

201027066 A ($\frac{1}{2}$)

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業

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22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23 (2011) 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) 「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 20101017	-----29

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 中島 健二	-----63
2. 非ヘルペス性急性辺縁系脳炎でみられた精神症状 西田 拓司	-----66
3. 無菌性髄膜脳炎・脳症患者における e-ZIS および SPM8 解析を用いた 脳血流 SPECT 所見の検討 熊本 俊秀	-----69
4. 急性脳炎・脳症における画像変化と髄液タウ蛋白の検討 熊本 俊秀	-----77
5. 当科で経験した抗グルタミン酸受容体抗体陽性脳炎症例の 経過と転帰について 岡本 幸市	-----83
6. 非ヘルペス性辺縁系脳炎・周辺疾患の後遺症の研究 庄司 紘史	-----86
7. 抗NMDA型グルタミン酸受容体抗体の作用機序の検討 高橋 幸利	-----92
8. グルタミン酸受容体自己免疫の基礎的研究 森 寿	-----103
9. NMDA受容体脳炎患者髄液がNMDA受容体機能に及ぼす作用の検討 田中 恵子	-----105
10. 非ヘルペス性急性辺縁系脳炎/脳症における血液脳関門機能と 神経細胞損傷の関連について 市山 高志	-----108
11. 卵巣奇形腫関連傍腫瘍性脳炎における卵巣奇形腫の免疫組織学的検討 田畑 絵美	-----111

12. プリオン病における抗グルタミン酸受容体抗体の意義 湯浅 龍彦	-----113
13. 辺縁系脳炎患者における抗 Leucine-rich, glioma-inactivated 1 (LGI1)抗体の検討 犬塚 貴	-----115
14. 「抗 VGKC 抗体陽性辺縁系脳炎」における新規抗原の検討 渡邊 修	-----117
15. 小脳失調型橋本脳症の臨床免疫学的特徴に関する研究 米田 誠	-----119
16. 「新型インフルエンザ」脳症の急性期遺伝子発現 森島 恒雄	-----121
17. 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	-----123
18. 急性脳炎・髄膜炎患者からの水痘・帯状疱疹ウイルス検出の試み -皮疹がなく水痘・帯状疱疹ウイルスが検出された急性脳炎の 1 例- 中嶋 秀人	-----126
19. 抗グルタミン酸受容体抗体介在性急性辺縁系脳炎から難治性てんかんへ 移行した 36 歳女性例：自己免疫性てんかんに関する考察 湯浅 龍彦	-----129
20. 子宮癌肉腫による抗 NMDAR 脳炎 亀井 聡	-----133
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----139

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）自己免疫の役割を主体に研究を行った。

【疫学】鳥取県における前向き調査で、非傍腫瘍性非ヘルペス性急性辺縁系脳炎（NHALE）症例を主体とする傍感染性脳炎・脳症の罹患率は2.2/100万人年であった。

【診断スキームの更新】2010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、①疫学、②血液脳関門、③サイトカイン、④病理、⑤橋本脳症を掲載し、16項目34頁となった（<http://www.shizuokamind.org/images/stories/pdf/06-1-2-15.pdf>）。

【NMDA型GluR抗体測定法の感度】非傍腫瘍性NHALEにおける髄液中抗GluR ϵ 2抗体（イムノブロット法IgG）の陽性率は33.7%、髄液中抗GluR ϵ 2抗体（イムノブロット法IgM）の陽性率は27.5%、抗GluR ϵ 2-NT2抗体の陽性率は77.5%、抗GluR ϵ 2-CT抗体の陽性率は83.3%、抗GluR ζ 1-NT抗体の陽性率は56.9%、抗GluR ζ 1-CT抗体の陽性率は71.4%、抗GluR δ 2-NT抗体の陽性率は70.8%、抗GluR δ 2-CT抗体の陽性率は71.4%で、Dalmau法のcell-based assayの陽性率は75.0%であった。

【抗NMDA型GluR抗体の臨床的意義】非傍腫瘍性NHALEにおいて、抗GluR ϵ 2（NR2B）抗体、抗GluR ζ 1（NR1）抗体、抗GluR δ 2抗体を測定したところ、病勢と比例して変動していると思われるのはNMDA型GluRである抗GluR ϵ 2抗体及び抗GluR ζ 1抗体のみであった。中枢神経系で主に吸着するのは抗GluR ϵ 2抗体で、その吸着は抗体濃度に比例して回復期まで持続することが推定され、抗GluR ζ 1抗体は初期に吸着が起こるが、20日以降は吸着が少なくなることが推測された。

【抗NMDA型GluR抗体の基礎的意義】GluR ϵ 2N/R+GluR ζ 1N/R-EGFP共発現細胞（ ϵ 2+ ζ 1）において、血清との反応を37°Cの条件で行うと、NMDA型GluRが細胞内に取り込まれたが、GluR ζ 1の単独発現細胞（ ζ 1）においても、自己抗体による細胞内取り込みが観察された。抗GluR ϵ 2抗体陽性NHALE患者髄液による培養ラット胎児神経細胞の10DIVでのアポトーシスへの影響の検討では、髄液全体ではアポトーシスの増加が、髄液IgG分画ではアポトーシスの抑制がみられた。このことからNHALE患者髄液IgGはNMDA型GluRを内在化し、興奮毒性を抑制し、アポトーシスを防ぎ、脳を守る作用があるが、髄液中のIgG以外の成分はアポトーシスを促進し、興奮毒性などをもたらしている可能性が明らかとなった。抗NMDA受容体抗体陽性髄液が海馬ニューロンの長期増強誘導（LTP）を抑制することを明らかにした。

