

200936111A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

ビッカースタッフ型脳幹脳炎の本邦に
おける実態把握と病態解明にむけた研究

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 神田 隆

平成 22(2010)年 5 月

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

ビッカースタッフ型脳幹脳炎の本邦に
おける実態把握と病態解明にむけた研究

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 神田 隆

平成 22(2010)年 5 月

目次

	頁
I 総括研究報告	
ビッカースタッフ型脳幹脳炎の本邦における実態解明と病態解明にむけた研究	1
山口大学大学院医学系研究科神経内科学 主任研究者 神田 隆	
II 分担研究報告	
1. ビッカースタッフ型脳幹脳炎の本邦における実態解明	5
山口大学大学院医学系研究科神経内科学 主任研究者 神田 隆	
山口大学大学院医学系研究科神経内科学 分担研究者 古賀道明	
2. ヒト血液脳関門・血液神経関門 in vitro モデルの確立:ビッカースタッフ型 脳幹脳炎患者血清の神経系バリアーに対する効果の検証	8
山口大学大学院医学系研究科神経内科学 主任研究者 神田 隆	
3. ビッカースタッフ型脳幹脳炎における抗 GQ1b 抗体および抗 GT1a 抗体の 反応性の検討:Miller Fisher 症候群および Guillain-Barré 症候群との比較	12
近畿大学医学部神経内科	
分担研究者 楠 進	
4. ビッカースタッフ型脳幹脳炎の免疫病態の評価に関する研究	14
独)国立精神・神経医療研究センター神経研究所	
分担研究者 山村 隆	
5. ビッカースタッフ型脳幹脳炎における感染症の関与の解明	17
山口大学大学院医学系研究科神経内科学 分担研究者 古賀道明	
III 研究成果の刊行に関する一覧表	19
IV 研究成果の刊行物・別刷	23

I. 平成 21 年度総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

「ビッカースタッフ型脳幹脳炎の本邦における実態把握と病態解明にむけた研究」

総括研究報告書

ビッカースタッフ型脳幹脳炎の本邦における実態解明と 病態解明にむけた研究

研究代表者 神田 隆 (山口大学大学院医学系研究科神経内科学教授)

研究要旨

ビッカースタッフ型脳幹脳炎(BBE)は生命中枢である脳幹を首座としておこる原因不明の自己免疫疾患である。BBEの国内における実態を把握し、液性免疫機序の解析、先行感染因子の解析、血液脳関門の動態という3つの側面からBBEの病態を明らかにすることを通じて治療の指針を作成することを最終目的とし、初年度に以下のような成果を得た。1. BBE全国調査(一次)の結果を集計した。回答は1,520機関(回答率43.1%)から得られ、119機関では過去三年間に「脳幹脳炎」症例を経験していた。症例数は累計186例(男性106例、女性80例)であった。2. ミラーフィッシャー症候群(MFS)や、眼球運動麻痺を伴うギラン・バレー症候群(GBS)ではGA1とGQ1bまたはGT1bの複合抗原に特異的な自己抗体が存在することを明らかにした。3. Neuromyelitis optica(NMO)患者IgGをEAE動物に静脈投与することでEAE症状の増悪が観察され、病理学的には脊髄白質下に有意な所見をみとめた。4. GBSとの関連が疫学的に証明されている4種の病原体による先行感染はBBE症例の10%でしかみられず、BBEに特有な先行感染病原体が他に存在することが示唆された。5. 一部のBBE症例の血清で、血液脳関門モデル透過性亢進効果が認められた。上記の成果をふまえ、BBE診断基準の策定と病態の解明、特異的治療法の開発を行う基盤が整備できた。

A. 研究目的

ビッカースタッフ型脳幹脳炎(以下BBE)は生命中枢である脳幹を首座としておこる炎症性疾患で、我が国では年間数百人単位の発症が見込まれる原因不明の自己免疫疾患である。希少疾患の特性として国内各施設に少数の患者が分散し、現時点では確立した診断基準、治療指針はない。このため、診断や治療に関する確固たる指針のないままに各医療施設の少ない経験に基づく加療ないし経過観察が行われているのが実情であり、早急な、かつ科学的根拠に基づいた治療環境の整備は急務である。本研究の目的は、BBEの国内における実態を把握し、液性免疫機序の解析、先行感染因子の解析、血液脳関門の動態という3つの側面からBBEの

病態を明らかにすることを通じて治療の指針を作成することにある。

B. 研究方法・結果

1. 疫学調査(神田、古賀)

BBE患者実態を把握するため、全国諸施設を対象に一次調査を郵送で行った。調査対象施設として、脳幹脳炎患者を診る機会があると考えられる「神経内科」、「脳神経外科」、「内科」、「小児科」の4科のいずれかを標榜する全医療機関のうち、「難病の患者数と臨床疫学像把握のための全国疫学調査マニュアル第二版」(厚生労働省難治性疾患克服研究事業:特定疾患の疫学に関する研究班)に基づき、層化無作為抽出法(層は8つ)により全国から3,526機関を抽出

した（抽出率約 20%）。

一次調査の回答は、1,520 機関（回答率 43.1%）から得られた。119 機関では過去三年間に「脳幹脳炎」症例を経験しており、症例数は累計 186 例（男性 106 例、女性 80 例）であった。

2. BBE の病因解明に向けた研究（神田、楠、山村、古賀）

a) 液性免疫の解析:

BBE 患者血清の病原性を明らかにすることを目的とし、以下の 2 つの実験系を確立した。①BBE 近縁疾患である MFS や、眼球運動麻痺を伴う GBS では GA1 と GQ1b または GT1b の複合抗原に特異的な自己抗体が存在することを明らかにした（楠）。また、②NMO 患者 IgG を EAE 動物に静脈投与することで EAE 症状の増悪が観察され、病理学的には脊髄皮質下に有意な所見をみとめた（山村）。平成 22 年度以降にここで確立した系を用い、BBE 患者血清の解析から本症の病因に迫る研究を展開する準備が完了している。

b) 先行感染病原体の解析

BBE 発症と関連する先行感染病原体を見出すことを目的として、GBS との関連が疫学的に証明されている 4 種の病原体（カンピロバクター、サイトメガロウイルス、EB ウイルス、マイコプラズマ）に関して BBE 29 例の急性期血清を用いて血清学的に検討した。その結果、これら 4 種の病原体による先行感染は BBE 症例の 10% でしかみられず、BBE に特有な先行感染病原体が他に存在することが示唆された。さらに、糞便からサルモネラ属菌が分離された BBE・GBS オーバーラップ症例を経験したことをヒントに、BBE とサルモネラ属菌との関連を血清学的に検討すべく、ELISA による抗サルモネラ属菌抗体の測定系を確立した（古賀）。

c) 血液脳関門の動態の解析

不死化細胞株からなるヒト血液脳関門(BBB)の in vitro モデルが完成し、一部の BBE 症例の血清で、血液脳関門モデル透過性亢進効果が認められた。このデータを基に、平成 22 年以降多数例の検討を行うと共に類縁疾患である FS との違いを、血液神経関門(BNB)モデルも交えて展開する準備ができた（神田）。

C. 考察

一次調査が終了し、罹患者の概数がほぼ把握できた。続く 2 年間に二次調査及び可能であれば各病院への聞き取り調査なども含め、BBE の本邦での実体を正確に把握し、正確かつ日常診療業務の中で使用可能な診断基準の策定を行う。医療機関によって BBE をはじめとする自己免疫性神経疾患に対する親和度が異なるため、診断に疑義のある症例に関しては臨床部門に属する班員（神田、楠、古賀）および次年度より参加する研究協力者（郡山、海田）で構成される検討会を組織し、そのなかで個々の診断の妥当性を協議する予定である。

BBE は、Miller Fisher 症候群（MFS）の近縁疾患と位置づけられ、いずれも液性因子が重要と考えられている。中枢神経系の自己免疫疾患である NMO 患者血清を用いた実験系が初年度に確立し、BBE での液性因子の関与を裏付けるデータ蓄積の基盤が整った（山村）。また、BBE と MFS は多くの共通点を有するが、同じ GQ1b を標的とする抗体が上昇しながらも前者は中枢神経症状、後者は末梢神経症状が主体となる理由は未だに明快な解答がない。本研究では、BBE と MFS の症状の違いが、それぞれの病的液性因子の①中枢神経、末梢神経エピソードへの親和性の違い、②BBB、BNB に対する親和性の違いに基づく 2 つの可能性を想定し、それぞれ解析を進めている（楠、神田）。次年度以降にまとまった成果が期待される。予防医学の観点からは先行感染因子の同定とその対策も極めて重要である。本年度の結果からは既知の 4 病原体以外の先行因子の存在が示唆された（古賀）。

D. 結論

1. BBE 全国調査（一次）の結果を集計した。回答は 1,520 機関（回答率 43.1%）から得られ、119 機関では過去三年間に「脳幹脳炎」症例を経験していた。症例数は累計 186 例（男性 106 例、女性 80 例）であった。
2. MFS や眼球運動麻痺を伴う GBS で、GA1 と GQ1b または GT1b の複合抗原に特異的な自己抗体が存在することを明らかにした。
3. NMO 患者 IgG を EAE 動物に静脈投与するこ

とで EAE 症状の増悪が観察され、病理学的には脊髄皮質下に有意な所見をみとめた。

4. GBS との関連が疫学的に証明されている 4 種の病原体による先行感染は BBE 症例の 10% でしかみられず、BBE に特有な先行感染病原体が他に存在することが示唆された。
5. 一部の BBE 症例の血清で、血液脳関門モデル透過性亢進効果が認められた。
6. 上記の成果をふまえ、BBE 診断基準の策定と病態の解明、特異的治療法の開発を行う基盤が整備できた。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Sano Y, Shimizu F, Abe M, Maeda T, Kashiwamura Y, Ohtsuki S, Terasaki T, Obinata M, Kajiwara K, Fujii M, Suzuki M, Kanda T: Establishment of a new conditionally immortalized human brain microvascular endothelial cell line retaining an in vivo blood-brain barrier function. *J Cell Physiol* 224: 2010 (in press)
2. Kubota T, Fukuya Y, Hashimoto R, Kanda T, Suzuki H, Okamura Y, Nanki T, Miyasaka N, Umezawa K: Possible involvement of chemokine-induced platelet activation in thrombophilic diathesis of antiphospholipid syndrome: An attractive target for the NF-k-B-specific inhibitor DHMEQ. *Ann NY Acad Sci* 1173: 137-145; 2009.
3. Koga M, Takahashi T, Kawai M, Negoro K, Kanda T: Neuromyelitis optica with HTLV-1 infection: Different from acute progressive HAM? *Intern Med* 48: 1157-1159; 2009.
4. Sonobe Y, Takeuchi H, Kataoka K, Li H, Jin S, Mimuro M, Hashizume Y, Sano Y, Kanda T, Mizuno T, Suzumura A: Interleukin-25 expressed by brain capillary endothelial cells maintains blood-brain barrier function in a protein kinase C epsilon-dependent manner. *J Biol Chem* 284:31834-31842; 2009.
- IFN- β 1b on the human in vitro blood-brain barrier model. 8th Cerebral Vascular Biology International Conference. Sendai, June 28-July 2, 2009.
2. Shimizu F, Sano Y, Maeda T, Abe M, Ohtsuki S, Terasaki T, Kanda T: Pericyte forming blood-brain and blood-nerve barriers express tight junctional molecules and transporters as barrier-forming cells. 8th Cerebral Vascular Biology International Conference. Sendai, June 28-July 2, 2009.
3. Kashiwamura Y, Sano Y, Shimizu F, Abe M, Maeda T, Terasaki T, Kanda T: Establishment and characterization of a stable immortalized human brain microvascular endothelial cell line. 8th Cerebral Vascular Biology International Conference. Sendai, June 28-July 2, 2009.
4. Sano Y, Kanda T: Effect of amyloid β on tight junction of the new conditionally immortalized human brain microvascular endothelial cell line. *Neuroscience* 2009. Chicago, USA, October 21, 2009.
5. Kanda T: Immortalized Human Cells Composing Blood-Nerve Barrier. The 8th Cerebral Vascular Biology. Sendai, June 30, 2009.
6. Kanda T: A New Model for Studying Blood-Brain Barrier and Blood-Nerve Barrier. The 2nd German-Japanese Neuroimmunology Symposium. Eibsee Germany, July 9, 2009.
7. Kanda T: A New Model for Studying Blood-Brain Barrier and Blood-Nerve Barrier. Special Lecture in Medical College of Georgia, Augusta GA, USA. October 16, 2009.
8. 神田 隆: 血液神経関門の破綻と修復のメカニズム. 第 21 回日本神経免疫学会学術集会シンポジウム 2. 大阪, 2009 年 3 月 13 日.
9. 神田 隆: 末梢神経疾患と血液神経関門. 第 50 回日本神経学会総会シンポジウム 12 末梢神経疾患研究の現在. 仙台, 2009 年 5 月 22 日.
10. 神田 隆: 血液脳関門の破綻と修復のメカニズム. 第 11 回脳教カンファレンス. 岩国, 2009 年 7 月 25 日.
11. 神田 隆: Molecular mechanisms of BBB breakdown. 第 8 回 MS ワークショップ. 福岡, 2009 年 8 月 1 日.
12. 神田 隆: 多発性硬化症と血液脳関門. 第 8 回東京 MS 研究会. 東京, 2009 年 9 月 25 日.

