

A. 検討対象：非ヘルペス性急性辺縁系脳炎・脳症 (NHALE)

急性脳炎・脳症関連 369 症例から、腫瘍合併例、再発例、慢性例、膠原病合併例、インフルエンザ脳症、単純ヘルペスウイルス PCR 陽性例などを除き、辺縁系症状 (表 1) で神経症状が始まった 15 歳以上の NHALE 91 例について検討した結果を示す。

表 1. 辺縁系症状

表 1. 急性辺縁系脳炎の定義

- ・明らかな意識障害出現前の急性期初期に
- ・辺縁系症状 (1-4) のいずれかひとつを示し、
- ・その後、急性に脳炎症状が経過した症例

辺縁系症状

1. 精神症状等

行動異常、思考減裂、興奮状態、幻聴、幻臭、精神運動興奮状態、統合失調症状、せん妄、性欲亢進、など

2. 記憶障害

3. 見当識障害

4. 感情障害

高橋幸利, 他, 脳炎における抗 GluR 抗体の意義, 第 48 回日本神経学会総会シンポジウム (SY-3) 神経疾患と自己抗体

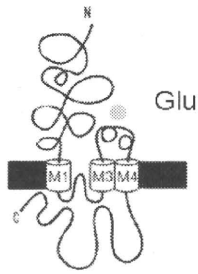
B. NMDA 型グルタミン酸受容体 (GluR) の構造

NMDA 型 GluR は、必須となる GluR ζ 1 (NR1) と、GluR ϵ 1- ϵ 4 (NR2A-2D) あるいは GluR χ 1, χ 2 (NR3A, 3B) といったサブユニット (図 1-A) が 4 つ会合した 4 量体 (複合体) 構造をとり (図 1-B)、イオンチャネルとして機能しているが、複数のサブユニット会合パターンがあるとされている (図 1-C)。個々のサブユニットは、細胞外にある N 末から 4 つの膜領域を経て、細胞質側に C 末が存在する共通構造をとっている (図 1-A、図 2)。

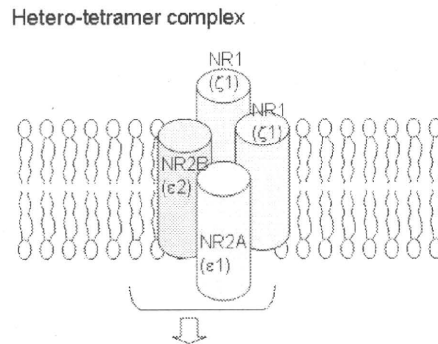
C. NMDA 型 GluR の分類

イオンチャネル型 GluR には 18 種類のサブユニットがあり、分子多様性が存在し、中枢神経系内の早い興奮性シナプス伝達の中心的役割を担っている重要な分子である。マウスの遺伝子解析からの命名は GluR ζ 1, GluR ϵ 1-4 などと呼ばれ、ラットの遺伝子解析からの命名は NR1, NR2A-2D などと呼ばれるが、人、マウス、ラットの遺伝子は相同性が非常に高い (表 2)。