【卵巣奇形腫の免疫組織学的検討】NMDA型GluR Subunit（NR1、NR2B）の卵巣奇形腫における発現は脳炎群に限らずcontrol群においても認められ、差異はみとめなかったが、卵巣奇形腫の神経組織へのリンパ球浸潤は、脳炎群で著明であり、Bリンパ球が主体であった。

【抗VGKC抗体陽性辺縁系脳炎】本邦抗VGKC抗体陽性辺縁系脳炎では、およそ6割がVGKC複合体の構成分子であるLeucine-rich glioma-inactivated 1（LGI1）に対する抗体を有していた。一方、Isaacs症候群の一部と、Morvan症候群では、抗VGKC抗体が認識する抗原が、末梢神経系における

VGKC複合体の構成分子であるcontactin-associate protein (CASR) 2であることが分かってきた。

【抗NAE抗体陽性脳症】抗NAE抗体陽性の小脳失調型橋本脳症血清を添加したプロテオーム解析で、エネルギー代謝やロイシン代謝に関与する酵素蛋白の一つであるmethylcrotonoyl CoA carboxylaseの発現に有意な減少が認められた。

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
- 米田 誠、福井大学医学部第2内科（神経内科）、准教授
- 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、講師
- 市山 高志、山口大学大学院医学系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、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）
- 西田 拓司、東京大学医学部附属病院精神神経科、特任講師
- 田畑 絵美、佐賀大学医学部内科学

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）。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。

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2009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2008-9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。

【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。

【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1-資料8)、②非ヘルペス性急性辺縁系脳炎・脳症(NHALE)の発作症状(seizure symptom)(参照1-資料7)、③NMDA型GluR構造と抗GluR ϵ 2(NR2B)抗体(参照3-資料9)、④非ヘルペス性辺縁系脳炎・脳症の予後(参照1-資料13)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】イムノブ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(cell-based assay)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】二次元免疫ブ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。

【非ヘルペス性急性辺縁系脳炎(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-CT)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NHALE 61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low、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受容体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NHLE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。

以上より、急性脳炎・脳症の中には、かなりの頻度で抗GluR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. 2010年度研究の目的

2008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。2010年度研究においては以下の点に取り組む。

1. 研究で解明できたデータの診断スキームへの収載 (HP 掲載)
2. 血液脳関門破綻のメカニズム : MMP-9 産生機序、好中球などの遊走因子
3. 自己抗体産生、作用機構 : 末梢 GluR 抗原産生機構、免疫制御遺伝子、GluR 内在化作用機構
4. 治療と予後の関連解明