2. 学会発表

1. Sano Y, Shimizu F, Maeda T, Abe M, Kashiwamura Y, Kanda T: The effect of

13. 神田 隆：血液脳関門の破綻と修復のメカニズム。第 28 回ニセコカンファレンス。北海道，2009 年 9 月 26 日。
14. 神田 隆：神経系のバリアーと自己免疫性神経疾患。第 6 回新潟県神経免疫研究会。新潟，2009 年 10 月 29 日。
15. 神田 隆：ニューロパチーと血液神経関門。第 2 回大阪・紀和神経免疫研究会。大阪，2009 年 11 月 6 日。
16. 古賀道明，山城知恵美，高橋正樹，神田 隆：サルモネラ属菌によるギラン・バレー症候群発症への関与。第 21 回日本神経免疫学会学術集会。大阪，2009 年 3 月 12-13 日。
17. 佐野泰照，柏村陽子，前田敏彦，安部真彰，清水文崇，鈴木倫保，寺崎哲也，神田 隆：血液脳関門のバリア機能を増強させる薬物の同定およびそのメカニズムの検討。第 21 回日本神経免疫学会学術集会。大阪，2009 年 3 月 12-13 日。
18. 清水文崇，佐野泰照，安部真彰，前田敏彦，柏村陽子，神田 隆，寺崎哲也：Pericyte は BNB 維持の key player である：Pericyte を用いた末梢神経疾患の新しい治療戦略の可能性。第 21 回日本神経免疫学会学術集会。大阪，2009 年 3 月 12-13 日。
19. 前田敏彦，佐野泰照，安部真彰，清水文崇，柏村陽子，寺崎哲也，帯刀益夫，高橋利一，上田正次，神田 隆：血液脊髄関門を構成するラット内皮細胞株の確立と NMO 患者由来血清のバリア構成内皮に及ぼす影響の検討。第 21 回日本神経免疫学会学術集会。大阪，2009 年 3 月 12-13 日。
20. 古賀道明，山城知恵美，高橋正樹，神田 隆：サルモネラ属菌によるギラン・バレー症候群発症への関与。第 50 回日本神経学会総会。仙台，2009 年 5 月 20-22 日。
21. 佐野泰照，前田敏彦，柏村陽子，安部真彰，清水文崇，鈴木倫保，神田 隆：血液脳関門のバリア機能を増強させる薬物の作用機序の検討。第 50 回日本神経学会総会。仙台，2009 年 5 月 20-22 日。
22. 清水文崇，佐野泰照，安部真彰，前田敏彦，柏村陽子，神田 隆：Pericyte は BNB 維持の key player である。第 50 回日本神経学会総会。仙台，2009 年 5 月 20-22 日。
23. 柏村陽子，佐野泰照，清水文崇，安部真彰，前田敏彦，寺崎哲也，神田 隆：ヒト脳微小血管内皮細胞の安定細胞株の樹立。第 50 回日本神経学会総会。仙台，2009 年 5 月 20-22 日。
24. 安部真彰，佐野泰照，柏村陽子，清水文崇，前田敏彦，寺崎哲也，神田 隆：高血糖が血液神経関門に及ぼす影響。第 50 回日本神経学会総会。仙台，2009 年 5 月 20-22 日。
25. 前田敏彦，佐野泰照，安部真彰，清水文崇，柏村陽子，寺崎哲也，神田 隆：アミロイドトランスポーターの発現に及ぼすエストロゲンの影響。第 50 回日本神経学会総会。仙台，2009 年 5 月 20-22 日。
26. 柏村陽子，佐野泰照，清水文崇，安部真彰，前田敏彦，寺崎哲也，神田 隆：ヒト脳微小血管内皮細胞の安定細胞株の樹立。第 112 回山口大学医学会学術講演会。宇部，2009 年 7 月 18 日。
27. 清水文崇，佐野泰照，柏村陽子，寺崎哲也，神田 隆：AGE が血液神経関門に及ぼす影響の解析。第 20 回日本末梢神経学会学術集会。大宮，2009 年 9 月 4-5 日。
28. 柏村陽子，清水文崇，佐野泰照，寺崎哲也，神田 隆：副腎皮質ステロイド薬が血液脳関門に及ぼす影響の解析。第 20 回日本末梢神経学会学術集会。大宮，2009 年 9 月 4-5 日。

G 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

II. 分担研究報告

ピッカースタッフ型脳幹脳炎の本邦における実態解明

研究代表者 神田 隆 (山口大学大学院医学系研究科神経内科学教授)

研究分担者 古賀道明 (山口大学大学院医学系研究科神経内科学講師)