A. サブユニットの構造



B. サブユニットの会合によるチャネル構造



C. サブユニットの会合パターン

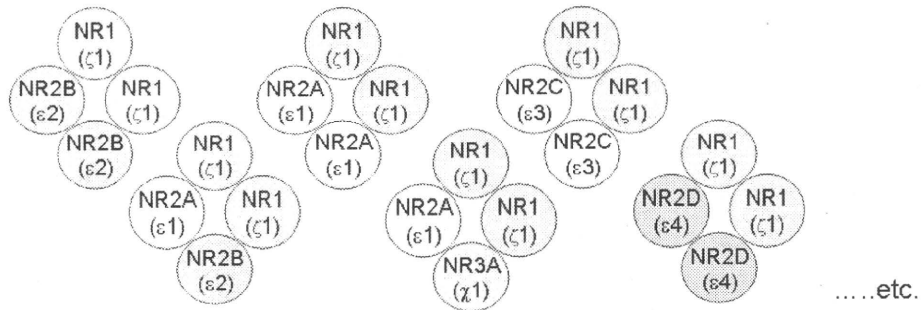


図1. NMDA型グルタミン酸受容体 (GluR) の構造-1-

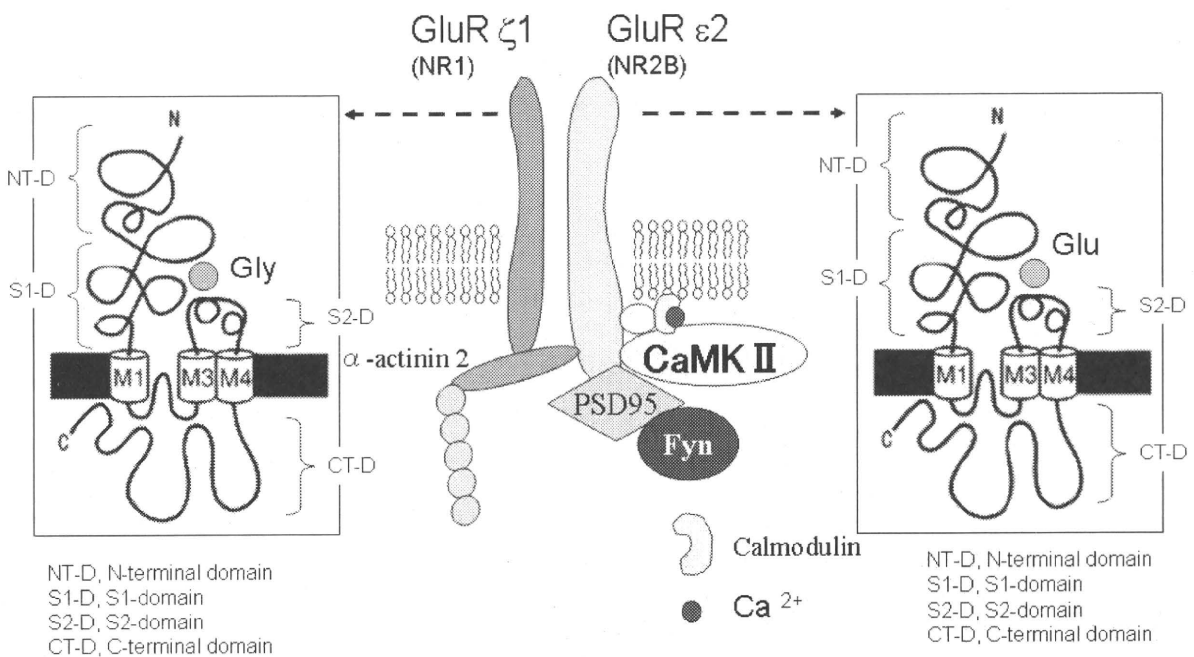


図2. NMDA型グルタミン酸受容体 (GluR) の構造-2-

表2. グルタミン酸受容体の多様性

Subfamilies	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 GluR ϵ	$\epsilon 1$	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
GluR ζ	$\zeta 1$	NR1					びまん性
GluR χ	$\chi 1$	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

D. 抗 GluR $\epsilon 2$ 抗体の測定

抗 GluR $\epsilon 2$ 抗体の測定は、NIH3T3 細胞中に遺伝子組み換えにて発現させた GluR $\epsilon 2$ (NR2B) の全長蛋白を抗原として行っている (図 3)。抗原を含む NIH3T3 細胞ホモジネートをポリアクリルアミド電気泳動 (PAGE) し、ニトロセルロース膜に転写した。ニトロセルロース膜を髄液などの検体と反応させた後、2 次抗体を用いて抗体の有無を判定した (イムノブロット法)。エピトープ解析は、N 末 (NT2)、M3-4 ドメイン、C 末 (CT1) のペプチドを合成し、それらの合成ペプチドを抗原として ELISA 法により測定した。