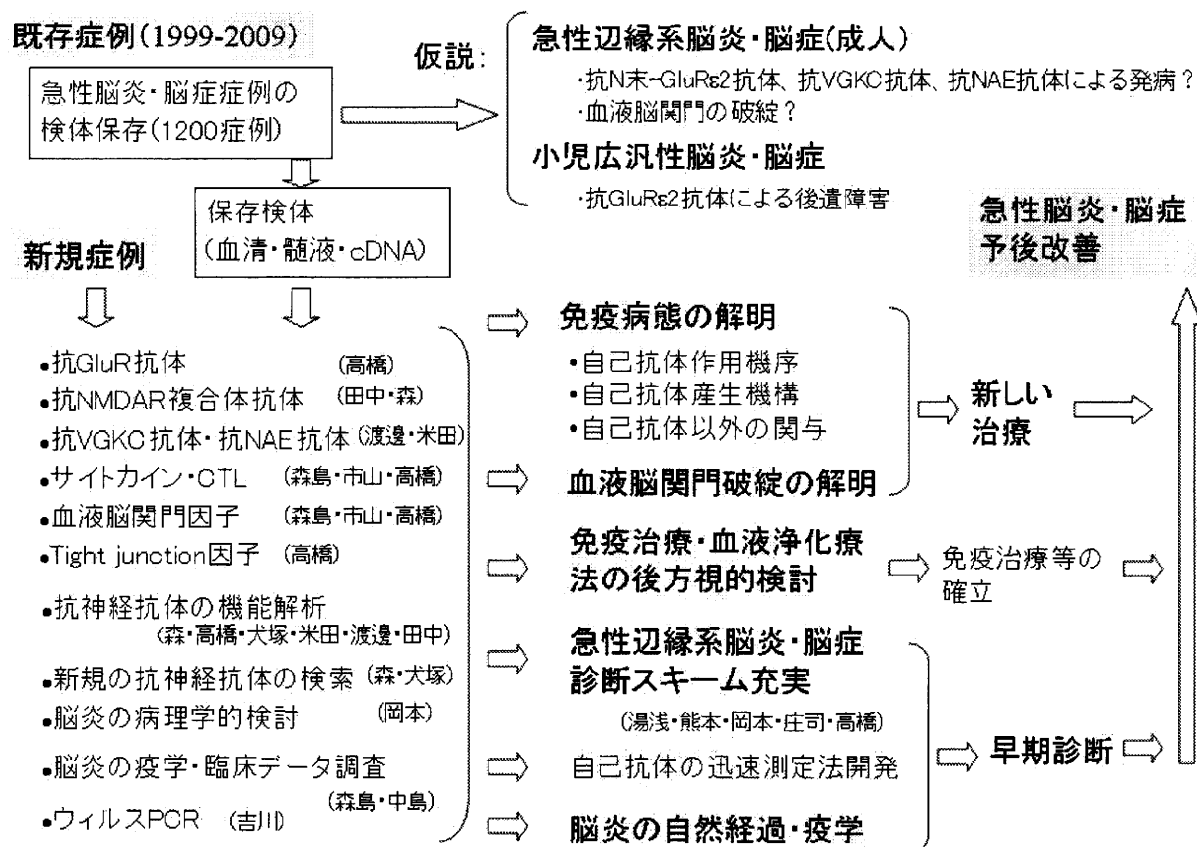


図1. 研究戦略

表2. 2010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の研究
 - 抗 GluRe2 (NR2B)・GluR ζ 1 (NR1)抗体と NMDA 型 GluR 複合体の内在化 (森寿、高橋幸利担当)。
 - 抗 VGKC 抗体 (渡邊修担当)、抗 NAE 抗体 (米田誠担当) の機能について分担研究する。
- ②. 自己抗体の迅速測定法の開発・新規抗体
 - 抗 NMDAR 複合体抗体測定法の精度・安定性向上を目指す (森寿、田中恵子担当)。
 - 脳炎における新規自己抗原 (抗体) の検索を高感度ナノ LC-MS/MS システム等を用いて検討を行う (犬塚貴担当)。
- 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、Caspase-3 発現を検討する。
 - 脳炎患者末梢制御性 T 細胞の機能を評価する。
 - 免疫制御遺伝子 (PDCD-1、CTLA-4 など) の検討。
 - 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
 - MMP-9、TIMP-1 などの制御機構の検討 (市山高志担当)。
 - 好中球などの遊走因子と MMP-9 の関連の検討 (高橋幸利担当)。
 - 動物モデルでサイトカインの役割を解明する (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 複合体抗体以外の抗体関与を検討する (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 (岡本幸一担当)。
 - 卵巣奇形腫の画像の検討 (湯浅龍彦担当)。
 - 手術療法、免疫療法の有効性の検討 (高橋幸利担当)。
- ⑥. 急性辺縁系脳炎の免疫学的治療 (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初発精神症状、サイトカイン、MMP-9、病理などのデータを加える。
- 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（20091101-20101031）=318症例

症例情報登録（20091101-20101031）=270例

病態分類別症例数

分類	20060807- 20070917	20070917- 20081031	20081101- 20091031	20091101- 20101031
急性脳炎脳症	142	185	181	96
亜急性脳炎	14	28	51	41
傍腫瘍性辺縁系脳炎	12	21	30	18
再発性脳炎	9	20	12	22
膠原病合併脳炎脳症	6	7	14	4
橋本脳症	5	5	5	3
ADEM	3	4	2	5
MS		3	0	0
インフルエンザ脳症	2	2	2	0
SSPE	1	0	1	0
血球貪食症候群	1	1	0	0
白質脳症		2	1	0
化膿性髄膜炎	1	1	0	1
HIE	1	0	0	0
OMS		10	6	0
小脳炎		14	22	0
傍腫瘍性脳幹小脳炎		7	5	28
脳幹脳炎	1	3	4	3
脊髄炎	2	0	0	0
その他		1	1	8
合計	200	314	337	318
	13か月	13か月	12か月	12か月

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1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1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

鳥取県内の基幹病院(10病院)神経内科に辺縁系脳炎・脳症の前向き調査のための診断登録基準(参照1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、2007年1月から2010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。診断は当研究班で作成された「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」に準じて、①ウイルス性辺縁系脳炎(単純ヘルペス性脳炎、非単純ヘルペス性ウイルス性)、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・分類不能に分類した(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した(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

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うことを目的としている。

2010年度は①疫学、②血液脳関門、③サイトカイン、④病理、⑤橋本脳症を、担当者の草稿を下に郵送により協議した(中島、市山、岡本、米田、高橋)。

4. 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非ヘルペス性急性辺縁系脳炎(NHALE)100例を対象とした。

全長GluR ϵ 2分子を抗原とする抗GluR ϵ 2抗体の測定はイムノブロット法で行い、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)。

GluR ϵ 2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(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。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。

GluR ζ 1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GluR ζ 1-NT抗体(ELISA)、抗GluR ζ 1-CT抗体(ELISA)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(図2・3)。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。

GluR δ 2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GluR δ 2-NT抗体(ELISA)、抗GluR δ 2-CT抗体(ELISA)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(図3)。

抗NMDA受容体複合体抗体(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)。

5. 抗NMDA受容体複合体抗体on cell Western法

通常のNMDA受容体は、GluR ϵ (GluN2、NR2)とGluR ζ 1(GluN1、NR1)の複合体として培養細胞表面上に発現し細胞死を誘導する。この細胞毒性を回避するためにCa²⁺透過性の低い変異体(GluR ϵ 2N/R、GluR ζ 1N/R-EGFP)発現ベクターを構築し、HEK293細胞に導入した。またGluR ζ 1N/R-EGFPを単独で細胞に導入した。また、GluR ϵ 2N/R-DsRedとGluR ζ 1N/R-EGFPを安定的に発現するHEK293細胞株を樹立した。

上記細胞株を96穴プレートにて培養し、固定後、抗体と4°Cで反応させ、翌日2次抗体を反応させ、Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR)を用いて蛍光強度を計測した。

本研究班に送付、および富山大学神経内科で採取された検体(卵巣奇形腫に伴う傍腫瘍性脳炎5名、辺縁系脳炎4名、抗NMDA関連脳炎1名)血清および髄液と、これらの細胞を反応させ検討を行った(森)。

6. 興奮性シナプス伝達への影響評価

げっ歯類より作製した海馬を含む脳スライス標本に、患者検体を添加し、微小電極を用いてTBS刺激を加え、ニューロンの基本的シナプス伝達およびシナプス可塑性への影響を検討した。対照として、人工髄液、非炎症性神経疾患およびヘルペス脳炎患者の髄液を用いた(田中)。

7. 培養ラット胎児神経細胞を用いたアポトーシスへの影響評価

培養ラット胎児神経細胞の調製:妊娠ラット(ウイスターラット、日本SLC)より胎生15日目の胎児を取り出し断頭、脳を取り出し大脳半球の懸濁液作成し、三種類のステンレスメッシュ(150、75、53 μ m)で濾過した後、血清培地にて培養した。培養ラット胎児神経細胞の3DIVに血清培地から無血清培地へ変更し、患者髄