研究要旨

【目的】ピッカースタッフ型脳幹脳炎 (BBE) 患者の実態を把握する。【対象・方法】脳幹脳炎を診察すると考えられる、4つの診療科 (神経内科、脳神経外科、内科、小児科) のいずれかを標榜する全国諸施設の中から、層化無作為抽出法により 3,526 施設を抽出し (抽出率 20%)、脳幹脳炎患者に関してアンケート調査を行った。【結果】 1,520 施設から回答を得た (回答率 43.1%)。患者ありとの回答が寄せられた施設は 119 施設で、患者累計は 186 例 (男性 106 例、女性 80 例) であった。【結論】 今後は二次調査を行い、詳細な神経症状・所見、検査データを回収することで、BBE に特異的な診断基準を作成する予定である。

A. 研究目的

ピッカースタッフ型脳幹脳炎 (BBE) は、生命中枢である脳幹を炎症の主座とする自己免疫神経疾患である。希少疾患ゆえに、国内各施設に少数の患者が分散し、患者の実態は明らかにされていない。本研究の目的は、BBE の実態把握を行い、その臨床像を明らかにするとともに、臨床の現場で有用な診断基準を作成することである。本年度は、一次調査として全国の諸施設を対象にアンケート調査を行った。診断基準の作成にあたり、他の脳幹障害を呈する疾患との鑑別が問題となることが予想されるため、BBE だけでなく脳幹脳炎の患者に関して調査した。

B. 研究方法

- ・ 対象 : 脳幹脳炎を診察すると考えられる、4つの診療科 (神経内科、脳神経外科、内科、小児科) のいずれかを標榜する全国諸施設の中から、「難病の患者数と臨床疫学像把握のための全国疫学調査マニュアル第2版」(厚生労働省難治性疾患克服研究事業：特定疾患の疫

学に関する研究班 (主任研究者 永井正規) に倣い、病院形態 (大学病院、一般病院、特に患者が集中すると考えられる特別階層病院) やベッド数などに基つき各病院を階層化させることで、全体で 20% 程度の病院を抽出した (総抽出数 3,526 施設)。

- ・ 方法 : 対象施設に対し、平成 18 年 10 月 1 日から平成 21 年 9 月 30 日までに診療を行った脳幹脳炎 (BBE を含め) が疑われる患者数を問う問診票を送付した。脳幹脳炎の診断基準には、図 1 に示すものを独自に作成し用いた。
- ・ 倫理面への配慮 : 本研究は、山口大学医学部附属病院医薬品等治験・臨床研究等審査委員会の承認のもとに行った。

C. 研究結果

1,520 施設から回答を得た (回答率 43.1%)。患者ありとの回答が寄せられた施設は 119 施設で、患者累計は 186 例 (男性 106 例、女性 80 例) であった。

D. 考察

本年度に行った一次調査により、比較的稀と考えられている脳幹脳炎の患者の存在が確認された。脳幹病変を呈する疾患にはBBEだけでなく、多発性硬化症や急性散在性脳脊髄炎、神経ベーチェット病、ウイルス性脳幹脳炎など多岐にわたる。二次調査において、詳細な神経症状・所見、検査データを回収することで、BBEに特異的な診断基準を作成する予定である。

E. 結論

全国諸施設を対象にした全国調査で、脳幹脳炎 186 例の存在が確認された。

F. 健康危険情報

なし

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

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

図 1：脳幹脳炎の診断基準（全国調査一次調査）

以下の 1 と 2 の両者を満たす症例
(ビッカーstaff型脳幹脳炎か否かは問わない)。

1. 脳幹病変の存在が示唆される脳炎または脳症

脳幹病変の存在が示唆される症状・所見とは以下のいずれかを満たすものである

- a) 意識障害
- b) 複視・眼球運動障害
- c) 構音障害、嚥下障害
- d) 錐体路障害(腱反射亢進、病的反射陽性)
- e) 片側性感覚障害
- f) 交差性片麻痺
- g) CT/MRI での脳幹急性期病変

2. 大脳半球病変の存在を示唆する症状・所見は明らかではない

大脳半球病変の存在を示唆する症状・所見とは以下の通りである

- a) 大脳高次機能障害(失語や失行など)
- b) CT/MRI での大脳急性期病変

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
「ビッカースタッフ型脳幹脳炎の本邦における実態把握と病態解明にむけた研究」
分担研究報告書

ヒト血液脳関門・血液神経関門 in vitro モデルの確立：
ビッカースタッフ型脳幹脳炎患者血清の神経系バリアー
に対する効果の検証

研究代表者 神田 隆 (山口大学大学院医学系研究科神経内科学教授)

研究要旨

ビッカースタッフ型脳幹脳炎(BBE)は Miller Fisher 症候群(MFS)の近縁疾患と位置づけられている。両疾患は多くの共通点を有するが、同じ GQ1b を標的とする抗体が上昇しながらも前者は中枢神経症状、後者は末梢神経症状が主体となる理由は未だに明快な解答がない。研究代表者の研究室ではヒト血液脳関門(BBB)および血液神経関門(BNB)構成細胞の不死化を試み、ようやく in vitro のバリアー細胞モデルとして利用できる目処が見ついた。同細胞を用いて同じく中枢神経系の自己免疫性疾患である neuromyelitis optica (NMO)患者血清によるバリアー機能変化を測定したところ、NMO 患者血清は有意にバリアー機能を低下させた。また、少数の BBE 患者血清を用いたパイロット研究では、BBE 患者血清の BBB バリアー機能低下効果が確認できた。次年度以降の BBE 患者血清を用いた本実験の基盤が完成し、BBE と BFS の症状の違いは、それぞれの液性因子の BBB, BNB への効果の違いに起因するという仮説を検証する体制が整備できた。

A. 研究目的

本研究の目的は、抗 GQ1b 抗体が上昇する疾患の中で、BBE のみが中枢神経障害を伴う原因の一つとして、BBE 血清に含まれるバリアー破綻因子が BBB 構成内皮細胞に特異的に効果を持つ可能性を検証することにある。In vitro でのバリアー破綻評価のための BBB および BNB を構成する不死化細胞株モデルを確立し、実際に患者血清によるバリアー破綻が検証可能であるか否かを確認することを初年度の研究目的とした。

B. 研究方法

定法にてヒト脳微小血管由来内皮細胞(HBMEC)の一次培養を行い、温度感受性 SV40 ラージ T 抗原およびヒト telomerase 遺伝子をレトロウイルスを用いて導入した。内皮細胞群をクローニングし、33°C で良好に増殖し、内皮細胞としての形態・生化学的特性を維持