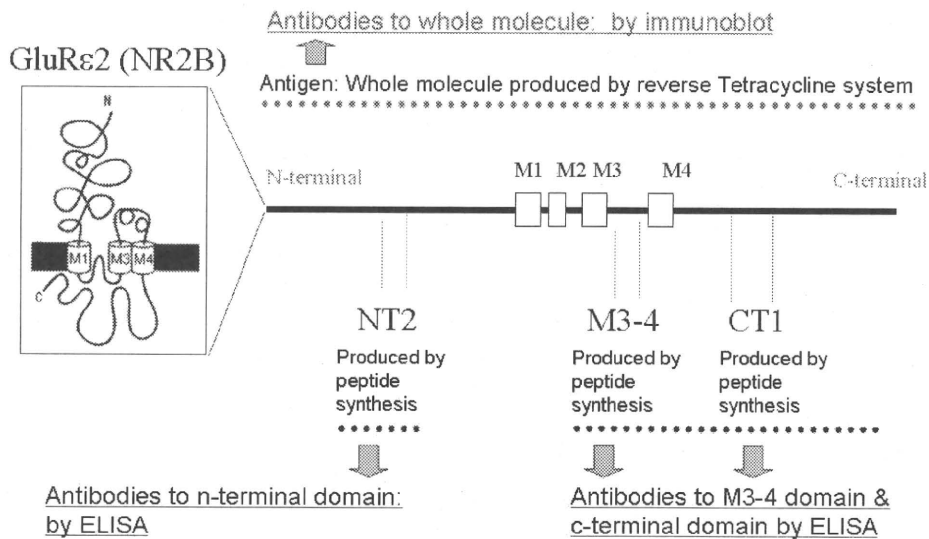


図 3. 抗 GluR $\epsilon 2$ 抗体の抗原と測定法

E. NHALE と抗 GluR ϵ 2 抗体

血清中抗 GluR ϵ 2 抗体 (IgG または IgM) は、急性期から慢性期において NHALE の約 60%に見られ、髄液中抗 GluR ϵ 2 抗体は急性期の約 50%、回復期の約 40%、慢性期の約 30%の症例に見られ、陽性率は次第に低下した (図 4-C)。髄液中の抗 GluR ϵ 2 抗体は急性期でもかなり早い時期に出現した。

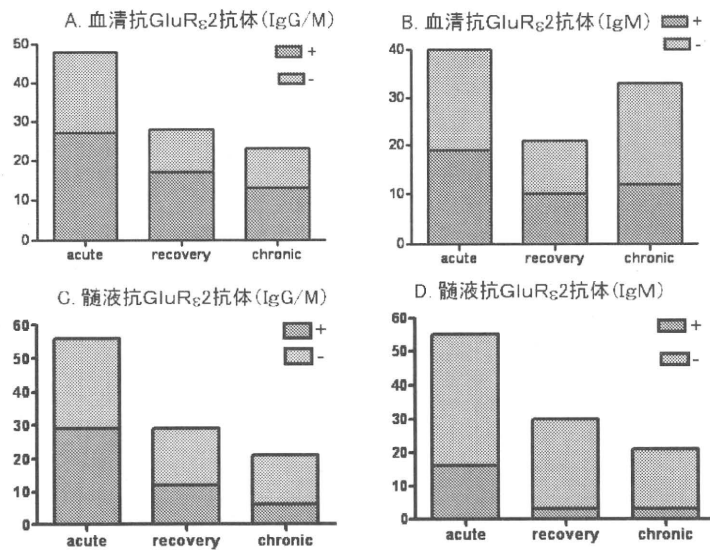
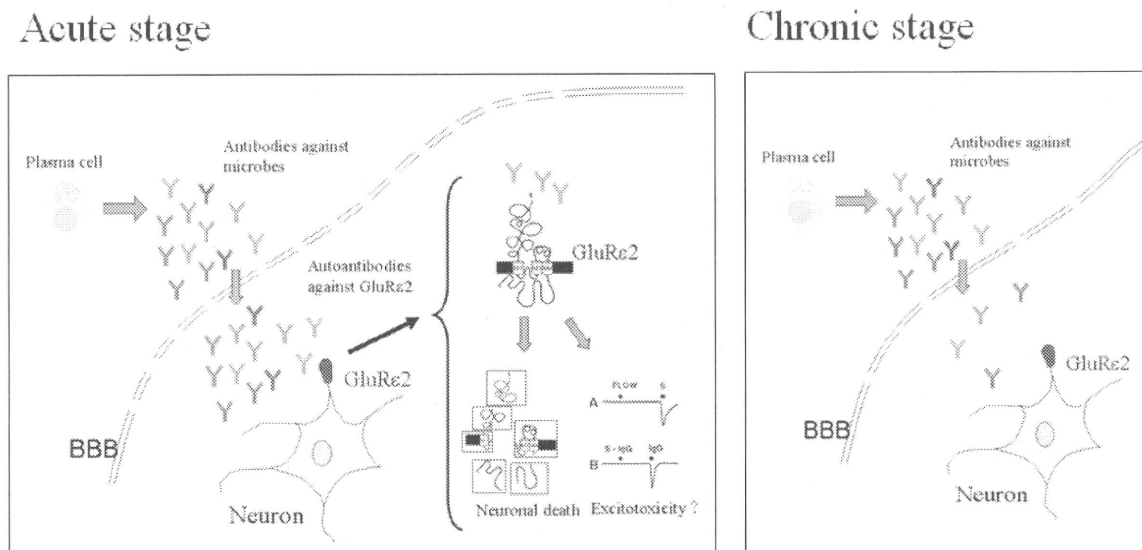