液(髄液0.2ml+培養液1.8ml)あるいは患者髄液由来IgG(髄液0.2ml由来IgG分画+培養液1.8ml)を加え、7DIVと10DIVにApopLadder EX(タカラバイオMK600)を用いて培養細胞からDNAを分離し、Agilent 2100 バイオアナライザーにてDNAラダー形成を判定した(高橋)。

8. 血液脳関門破綻の神経細胞傷害への影響評価

脳炎急性期および回復期(21~247病日、平均94病日)における血清MMP-9、TIMP-1値をAmersham Biosciences社ELISAキットで、血清pNF-H値をEnCor Biotechnology社ELISAキットで測定した。検定はSpearman検定で行った(市山)。

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、神経組織の種類としてGFAP(アストロサイト)、Iba1(ミクログリア)、SMI-31(ニューロン)、免疫細胞の種類として、T細胞(CD3、CD4、CD8)、B細胞(CD20)、NMDA型GluRの発現の有無として抗NMDA型GluR抗体(NR1、NR2B)を使用した(田畑)。

10. 抗Leucine-rich glioma-inactivated 1(LGI1)抗体測定系の開発

LGI1のヒトリコンビナント(Abnova)をサンプルとして、一次抗体に辺縁系脳炎患者の血清($\times 200$)・髄液($\times 50$)を用いwestern blotを施行した(犬塚)。

LGI1プラスミド(Origene)をトランスフェクションさせたHEK293細胞に対し、一次抗体に辺縁系脳炎患者の血清($\times 200$)・髄液($\times 50$)を用いimmunocytochemistryを施行した(犬塚)。

HEK293細胞をDMEM培養液にて培養後、DNA/polyethylenimine(PEI)を用いて遺伝子導入を行った。二日後、未固定のまま1:20に希釈した血清を室温1時間反応。その後、4% formaldehyde/PBSで固定後、1:750に希釈した二次抗体(ヤギ抗ヒトIgG抗体、Alexa Fluor 568)を室温45分(暗室)反応させて蛍光顕微鏡または共焦点レーザー顕微鏡で観察した(渡邊)。

11. 抗NAE抗体陽性患者血清の培養細胞添加によるプロテオーム変化の解析

ヒト由来培養細胞に抗NAE抗体陽性の小脳失

調型橋本脳症血清と対照血清を24時間添加し、それぞれ蛋白質を抽出し、プロテオーム変化を蛍光標識二次元ディファレンス電気泳動(2D-DIGE)法、MALDI-TOF MS法にて解析した(米田)。

12. 髄液・血中ウィルスの検討

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)。

-70 $^{\circ}$ C保存髄液25検体を使用し、定性PCR、あるいは定量PCR(SRL社)を行った(中嶋)。

13. 新型インフルエンザによる脳症における急性期遺伝子発現のプロファイル

けいれん・意識障害を示した患者群(脳症群)6例、肺炎で入院した児5例(肺炎群)および新型インフルエンザのみで軽快した群5例(コントロール群)について急性期および回復期の末梢

血(全血)を用い、RNAを抽出した。アレイはHuman Genome U133 Plus 2.0 Array(Affimetrix)を使用した。患者毎のシグナル比(入院時/退院時の比)を用いて、各群とコントロールと比較した(森島)。

(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

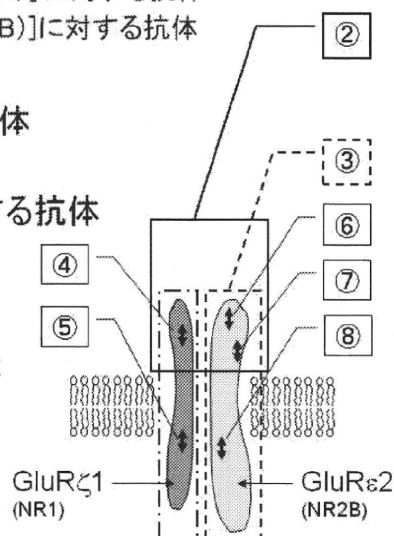
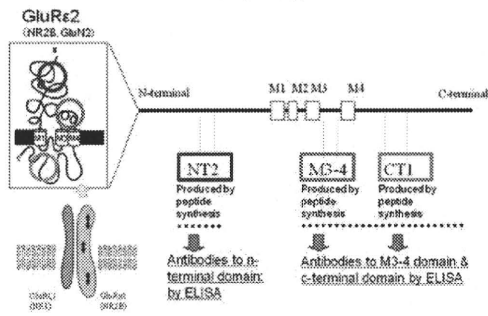
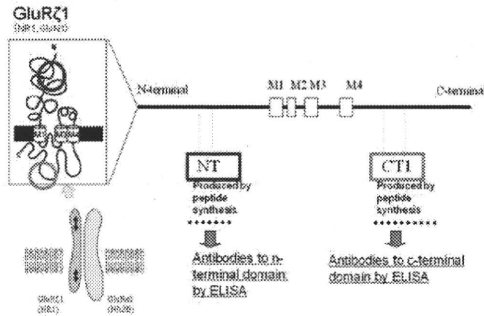


図2. NMDA型GluR サブユニット、複合体に対する抗体の分類

A. 抗GluRε2 (NR2B)抗体のエピトープ



B. 抗GluRζ1 (NR1)抗体のエピトープ



C. 抗GluRδ2抗体のエピトープ

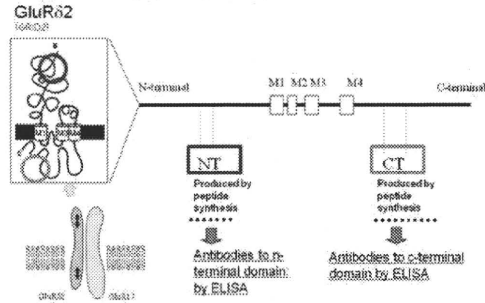
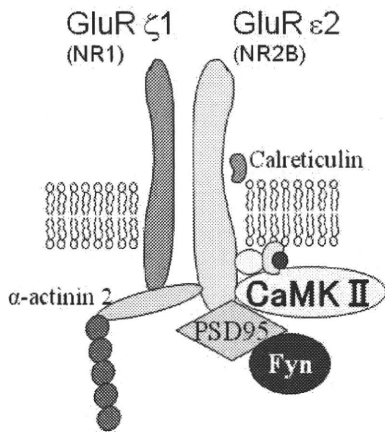