しているものをヒト不死化脳微小血管由来内皮細胞株として樹立した(Sano et al., J Cell Physiol 2010)。

上記と同様の手法を用い、ヒト剖検坐骨神経を材料としてヒト不死化末梢神経微小血管由来内皮細胞(HPnMEC)株も併せて樹立した。

ここで得られた細胞株が in vitro バリアーモデルとして患者血清のバリアー透過性を検証するモデルとなりうるか否かを検証する目的で、neuromyelitis optica (NMO)14 例、多発性硬化症 7 例、健常者 12 名の血清を用い、Boyden chamber 上に樹立した BBB モデルの電気抵抗に及ぼす変化を測定した。

C. 研究結果

(1) 得られた不死化内皮細胞株は 100%の純度であり、脳由来株、末梢神経由来株ともバリアー構成内皮細胞の特徴とされている spindle-fiber shaped morphology を呈してお

り、von Willebrand factor の発現、DiI-Ac-LDL の取り込みも観察された。37°C で高い TEER と低い 14C-イヌリン透過性がみられ、バリアー構成細胞相当の生理学的特性を有している細胞株と判断した。

- (2) occludin, claudin-5, claudin-12, ZO-1, ZO-2, JAM-1 などのタイトジャンクション関連分子が蛋白レベルで発言していることが確認でき、各種バリアー固有トランスポーターの発現も見られた。バリアー構成細胞としての生化学的的特性を有している細胞株と判断した。
- (3) Boyden chamber 上に BBB 由来内皮細胞株を confluent に播種した BBB モデルに対し、NMO 14 例、多発性硬化症 7 例、健常者 12 名の血清を上室に加え、1 時間後の TEER を測定した。NMO 血清のみ、コントロール（血清添加無し）と比較して有意に BBB monolayer の TEER を減少させる効果があった（図 1）。
- (4) 3 例の BBE 患者血清を用いた同様の検討で、TEER の低下傾向が見られた（有意差無し）。

D. 考察

BBE は MFS の近縁疾患と位置づけられている。両疾患は多くの共通点を有するが、同じ GQ1b を標的とする抗体が上昇しながらも前者は中枢神経症状、後者は末梢神経症状が主体となる理由は未だに明快な解答がない。研究代表者は、BBE と MFS の症状の違いが、それぞれの病的液性因子の BBB、BNB に対する親和性の違いに基づく可能性を想定し、実験的にこの仮説を証明しうる 2 つの系の樹立を試み、生理学的・生化学的に満足できる細胞株が樹立できた。

同細胞を用いて同じく中枢神経系の自己免疫性疾患である NMO 患者血清によるバリアー機能変化を測定したところ、NMO 患者血清は有意にバリアー機能を低下させた。また、少数の BBE 患者血清を用いたパイロット研究では、BBE 患者血清の BBB バリアー機能低下効果が確認できた。同一の不死化因子の導入で作製されたヒト BBB、BNB モデルを使用

する教室は世界に類が無く、次年度にはオリジナリティの高い結果の蓄積が期待できる。

E. 結論

1. ヒト BBB 由来、BNB 由来内皮細胞 in vitro モデルを樹立し、同モデルがヒト血清を用いたバリアー機能評価に耐えるものであることを実証した。
2. 本モデルは、BBE が何故中枢神経症状を主体として経過するかという根源的な問の解答を提供できる可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sano Y, Shimizu F, Abe M, Maeda T, Kashiwamura Y, Ohtsuki S, Terasaki T, Obinata M, Kajiwara K, Fujii M, Suzuki M, Kanda T: Establishment of a new conditionally immortalized human brain microvascular endothelial cell line retaining an in vivo blood-brain barrier function. *J Cell Physiol* 224: 2010 (in press)
2. Kubota T, Fukuya Y, Hashimoto R, Kanda T, Suzuki H, Okamura Y, Nanki T, Miyasaka N, Umezawa K: Possible involvement of chemokine-induced platelet activation in thrombophilic diathesis of antiphospholipid syndrome: An attractive target for the NF- κ -B-specific inhibitor DHMEQ. *Ann NY Acad Sci* 1173: 137-145; 2009.
3. Koga M, Takahashi T, Kawai M, Negoro K, Kanda T: Neuromyelitis optica with HTLV-1 infection: Different from acute progressive HAM? *Intern Med* 48: 1157-1159; 2009.
4. Sonobe Y, Takeuchi H, Kataoka K, Li H, Jin S, Mimuro M, Hashizume Y, Sano Y, Kanda T, Mizuno T, Suzumura A: Interleukin-25 expressed by brain capillary endothelial cells maintains blood-brain barrier function in a protein kinase C epsilon-dependent manner. *J Biol Chem* 284:31834-31842; 2009.