図 4. 全長 GluR ϵ 2 分子を抗原とする抗 GluR ϵ 2 抗体

F. まとめと考察

血液中にできた抗 GluR ϵ 2 抗体は、血液脳関門の破綻などにより中枢神経系に至り、何らかの急性期脳炎症状に寄与するが、回復期・慢性期になると血液脳関門の回復により髄液中での濃度が低下、症状回復する可能性を考えている (図 5)。

髄液抗 GluR ϵ 2 抗体は NHALE の診断マーカーではなく、ラスマッセン症候群などの自己免疫が関与する疾患でも検出され、GluR 自己免疫の関与を示唆する病態マーカーである。



高橋幸利, 他, ラスマッセン脳炎と非ヘルペス性急性性辺縁系脳炎, 臨床神経学, 2008; 48: 163-172.

図 5. 抗 GluR ϵ 2 抗体と NHALE の病態生理

参考：NMDA 型 GluR に対する抗体の分類

NMDA 型 GluR が 4 つのサブユニットから成る多様性を有する複合体構造のため、抗 NMDA 受容体に対する抗体という場合、多種の抗体が含まれる(図 6)。抗体検出に用いる抗原から分類すると、A. 2 種以上のサブユニットからなる NMDA 受容体複合体を抗原として検出する抗体、B. NMDA 受容体複合体を構成する個々のサブユニットを抗原として検出する抗体に大別される。A は Dalmau らの卵巣奇形腫を伴う傍腫瘍性辺縁系脳炎 (NHLE-OT) で報告された NMDA 受容体複合体を認識する抗体で、日本では“抗 NMDA 受容体抗体”と呼ばれてきた。NMDA 受容体複合体ではなく、NMDA 受容体複合体の各サブユニットを認識する抗体 (B) も NMDA 受容体を認識する抗体であり、GluRε2 (NR2B) 全長蛋白を抗原とする抗 GluRε2 抗体も広義の抗 NMDA 受容体抗体とした。A、B あわせて“広義の抗 NMDA 受容体抗体”と呼び、Dalmau 抗体は抗 NMDA 受容体複合体抗体 (狭義の抗 NMDA 受容体抗体) とした。Dalmau らは NMDA 受容体複合体のエピトープを NR1 (N 末側 25-380 アミノ酸) にあると考えているようである。

A) NMDA受容体複合体に対する抗体(狭義の抗NMDA受容体抗体)

- ① [GluRζ1 (NR1)+GluRε1(NR2A)]を抗原とする抗体
- ② [GluRζ1 (NR1)+GluRε2(NR2B)]を抗原とする抗体

B) NMDA受容体の各サブユニットに対する抗体

・全長サブユニットを抗原とする抗体

- ③ 抗 GluRε2 (NR2B) 抗体

・サブユニットの各ドメインを抗原とする抗体

- ④ 抗 GluRζ1 (NR1)-NT 抗体
- ⑤ 抗 GluRζ1 (NR1)-CT 抗体
- ⑥ 抗 GluRε2 (NR2B)-NT2 抗体
- ⑦ 抗 GluRε2 (NR2B)-M3-4 抗体
- ⑧ 抗 GluRε2 (NR2B)-CT1 抗体