図3. 抗GluR抗体測定の抗原エピトープ

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 ζ1) and or NR2B (GluR ε2)
- Bispecific antibodies to extracellular domain of NR1 (GluR ζ1) and NR2B (GluR ε2)

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2009年10月で850症例を、2009年11月からは年間約300症例を登録できた（表4）。

2. 急性脳炎・脳症の疫学調査

鳥取県内の基幹病院（10病院）神経内科において、2007年1月から2010年8月の期間、脳炎を調査したところ、20例の急性辺縁系脳炎の発症が報告され、男性11例、女性9例であった。急性辺縁系脳炎・脳症の16歳以上の罹患率は10.8/100万人年であった。年代別罹患率は特に60歳以上の罹患率が高く、次に20代の罹患率が高かった。

急性辺縁系脳炎・脳症の内訳は、単純ヘルペス性辺縁系脳炎が6例（男性2例、女性4例）、非ヘルペス性ウイルス性辺縁系脳炎が5例（男性4例、女性1例）、傍感染性脳炎・脳症が4例（男性3例、女性1例）、全身性膠原病合併脳炎・脳症が4例（男性1例、女性3例）、分類不能1例（男性1例）であった。単純ヘルペス性辺縁系脳炎例の発症年齢は61.3歳（23～86歳）でその罹患率は3.2/100万人年であった。傍感染性脳炎・脳症例の発症年齢は27.8歳（16～34歳）で、2.2/100万人年であった（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

2010年度は、①. 急性脳炎・脳症の疫学

-20100728-（参照1-資料6）、②非ヘルペス性急性辺縁系脳炎・脳症（NHALE）における血液脳関門機能 -20100728-（参照1-資料11）、③非ヘルペス性急性辺縁系脳炎・脳症における髄液サイトカイン解析-20100728-（参照1-資料10）、④非ヘルペス性急性辺縁系脳炎・脳症の神経病理所見-20100728-（参照1-資料12）、⑤橋本脳症の臨床的特徴 -20100728-（参照1-資料14）の診断スキームを作成し、「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、2010年10月にホームページに掲載した（参照1）（中島、市山、岡本、米田、高橋）。

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

4. 非ヘルペス性急性辺縁系脳炎（NHALE）の精神症状の特徴

NHALEの発病時にみられた精神症状は、出現頻度の高い順に、滅裂思考24名（55%）、まとまりのない会話24名（55%）、意識レベルの低下・見当識障害18名（41%）、奇異な行動16名（36%）、興奮12名（27%）などだった。NHALE44名中32名（73%）で、精神症状出現に先だてて、発熱、頭痛、咽頭痛、感冒症状などの前駆症状がみられた。8名（18%）に精神科疾患の既往あるいは心因を疑わせるエピソードがあった。

髄液中抗GluR ϵ 2抗体陽性26名と陰性18名の間で、出現率に統計学的有意差のある精神症状はみられなかったが、情動不安定、認知機能障害、妄想は抗GluR ϵ 2抗体陽性例でより多くみられる傾向にあった（西田）。

5. NHALE急性期脳血流SPECTの検討

2006から2010年に急性脳炎で大分大学医学部附属病院神経内科に入院し、発症から30日以内に脳血流SPECTを施行した12例で、臨床診断は、HSE 1例、NHALE 4例、意識障害、痙攣または異常言動が見られたが、頭部MRIで異常所見を認めず、NHALE疑いとされた症例が4例、その他の急性脳炎が3例であった。

e-ZIS解析では、拡散強調画像で辺縁系や大脳皮質に高信号を示したHSE、NHALE、急性脳炎

において拡散強調画像高信号域の脳血流が増加していた。拡散強調画像の高信号域と脳血流の増加は、痙攣による変化と考えられた。

MRIで異常を認めなかった症例では、海馬、海馬傍回、島皮質、帯状回などの辺縁系の脳血流が低下していた。SPM8解析でも島皮質、海馬傍回、前頭前野に脳血流の低下を認めた。NHALEにおける辺縁系の脳血流低下は、神経細胞の機能障害を反映している可能性が考えられた(熊本)。

6. 脳炎画像所見における痙攣の影響の検討

2000年6月～2010年9月の間に大分大学医学部附属病院神経内科に入院した急性脳炎・脳症の症例のうち、頭部MRI画像検査で限局性の病変を認め、けいれんまたは非けいれん性てんかん重積をきたした群(以下、けいれん群)および同様にMRIで限局性の病変を認め、けいれんや非けいれん性てんかん重積をきたさなかった群(以下、非けいれん群)の比較検討を行った。