2. 学会発表

1. Sano Y, Shimizu F, Maeda T, Abe M, Kashiwamura Y, Kanda T: The effect of IFN- β 1b on the human in vitro blood-brain

- barrier model. 8th Cerebral Vascular Biology International Conference. Sendai, June 28-July 2, 2009.
2. Shimizu F, Sano Y, Maeda T, Abe M, Ohtsuki S, Terasaki T, Kanda T: Pericyte forming blood-brain and blood-nerve barriers express tight junctional molecules and transporters as barrier-forming cells. 8th Cerebral Vascular Biology International Conference. Sendai, June 28-July 2, 2009.
 3. Kashiwamura Y, Sano Y, Shimizu F, Abe M, Maeda T, Terasaki T, Kanda T: Establishment and characterization of a stable immortalized human brain microvascular endothelial cell line. 8th Cerebral Vascular Biology International Conference. Sendai, June 28-July 2, 2009.
 4. Sano Y, Kanda T: Effect of amyloid β on tight junction of the new conditionally immortalized human brain microvascular endothelial cell line. Neuroscience 2009. Chicago, USA, October 21, 2009.
 5. Kanda T: Immortalized Human Cells Composing Blood-Nerve Barrier. The 8th Cerebral Vascular Biology. Sendai, June 30, 2009.
 6. Kanda T: A New Model for Studying Blood-Brain Barrier and Blood-Nerve Barrier. The 2nd German-Japanese Neuroimmunology Symposium. Eibsee Germany, July 9, 2009.
 7. Kanda T: A New Model for Studying Blood-Brain Barrier and Blood-Nerve Barrier. Special Lecture in Medical College of Georgia, Augusta GA, USA. October 16, 2009.
 8. 神田 隆: 血液神経関門の破綻と修復のメカニズム. 第 21 回日本神経免疫学会学術集会シンポジウム 2. 大阪, 2009 年 3 月 13 日.
 9. 神田 隆: 末梢神経疾患と血液神経関門. 第 50 回日本神経学会総会シンポジウム 12 末梢神経疾患研究の現在. 仙台, 2009 年 5 月 22 日.
 10. 神田 隆: 血液脳関門の破綻と修復のメカニズム. 第 11 回脳教カンファレンス. 岩国, 2009 年 7 月 25 日.
 11. 神田 隆: Molecular mechanisms of BBB breakdown. 第 8 回 MS ワークショップ. 福岡, 2009 年 8 月 1 日.
 12. 神田 隆: 多発性硬化症と血液脳関門. 第 8 回東京 MS 研究会. 東京, 2009 年 9 月 25 日.
 13. 神田 隆: 血液脳関門の破綻と修復のメカニズム. 第 28 回ニセコカンファレンス. 北海道, 2009 年 9 月 26 日.
 14. 神田 隆: 神経系のバリアーと自己免疫性神経疾患. 第 6 回新潟県神経免疫研究会. 新潟, 2009 年 10 月 29 日.
 15. 神田 隆: ニューロパチーと血液神経関門. 第 2 回大阪・紀和神経免疫研究会. 大阪, 2009 年 11 月 6 日.
 16. 古賀道明, 山城知恵美, 高橋正樹, 神田 隆: サルモネラ属菌によるギラン・バレー症候群発症への関与. 第 21 回日本神経免疫学会学術集会. 大阪, 2009 年 3 月 12-13 日.
 17. 佐野泰照, 柏村陽子, 前田敏彦, 安部真彰, 清水文崇, 鈴木倫保, 寺崎哲也, 神田 隆: 血液脳関門のバリア機能を増強させる薬物の同定およびそのメカニズムの検討. 第 21 回日本神経免疫学会学術集会. 大阪, 2009 年 3 月 12-13 日.
 18. 清水文崇, 佐野泰照, 安部真彰, 前田敏彦, 柏村陽子, 神田 隆, 寺崎哲也: Pericyte は BNB 維持の key player である: Pericyte を用いた末梢神経疾患の新しい治療戦略の可能性. 第 21 回日本神経免疫学会学術集会. 大阪, 2009 年 3 月 12-13 日.
 19. 前田敏彦, 佐野泰照, 安部真彰, 清水文崇, 柏村陽子, 寺崎哲也, 帯刀益夫, 高橋利一, 上田正次, 神田 隆: 血液脊髄関門を構成するラット内皮細胞株の確立と NMO 患者由来血清のバリア構成内皮に及ぼす影響の検討. 第 21 回日本神経免疫学会学術集会. 大阪, 2009 年 3 月 12-13 日.
 20. 古賀道明, 山城知恵美, 高橋正樹, 神田 隆: サルモネラ属菌によるギラン・バレー症候群発症への関与. 第 50 回日本神経学会総会. 仙台, 2009 年 5 月 20-22 日.
 21. 佐野泰照, 前田敏彦, 柏村陽子, 安部真彰, 清水文崇, 鈴木倫保, 神田 隆: 血液脳関門のバリア機能を増強させる薬物の作用機序の検討. 第 50 回日本神経学会総会. 仙台, 2009 年 5 月 20-22 日.
 22. 清水文崇, 佐野泰照, 安部真彰, 前田敏彦, 柏村陽子, 神田 隆: Pericyte は BNB 維持の key player である. 第 50 回日本神経学会総会. 仙台, 2009 年 5 月 20-22 日.
 23. 柏村陽子, 佐野泰照, 清水文崇, 安部真彰,

- 前田敏彦, 寺崎哲也, 神田 隆: ヒト脳微小血管内皮細胞の安定細胞株の樹立. 第 50 回日本神経学会総会. 仙台, 2009 年 5 月 20-22 日.
24. 安部真彰, 佐野泰照, 柏村陽子, 清水文崇, 前田敏彦, 寺崎哲也, 神田 隆: 高血糖が血液神経関門に及ぼす影響. 第 50 回日本神経学会総会. 仙台, 2009 年 5 月 20-22 日.
25. 前田敏彦, 佐野泰照, 安部真彰, 清水文崇, 柏村陽子, 寺崎哲也, 神田 隆: アミロイドトランスポーターの発現に及ぼすエストロゲンの影響. 第 50 回日本神経学会総会. 仙台, 2009 年 5 月 20-22 日.
26. 柏村陽子, 佐野泰照, 清水文崇, 安部真彰, 前田敏彦, 寺崎哲也, 神田 隆: ヒト脳微小血管内皮細胞の安定細胞株の樹立. 第 112 回山口大学医学会学術講演会. 宇部, 2009 年 7 月 18 日.
27. 清水文崇, 佐野泰照, 柏村陽子, 寺崎哲也, 神田 隆: AGE が血液神経関門に及ぼす影響の解析. 第 20 回日本末梢神経学会学術集会. 大宮, 2009 年 9 月 4-5 日.
28. 柏村陽子, 清水文崇, 佐野泰照, 寺崎哲也, 神田 隆: 副腎皮質ステロイド薬が血液脳関門に及ぼす影響の解析. 第 20 回日本末梢神経学会学術集会. 大宮, 2009 年 9 月 4-5 日.