Methods

- ①②: Immuno-cytochemistry
- ③: Immuno-blot
- ④-⑧: ELISA

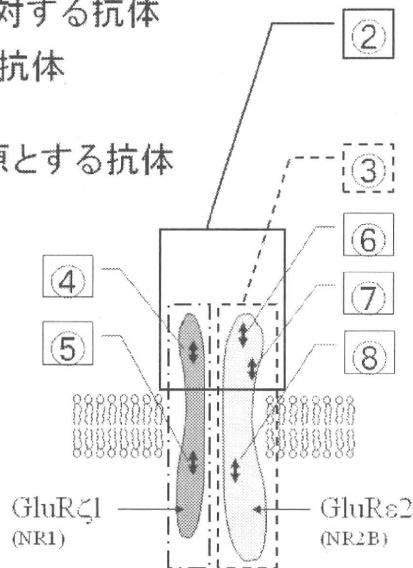


図 6. 抗 NMDA 受容体抗体の分類

参考文献：

1. Y. Takahashi, et al. Autoantibodies to NMDA receptor in patients with chronic forms of epilepsy partialis continua. *Neurology* 2003; 61(7): 891-896. (測定方法など)
2. Dalmau J, et al., Paraneoplastic Anti-N-methyl-D-aspartate Receptor Encephalitis Associated with Ovarian teratoma, *Ann Neurol* 2007; 61: 25-36. (NHLE-OT での Dalmau の抗 NMDA 受容体複合体抗体)
3. 高橋幸利、他、ラスムッセン脳炎と非ヘルペス性急性辺縁系脳炎、*臨床神経学*、2008; 48: 163-172.
4. 高橋幸利、他、急性辺縁系脳炎・脳症と NMDA 型グルタミン酸受容体、*臨床神経学*、2008; 48: 926-929. (NHLE-OT)
5. 高橋幸利、他、3. 抗 GluR 抗体と脳炎、*神経内科*、2008; 69: 350-358.
6. 高橋幸利、他、免疫性神経疾患: 最近の進歩、NMDA 型グルタミン酸受容体と神経疾患、*Neuroimmunol.* 2009; 17(2): 245-255.
7. 高橋幸利、他、急性脳炎のグルタミン酸受容体自己免疫病態の解明、編集：鈴木則宏、他、*Annual Review 神経* 2010、p85-93、東京、中外医学社、2010 年 1 月.

資料 10. 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-

A. 検討対象

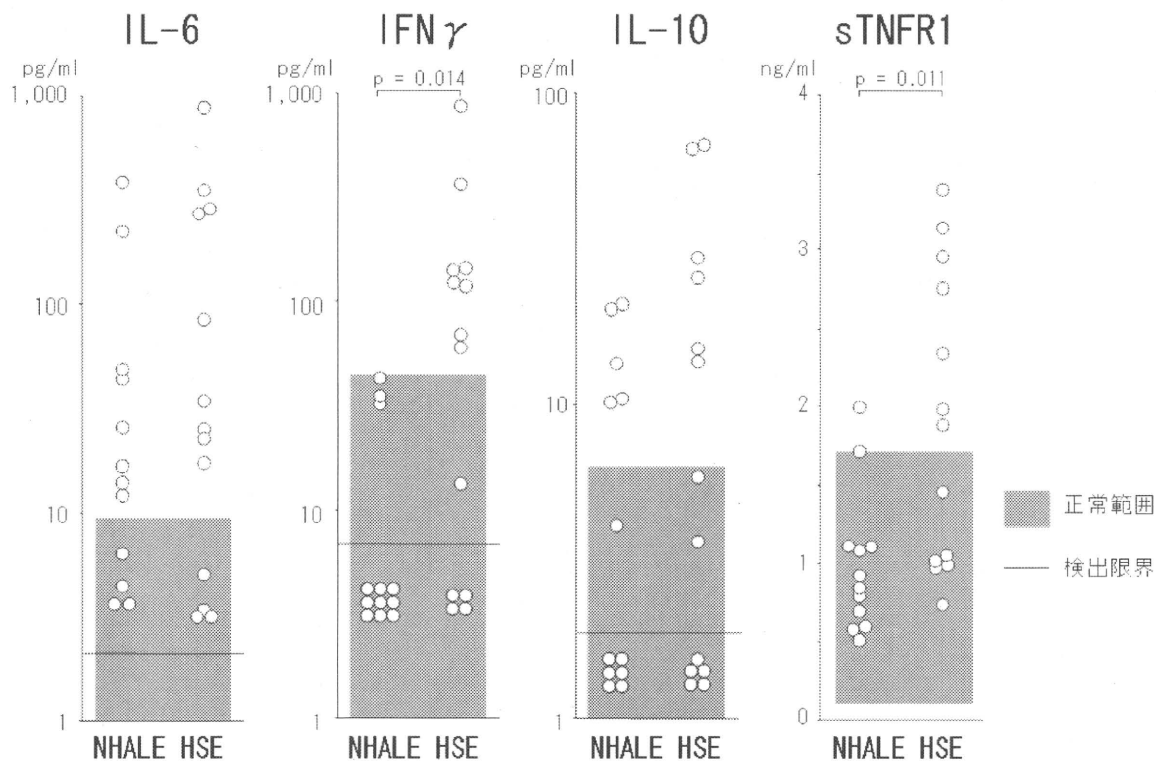
非ヘルペス性急性辺縁系脳炎・脳症 (NHAE) 12 例と、疾患コントロール群として単純ヘルペス脳炎 (HSE) 13 例について髄液サイトカイン解析の結果を示す。