頭部MRIでは、いずれの群においても急性期の拡散強調画像やFLAIR強調画像で病変部は高信号域を示したが、けいれん群では、急性期にはガドリニウム(Gd)造影効果を認めず、慢性期に大脳皮質に層状壊死を伴う脳の萎縮を4例中3例に認めた。非けいれん群では、急性期にGd造影効果を4例中3例に認めたが、慢性期には、けいれん群でみられたような大脳皮質の層状壊死を伴った脳の萎縮は認めなかった。髄液中の細胞数、蛋白、ミエリン塩基性蛋白値は、けいれん群および非けいれん群では両群間に有意差はなかった。しかし、髄液中の総タウ蛋白値は、けいれん群2327.5 pg/dl、非けいれん群317.7 pg/dlと両群も基準値(>200pg/ml)より高値を示したが、けいれん群で有意に高値であった($p < 0.000$)。髄液中の総タウ蛋白の著明な増加は、けいれん発作に伴う病変局所における大脳皮質の神経細胞障害を反映したものと考えられ、けいれんに伴うMRI画像変化と脳炎による変化との鑑別に、髄液総タウ蛋白は有用なマーカーである可能性が示唆された。

7. NMDA型GluR抗体陽性脳炎の予後・転帰

抗GluR ϵ 2抗体または抗NMDAR抗体(Dalmau法)陽性12例のうち、抗GluR ϵ 2抗体は測定した11例全例で、抗NMDAR抗体は測定し得た2例中2例で陽性で、5例で卵巣奇形腫を合併していた。卵巣奇形腫合併例では人工呼吸器装着に至る重症化例が5例中3例と高率であり、頭部MRIではいずれも明らかな異常は認めなかった。

一方、卵巣奇形腫非合併例では人工呼吸器による管理を必要としたのは7例中2例で高率とは言えず、頭部MRIでは側頭葉を中心に異常を認めた例が6例と高率であった。

抗GluR ϵ 2抗体陽性例のうち1例がSjögren症候群、1例がSLEと診断された。また、麻疹抗体上昇例が1例、サイトメガロウイルス抗体上昇例が1例あった。脳血流SPECTは8例で施行されており、全例で何らかの異常を認めた。

転帰は合併症による入院中の死亡1例を除き全例社会復帰(内1例はその後事故死)していた。入院期間は奇形腫合併例で3～11ヶ月、非合併例で3週～3ヶ月と前者が長期化する傾向があった。後遺症としては痙攣を5例に認めたが、抗てんかん薬は徐々に減量できており、内服を終了した例もあった。その他に意欲低下が7例に、健忘が3例にみられた(岡本)。

8. NHALEと卵巣奇形腫関連脳炎(抗NMDAR脳炎)の予後比較

非傍腫瘍性NHALE群の3ヵ月における障害の頻度は、ADL障害35.3%、てんかん発作35.3%、精神29.4%、知的35.3%、記憶70.6%、運動35.3%と記憶障害の頻度が高率で、1年後も同様であった。障害の程度はADL障害80.5%、てんかん発作80%、精神75%、知的76%、記憶50%、運動76.7%と知的・記憶障害が50%のレベルに障害され、1年後も記憶障害が同程度に残存した。

NMDAR群の3ヵ月における障害の頻度は、ADL障害66.7%、てんかん発作55.6%、精神66.7%、知的77.8%、記憶88.9%、運動66.7%と全般的障害がみられ、1年後では、ADL障害28.6%、てんかん発作14.3%、精神57.1%、知的71.4%、記憶71.4%、運動14.3%と精神・知的・記憶障害が残存していた。障害の程度はADL障害38%、てんかん発作45%、精神40%、知的34%、記憶15%、運動

40%と全般的重度障害がみられ、1年後では、A DL障害88.5%、てんかん発作90%、精神70%、知的82%、記憶55%、運動96.7%と精神・記憶障害も65~70%レベルに改善した(庄司)。

9. NMDA型GluRサブユニットに対する抗体測定法感度比較

GluRに対する抗体は、イムノブロット法、GluR各ドメインの合成ペプチドを用いたELISA、Dalmau法で測定した。

腫瘍を合併しない非ヘルペス性急性辺縁系脳炎(NHALE)における髄液中抗GluR ϵ 2抗体(イムノブロット法IgG)の陽性率は33.7%、髄液中抗GluR ϵ 2抗体(イムノブロット法IgM)の陽性率は27.5%、抗GluR ϵ 2-NT2抗体の陽性率は77.5%、抗GluR ϵ 2-CT抗体の陽性率は83.3%、抗GluR ζ 1-NT抗体の陽性率は56.9%、抗GluR ζ 1-CT抗体の陽性率は71.4%、抗GluR δ 2-NT抗体の陽性率は70.8%、抗GluR δ 2-CT抗体の陽性率は71.4%であった(図5、6)。Dalmau法のcell-based assayの陽性率は75.0%であった(高橋)。

10. 抗NMDA受容体複合体抗体on cell Western法

GluR ϵ 2N/R-DsRedとGluR ζ 1N/R-EGFPをHEK293細胞に導入し、FACSを用いて蛍光強度の強い細胞を選択した。EGFPとDsRedの陽性細胞表面でGluR ϵ 2とGluR ζ 1の発現を検出した。従って、 ϵ 2+ ζ 1の発現安定細胞株が樹立された。上記細胞株を用いon cell Western法で抗体価の測定を行った。96穴プレートに細胞を培養し、固定後、抗体と4°Cで反応させ、翌日2次抗体を反応させ、Odyssey Infrared Imaging System(LI-COR)を用いて蛍光強度を計測した。蛍光強度は、抗体希釈倍率に依存し、定量的解析が可能であった。よって、本法は細胞表面上のNMDARのエピトープを認識する自己抗体の検出に有用であると判断した。次に、検体を用い測定した結果、髄液では、患者とコントロールで、統計学的有意差を認めた($p=0.003$)。血清検体では、バックグラウンドが高値のものがあ、統計学的に有意差は検出できなかった。しかし、同一患者のフォローアップ検体では、治療直後では明らかに抗体価は低下していた(森)。