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

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
「ピッカースタッフ型脳幹脳炎の本邦における実態把握と病態解明にむけた研究」
分担研究報告書

ピッカースタッフ型脳幹脳炎における抗 GQ1b 抗体および抗 GT1a
抗体の反応性の検討：
Miller Fisher 症候群および Guillain-Barré 症候群との比較

研究分担者 楠 進 (近畿大学医学部神経内科教授)

研究要旨

抗 GQ1b IgG 抗体は、Miller Fisher 症候群(MFS)や眼球運動障害や失調を伴う Guillain-Barré 症候群(GBS)などの自己免疫性末梢神経障害で高頻度に検出されるが、中枢神経障害を呈するピッカースタッフ型脳幹脳炎(BBE)でも高率に陽性となることが知られており、同じ GQ1b を標的とする抗体が上昇しながらも異なる神経症候を呈する原因は未だ不明である。また抗 GQ1b 抗体陽性血清では、GQ1b と末端の構造が同じである GT1a にも抗体活性がみられることが多い。今回、抗 GQ1b IgG 抗体陽性の GBS50 例、MFS100 例、BBE32 例の 3 群間において、GQ1b、GT1a、フォスファチジン酸添加 GQ1b(GQ1b+PA)に対する抗体活性を検討した。その結果 BBE では GBS、MFS、と比較して、抗 GQ1b IgG 抗体活性が抗 GT1a よりも高い症例が多く、ガングリオシドの糖鎖骨格の内側のガラクトースに結合するシアル酸の数が抗体の反応性に重要と考えられた。この反応性の違いが BBE においてのみ中枢神経障害がみられる要因の一つである可能性が示唆された。

A. 研究目的

本研究では、抗 GQ1b 抗体が上昇する疾患の中で、BBE のみが中枢神経障害を伴う原因の一つとして、抗体の微細な反応性に違いがある可能性を考え、抗 GQ1b IgG 抗体陽性の GBS、MFS、BBE の 3 群間において、GQ1b、GT1a、PA 添加 GQ1b(GQ1b+PA)に対する抗体活性の強さを比較検討した。

B. 研究方法

2006 年 10 月(BBE のみ 2004 年 4 月)から 2009 年 7 月までに当科に抗体検査依頼のあった検体の中で、抗 GQ1b IgG 抗体陽性の BBE 32 例と、それぞれ無作為抽出した GBS 50 例、MFS 100 例について、GQ1b、GT1a、GQ1b+PA、に対する抗体活性を ELISA 法により測定した。得られた OD 値を抗体活性の指標として用い、3 群間で比較した。また抗 GQ1b IgG 抗体と抗

GT1a IgG 抗体、及び抗 GQ1b IgG 抗体と GQ1b +PA に対する IgG 抗体の相対的な結合活性も比較した。

統計学的解析は、抗 GQ1b IgG 抗体及び抗 GT1a IgG 抗体の群間比較には Kruskal Wallis 順位検定を用いた。GQ1b、GT1a、GQ1b+PA に対する抗体活性の比較には、m×n カイ二乗検定を用い、3 群間で有意差があった場合にそれぞれ Fisher exact probability にて有意差を確認した。

C. 研究結果

(1) 抗 GQ1b IgG 抗体価

OD 値の平均値は GBS 0.551、MFS 0.619、BBE 0.534 で 3 群間において有意な差はなかった。

(2) 抗 GT1a IgG 抗体価

OD 値の平均値は GBS 0.627、MFS 0.691、

BBE 0.408 で 3 群間において有意な差はなかった。

(3) 抗 GQ1b IgG 抗体と抗 GT1a IgG 抗体の活性比較

抗 GQ1b IgG 抗体活性値が抗 GT1a IgG 抗体活性値に比し高いものは GBS50 例中 20 例 40% , MFS100 例中 50 例 50% , BBE32 例中 23 例 71.9% で、BBE では GBS, MFS に比し有意に多かった。(p<0.01)

(4) 抗 GQ1b IgG 抗体と抗 GQ1b+PA IgG 抗体の活性比較

抗 GQ1b IgG 抗体活性値が抗 GQ1b+PA IgG 抗体活性値に比し高いものは GBS50 例中 23 例 46% , MFS 100 例中 37 例 37% , BBE32 例中 19 例 59.4% で、3 群間において有意な差はなかった。

D. 考察

BBE, GBS, MFS における抗 GQ1b IgG 抗体、及び抗 GT1a IgG 抗体の OD 値に 3 群間で有意差はなかったが、BBE では GBS, MFS, と比較して、抗 GQ1b IgG 抗体活性が抗 GT1a よりも高い症例が多かった。GQ1b と GT1a はともに gangliotetraosyl 基の末端にジシロアロシル基を有しているために、抗 GQ1b 抗体活性上昇例では GT1a にも抗体活性がみられることが多いと考えられているが、今回の研究において、BBE では GT1a と比較して GQ1b に対しより特異的に反応する IgG 抗体の上昇が認められた。糖鎖骨格の内側のガラクトースに結合するシアル酸の数が抗体の反応性に重要と考えられ、BBE においてのみ中枢神経障害がみられる要因の一つである可能性が考えられた。この結合活性の差がどのように病態機序に関連するかについては今後の検討が必要である。

E. 結論

1. 抗 GQ1b IgG 抗体活性が抗 GT1a IgG 抗体活性よりも高い症例の比率は BBE で MFS や GBS よりも高かった。
2. BBE では、GT1a よりも GQ1b により結合しやすい抗体が上昇しており、ガングリオシドの糖鎖骨格の内側のガラクトースに結合するシアル酸の数が抗体の反応性に

重要と考えられる。

F. 健康危険情報

なし

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

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

ビッカースタッフ型脳幹脳炎の免疫病態の評価に関する研究

研究分担者 山村 隆

(独立行政法人国立精神・神経医療研究センター神経研究所免疫研究部部長)

研究要旨

Bickerstaff 型脳幹脳炎 (BBE) は急性の意識障害、眼筋麻痺、顔面神経麻痺、小脳性運動失調、錐体路症状などが亜急性の経過で進行する原因不明の疾患で、その病態には免疫異常の関与が示唆されている。BBE 血中抗体の病原性を生体において解析する研究の予備実験として、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を誘導したマウスに、視神経脊髄炎 (NMO) 末梢血 IgG を投与する実験系を試みた。EAE は MOG ペプチドを免疫して誘導し、9 日目に健常 IgG、多発性硬化症 (MS) IgG、あるいは NMO IgG を腹腔内投与した。その結果、NMO IgG 投与群において他の 2 群と比較して臨床症状の有意な重症化と、アクアポリン 4 および glial fibrillary acidic protein の消失などアストロサイト障害を示唆する病理学的変化を認めた。以上より、EAE を基礎としたこの実験モデルは、BBE 血清の病原性を生体モデルで検討する際に有用であり、その際には NMO IgG が陽性コントロールとして有用であると考えられる。

