG, CD4⁺ T cells, TNF α, and Granzyme B in CSF, *Epilepsia*, 2009; 50: 1419-1431.
2. Takahashi, Y. Yamazaki, E. Nishimura, S. Tsunogae, H., Limbic encephalitis associated with ovarian teratoma, *J Neurological Sciences*, 2009; 285(S1): S21. (WCN2009Abstract)
3. Inoue Yushi, Ohtsuka Yoko, Oguni Hirokazu, Tohyama Jun, Baba Hiroshi, Fukushima Katsuyuki, Ohtani Hideyuki, Takahashi Yukitoshi, Ikeda Shunya, Stiripentol open study in Japanese patients with Dravet syndrome, *Epilepsia* 2009; 50(11): 2362-2368.
4. Fukaya Kiyoshi, Nagata Hisao, Yoshimura Takumi, Tamura Toshiyo, Tanaka Osamu, Takahashi Yukitoshi, Uchida Mituya, DEVELOPMENT OF WEARABLE AIRBAGS FOR FALLS ON THE LEVEL FLOORS, *Proceedings of International Conference on Slips, Trips and Falls 2007: From Research to Practice*, Hopkinton, MA, IEA press, 93-97.
5. Ichiyama T, Takahashi Y, Matsushige T, Kajimoto M, Fukunaga S, Furukawa S. Serum matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 levels in non-herpetic acute limbic encephalitis. *J Neurol*. 2009; 256: 1846-1850.
6. Kashihara K, Kawada S, Takahashi Y. Autoantibodies to glutamate receptor GluRε2 in a patient with limbic encephalitis associated with relapsing polychondritis. *J Neurol Sci*. 2009; 287: 275-277. [Aug 27. Epub ahead of print]
7. Ikeda Hiroko, Takahashi Yukitoshi, Yamazaki Etsuko, Fujiwara Tateki, Kaniwa Nahoko, Saito Yoshiro, Aihara Michiko, Kashiwagi Mariko, Muramatsu Masaaki. HLA-class I markers in Japanese patients with carbamazepine-induced cutaneous adverse reactions, *Epilepsia*, 2010; 51(2): 297-300. doi: 10.1111/j.1528-1167.2009.02269.x
8. Takahashi Yukitoshi, Mori Hisashi, Mishina Masayoshi, Watanabe Masahiko, Kondo Naomi, Shimomura Jiro, Kubota Yuko, Matsuda Kazumi, Fukushima Katsuyuki, Shiroma Naohide, Akasaka Noriyuki, Nishida Hiroshi, Imamura Atsushi, Watanabe Hiroo, Sugiyama Nobuyoshi, Ikezawa Makoto, Fujiwara Tateki, Autoantibodies to NMDA-type GluRε2 in patients with Rasmussen's encephalitis and chronic progressive epilepsy partialis continua, *Epilepsia* in press.
9. Sakuma Hiroshi, Awaya Yutaka, Shiomi Masashi, Yamanouchi Hideo, Takahashi Yukitoshi, Saito Yoshiaki, Sugai Kenji and Sasaki Masayuki, Acute encephalitis with refractory, repetitive partial seizures (AERRPS): a peculiar form of childhood encephalitis/encephalopathy due to presumed autoimmunity, *Acta Neurol Scand*, in press.
10. Muto Ayako, Oguni Hirokazu, Takahashi Yukitoshi, Shirasaka Yukiyo, Sawaishi Yukio, Yano Tamami, Hoshida Toru, Osaka Hitoshi, Nakasu Satoru, Akasaka Noriyuki, Sugai Kenji, Miyamoto Akie, Takahashi Satoru, Suzuki Motomasa, Ohmori Iori, Nabatame Shin, Osawa Makiko, Nationwide survey (incidence, clinical course, prognosis) of Rasmussen's encephalitis, *Brain & Development*, in press.
11. Shiihara Takashi, Takahashi Yukitoshi, Corresponding letter: Mycoplasma pneumoniae associated opsoclonus-myoclonus syndrome in three cases, *European Journal of Pediatrics*, in press.
12. Shimojima Keiko, Sugiura Chitose, Takahashi Hiroka,