11. NMDA型GluRサブユニットに対する抗体の経過変動

血清髄液GluR ϵ 2-NT2抗体、抗GluR ϵ 2-CT抗体、抗GluR ζ 1-NT抗体、抗GluR ζ 1-CT抗体は脳炎発病期が最高でその後低下する傾向を示した(図7)。血清髄液抗GluR δ 2-NT抗体、抗GluR δ 2-CT抗体は経過とともに大きな変化を示さなかった(高橋)。

12. NMDA型GluRサブユニットN末に対する抗体のGluR吸着

20病日以内の急性期抗GluR抗体吸着率は抗GluR ζ 1抗体に比べて抗GluR ϵ 2、GluR δ 2抗体は有意に高く、経過とともに抗GluR ζ 1、GluR δ 2抗体の吸着率は低下したが、抗GluR ϵ 2抗体の吸着率は高値を維持した(図8)。

急性期抗体吸着率は、抗GluR ϵ 2抗体は濃度に比例して増加し、抗GluR ζ 1抗体は濃度とは無関係にほぼ一定、抗GluR δ 2抗体は濃度に反比例して低下した(高橋)。

13. NMDA型GluRサブユニット抗体のアポトーシスへの影響

非ヘルペス性急性辺縁系脳炎患者(LE-1)の髄液(IgG型抗GluR ϵ 2抗体イムノブロット陽性)を3DIVに加えた場合、7DIVでは対照に比べてDNAラダー形成はやや少ないが、10DIVではDNAラダー形成が著増していた。LE-1の髄液中のIgG分画を3DIVに加えた場合、7DIVおよび10DIVともにDNAラダー形成が抑制されていた。また培養上清のLDH濃度は、髄液を加えた場合には対照に比べて差が見られなかったが、IgG分画を加えた場合には対照に比べてLDH濃度は低値であった。非ヘルペス性急性辺縁系脳炎患者(LE-4)の髄液(抗GluR ϵ 2抗体、抗GluR ζ 1抗体ELISA陽性)を3DIVに加えた場合、7DIVでは対照に比べてDNAラダー形成はやや少ないが、10DIVではDNAラダー形成が著増していた。LE-1の髄液中のIgG分画を3DIVに加えた場合、7DIVでは差がないが、10DIVではDNAラダー形成が抑制されていた。また培養上清のLDH濃度は、髄液を加えた場合、IgG分画を加えた場合ともに対照に比べてわずかにLDH濃度は高値であった。

14. NMDA型GluRサブユニットGluR ζ 1の自己抗体による内在化（細胞内取り込み）の検討

GluR ϵ 2N/R+GluR ζ 1N/R-EGFP共発現細胞（以下 ϵ 2+ ζ 1）において、血清との反応を37°Cの条件で行うと、NMDARが細胞内に取り込まれた（昨年報告済）。さらに、GluR ζ 1の単独発現細胞（以下 ζ 1）においても、自己抗体による細胞内取り込みが観察された（森）。

15. 非ヘルペス性辺縁系脳炎患者の髄液によるLTPへの影響評価

非ヘルペス性辺縁系脳炎患者の髄液・血清中の抗NMDA受容体抗体は、患者検体とウサギの抗NR1/NR2抗体が、co-localizationを示す場合に陽性と判断した。マウスの海馬を含む脳スライス標本で測定したテタヌス刺激時のfEPSPの傾き（NMDA受容体特異的に検出されるとされるlong term potentiation:LTP）は、人工髄液、対照髄液に比べ非ヘルペス性辺縁系脳炎患者髄液で抑制され、患者の髄液がNMDA受容体機能を抑制することが明らかになった（田中）。

16. 血液脳関門病態の神経細胞損傷への影響

NHALE患者23例の急性期および回復期の血清計46検体の検討では、TIMP-1値とpNF-H値に有意な相関関係がみられた（ $p=0.015$ 、 $r=0.355$ ）。神経細胞損傷が強まれば、TIMP-1の産生が亢進し、BBB機能を保護しようとする反応が促進することが示唆された。MMP-9値およびMMP-9/TIMP-1比とpNF-H値の間に有意な相関は認めなかった（市山）。

17. 卵巣奇形腫の免疫組織学的検討

卵巣奇形腫関連傍腫瘍性脳炎群（ $n=3$ ）：神経染色にてアストロサイト、ミクログリア、ニューロンを認め、同部位にてNMDA受容体SubunitであるNR1、NR2Bを認め、すべての症例でNMDA抗体の染色はNR1、NR2Bともに2+であった。神経組織内部、周囲にT細胞（CD3、CD4、CD8）の浸潤、B細胞（CD20）の浸潤を認めた。卵巣奇形腫関連傍腫瘍性脳炎3例のうち、重症例2例ではB細胞の浸潤を著明に認めた。

Control群（卵巣奇形腫摘出・非脳炎群）（ $n=19$ ）：神経染色にてアストロサイト、ミクログリア、ニューロンを認めた。神経組織に一致

して、NMDA受容体SubunitであるNR1、NR2Bはみとめる例、認めない例があった。Control群のNR1の発現は95%（1+：18%、2+：25%、3+：45%）、NR2Bの発現は79%（1+：37%、2+：26%、3+：16%）と高頻度に認めた。神経組織内部、周囲にT細胞（CD3、CD4、CD8）の浸潤、B細胞（CD20）の浸潤を認める例は19例中2例（10%）であった。卵巣奇形腫関連傍腫瘍性脳炎群、Control群で神経組織周囲にリンパ球浸潤を認めた例は5例あり、神経組織周囲のリンパ球浸潤の種類はTリンパ球およびBリンパ球を認め、脳炎の有無に問わず、Bリンパ球優位に浸潤であった。Tリンパ球はCD4陽性リンパ球 \geq CD8陽性リンパ球のリンパ球浸潤を認めた。脳炎群では、重症例であるほどBリンパ球の浸潤および集簇像を認めた（田畑）。