A. 研究目的

Bickerstaff 型脳幹脳炎 (BBE) の病態には免疫異常の関与が示唆されているが詳細は不明である。最近、自己抗体の介在する疾患において、患者血清をマウスやラットの実験的炎症モデルに投与して、その効果をみる研究が世界各地で展開されており、視神経脊髄炎 (NMO) では、抗アクアポリン 4 抗体の病原性が示されている。BBE の患者血清の病原性を評価するため、その予備実験として、本年度は NMO 患者血清を実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を誘導した B6 マウスに投与して、血清の影響を評価した。

NMO は比較的選択的に視神経と脊髄が障害される慢性炎症性中枢神経疾患で、患者末梢血には抗アクアポリン 4 抗体 (抗 AQP4 抗体) と呼ばれる、自己抗体が存在する。AQP4 は水チャンネル分子であり、アストロサイトの足突起に高密度に存在する。NMO 患者脊髄の病理学的解析によって、NMO 病巣において

は、AQP4 とアストロサイトマーカー glial fibrillary acidic protein (GFAP) の消失が認められると報告されている。

B. 研究方法

(1) 末梢血 IgG の調整

NMO、古典的多発性硬化症 (MS) 及び健常者の末梢血より血漿を分離し、プロテイン G カラムを用いて、IgG 分画を抽出した。

(2) EAE の誘導とヒト IgG の投与

100ug の MOG35-55 ペプチドと完全フロイントアジュバントを混和したエマルジョンを調整し、6-8 週令の C57/BL6 (B6) マウスに皮下接種した。免疫と同日および 2 日目に百日咳毒素 200ng を腹腔内投与した。EAE 誘導 9 日目に 3 群に分けたマウスに対して、健常、MS、或は NMO 由来 IgG を、一匹当たり 5mg 静脈内投与した。投与後毎日臨床経過を評価し、免疫後 23 日目のピーク期に、マウスを屠殺し、脊髄を取り出して、免疫組織化学および定量

的 RT-PCR を用いた解析を行った。

(3) 免疫組織化学

屠殺後のマウスより脊柱を分離し、ホルマリン固定した。薄切切片を作成し、一部は HE 染色および脱髄染色、残りは免疫組織化学に用いた。免疫組織化学では、ブロッキング後、抗 AQP4 および GFAP 一次抗体と反応させ、2 回洗浄後、FITC 或は PE 標識二次抗体と反応させた。解析は共焦点レーザー顕微鏡によって行った。

(4) 定量的 RT-PCR

屠殺後のマウスより脊髄を分離し、密度勾配遠心法によりリンパ球を分離し、全 RNA を抽出した。逆転写酵素により cDNA を調整し、リアルタイム PCR によって IL-4、IFN- γ 、IL-17、IL-21、IL-22、IL-23 発現の定量的解析を行った。

(5) 倫理面への配慮：試料採取に際しては、書面による研究協力への同意を取得した。個人情報に連結可能匿名化の後、分担研究者が厳重に保管している。本研究は国立精神神経センター倫理委員会および国立精神神経センター神経研究所小型実験動物倫理問題検討委員会で承認されている。

C. 研究結果

(1) EAE の臨床所見

免疫 12-23 日目の EAE の cumulative score は、NMO IgG 投与群が、MS IgG 投与群 ($p<0.01$) および健常 IgG 投与群 ($p<0.05$) に比べて有意に重症であった。

(2) 免疫組織化学

HE 染色での細胞浸潤の程度は、3 群間で顕著な差は認められなかった。脱髄染色では、脱髄を認めたが、その程度に 3 群間で差を認めなかった。蛍光抗体法による観察では、NMO IgG 投与群においてのみ、細胞浸潤の認められる病巣に一致して AQP4 および GFAP 染色の消失が認められた。

(3) 脊髄浸潤リンパ球のサイトカイン mRNA 解析

IL-4、IL-17、IL-21、IL-23 の mRNA 発現は、3 群間で差を認めなかった。IFN- γ mRNA の発現は、MS および健常 IgG 投与

群と比較して、NMO IgG 投与群で高い蛍光が認められた。IL-22 mRNA は、NMO IgG 投与群において、他の 2 群と比較して有意な発現増加が認められた ($p<0.01$)。

D. 考察

今回の NMO IgG を用いた実験は、BBE 血清の病原性を検討する研究のための予備実験である。その意味では、中枢神経系への病原性を有すると考えられている NMO IgG が健常 IgG 群と比較して、脳脊髄炎を有意に重症化させたことは、本実験系を用いることにより、Bickerstaff 型脳幹脳炎血清の病原性に関する研究が実現可能であると考えられる。NMO IgG は、BBE 実験の際の、陽性コントロールとして用いることも検討する。免疫組織化学では、NMO IgG 投与群においてのみ脱髄に加えてアストロサイトの障害を示唆する所見 (AQP4 と GFAP の消失) を認めたことから、このような病理学的変化が NMO IgG 投与群における臨床所見の重症化の原因となった可能性がある。定量的 RT-PCR の結果は、有意な変化は IL-22 の変化だけであり、検体採取の時期と方法について検討の余地があると考えられる。

E. 結論

BBE 血清の病原性に関する研究の予備実験として、NMO IgG を用いた動物実験モデルを構築した。EAE を基礎としたこの実験モデルは、BBE 血清の生体における病原性に関する研究においても有用であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Michael-Mark Theil, Sachiko Miyake, Miho Mizuno, Chiharu Tomi, J. Ludovic Croxford, Hiroshi Hosoda, Julia Theil, Stephan von Horsten, Hiroaki Yokote, Asako Chiba, Youwei Lin, Shinji Oki, Takashi Akamizu, Kenji Kangawa, and Takashi Yamamura: Suppression of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Ghrelin. *J Immunol* 183: 2859-2866; 2009.