18. プリオン病と抗GluR抗体

CJD 7例、ALS 10例、てんかん19例を対象とした。CJD患者は平均年齢71.4歳、男性5例、孤発性4例（definite 1例）、V180I 1例、M232R 2例（definite 1例）であった。精神症状は4/7例（57%）で記載された。痙攣発作、腫瘍合併は全例で認めなかった。血清はCJD 3例で解析され、GluR ζ 1 CTおよびGluR ϵ 2 CTに対する抗体がCJD群のみで有意に上昇していた（それぞれ $p=0.004$ 、 $p=0.006$ ）。髄液は7例全例で解析され、測定した全ての抗体がCJD群（ $p<0.001$ ）、ALS群（ $p<0.01$ ）ともに対照群と比較し有意に上昇していた（湯浅）。

19. 非ヘルペス性辺縁系脳炎における抗LGI抗体

対象は非ヘルペス性辺縁系脳炎の臨床診断で、平成22年7までに血清が鹿児島大学に送付された300余症例。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39例を抽出した。これらの症例血清を用い、LGI-1導入細胞を用いた免疫組織学的検討では、VGKC-LE症例の64%でLGI-1を標的抗原としていた。一部のVGKC-LE患者血清が反応しなかった。一方、Isaacs症候群11例中3例で抗LGI抗体が認められた（渡邊）。

LGI1のヒトリコンビナント（Abnova）をサン

プルとして、一次抗体に辺縁系脳炎患者の血清（×200）・髄液（×50）を用いwestern blotでは、抗VGKC抗体陽性辺縁系脳炎患者2例の髄液中にのみ抗LGI1抗体を検出した。

LGI1プラスミド (Origene) をトランスフェクションさせたHEK293細胞に対し、一次抗体に辺縁系脳炎患者の血清（×200）・髄液（×50）を用いたimmunocytochemistryの検討では、western blotで陽性となった2例の血清・髄液中で抗LGI1抗体を確認した（犬塚）。

20. 小脳失調症状を主徴とする橋本脳症の臨床特徴

小脳失調症状を主徴とし、抗甲状腺抗体が陽性、ステロイドなどの免疫療法に対する反応性が良好であり、橋本脳症と診断された多施設10例（自験例1例）を対象とした。抗NAE抗体陽性例が5例、陰性例が5例。平均年齢は、51歳/59歳（以下、陽性群/陰性群の順）、男女比 1 : 4/3 : 2であった。甲状腺機能は正常 3例/5例と正常例が多く、橋本病の既往 3例/1例。また、抗GAD抗体、抗グリアジン抗体はいずれも陰性。発症様式は、亜急性 1例/2例、慢性 4例/3例と慢性に経過している症例が半数以上を占めた。小脳症状は、眼振 0例/2例、構音障害 3例/3例、体幹失調 全例/全例、四肢失調 2例/4例。失調以外の症状は、軽度意識障害 1例/0例、痙攣無し、軽度認知機能低下・精神症状 3例/1例、不随意運動 1例/1例。脳波で基礎波の徐波化 3例/1例、髄液中蛋白上昇 0例/1例であった。頭部MRIは、陽性例では4例で小脳萎縮なく正常、陰性例では2例で小脳萎縮を認めなかった。脳血流シンチで小脳の血流低下を認めたものは0例/3例であった。治療反応性は、著効 3例/0例、中等度効果 0例/3例、軽度効果 2例/1例であり、治療内容はステロイドパルス療法、経口プレドニゾン、大量免疫グロブリン静注療法、免疫抑制剤などが使用されていた（米田）。

21. 抗NAE抗体の作用機序の検討

抗NAE抗体陽性の小脳失調型橋本脳症血清を添加したプロテオームが、対照血清添加したものよりも有意に減少しているスポットが存在し、そのスポットから質量分析を行ったところ、エネルギー代謝やロイシン代謝に関

与する酵素蛋白の一つである

methylcrotonoyl CoA carboxylaseの発現に有意な減少が認められた（米田）。

22. 新型インフルエンザによる脳症における急性期遺伝子発現のプロファイル

脳症群では急性期に116遺伝子の発現の増強が認められた(3倍以上、 $P < 0.05$)。一方肺炎群では288遺伝子の発現増強が認められた。GO解析の結果では脳症群の高発現遺伝子群ではInnate immune response、IL-1、Regulation of inflammatory responseに関連する遺伝子群の増強が示された。一方肺炎群ではInflammatory response、Innate immune response、パントテン酸、補体、IL-1、IL-8、Phospholipid scramble、Oxygen homeostasis に関連する遺伝子群の増強が認められた（森島）。

23. 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

10検体中VZV、HHV-6、HHV-7、CMV、HHV-8 DNA陽性検体はなかったが、昨年度同様1例で12500コピー/mlのEBV DNAが検出された。この症例は伝染性単核症の臨床経過に合致していた（吉川）。

24. 成人の辺縁系脳炎、急性脳炎のVZV検出状況

対象は2003年から2009年までに大阪医科大学、清恵会病院に入院した、急性非ヘルペス性辺縁系脳炎7例、急性脳炎12例、無菌性髄膜炎6例。平均年齢はそれぞれ40歳、48歳、42歳で、いずれの症例も原因としてHSVは否定され、悪性腫瘍やHIV、免疫抑制薬投与など免疫抑制状態をきたす基礎疾患はなく、経過中に带状疱疹の合併はなかった。急性脳炎の1例よりVZV DNAが定性PCRにて検出された（中嶋）。

25. 症例研究-1

抗GluR ϵ 2抗体陽性非ヘルペス急性辺縁系脳炎（以後根本脳炎）の後遺症として、慢性期に至り難治性のもてんかんが持続する症例を報告した。この症例では髄液と血清の抗GluR ϵ 2抗体が急性脳炎完治後も持続的に陽性であり、メチルプレドニンパルス療法にててんかんの