B. 髄液サイトカインの測定方法

急性期に採取し凍結保存した髄液検体を用い、interferon γ (IFN γ)、tumor necrosis factor- α (TNF- α)、interleukin-2 (IL-2)、IL-4、IL-6、IL-10 を cytometric bead array で、soluble TNF receptor 1 (sTNFR1) を ELISA 法で測定した。

C. NHAE と HSE の髄液サイトカインプロフィール

NHAE 群の IL-6、IL-10 および HSE 群の IL-6、IL-10、IFN γ 、sTNFR1 値は非感染性非炎症性神経疾患(コントロール群)に比して有意に高値だった。NHAE 群と HSE 群の比較では、IFN γ 、sTNFR1 値が後者で有意に高値だった (IFN γ : $p = 0.014$; sTNFR1: $p = 0.011$)。IL-6、IL-10 値は両群間で有意差を認めなかった。TNF- α 、IL-2、IL-4 値は両群とも有意な上昇を認めなかった。



D. 考察

両者とも炎症性サイトカインである IL-6 と抗炎症性サイトカインである IL-10 の有意な上昇を認め、中枢神経系内での炎症の存在を示唆した。ウイルスの中枢神経系への直接侵襲であるウイルス性髄膜炎や HSE では髄液中 IFN γ の上昇を高頻度に認めるが、ウイルスの中枢神経系への直接侵襲ではないインフルエンザ脳症、溶血性尿毒症症候群脳症、急性散在性脳脊髄炎、けいれん重積型急性脳症などにおいて、髄液中 IFN γ の上昇がないことを報告しており、NHAE はウイルス主体の病態でないことが示唆された。組織障害性の強い炎症性サイトカインである TNF- α の真の生物学的活性

を示すとされる sTNFR1 値は画像上も組織破壊が顕著な HSE 群で上昇し、NHALE 群では上昇を認めなかった。NHALE 群で髄液 sTNFR1 値の上昇を認めなかったことは組織破壊が顕著でないことを示唆し、HSE 群に比し予後が良好なこととの関連が考えられた。

参考文献：

1. Asaoka K, Shoji H, Nishizaka S, Ayabe M, Abe T, Ohori N, Ichiyama T, Eizuru Y. Non-herpetic acute limbic encephalitis: cerebrospinal fluid cytokines and magnetic resonance imaging findings. *Intern Med* 2004; 43: 42-8.
2. Ichiyama T, Hayashi T, Furukawa S. Cerebrospinal fluid concentrations of soluble tumor necrosis factor receptor in bacterial and aseptic meningitis. *Neurology* 1996; 46: 837-8.
3. Matsubara T, Matsuoka T, Katayama K, Yoshitomi T, Nishikawa M, Ichiyama T, Furukawa S. Mononuclear cells and cytokines in the cerebrospinal fluid of echovirus 30 meningitis patients. *Scand J Infect Dis* 2000; 32: 471-4.
4. Ichiyama T, Maeba S, Suenaga N, Saito K, Matsubara T, Furukawa S. Analysis of cytokine levels in cerebrospinal fluid in mumps meningitis: comparison with echovirus type 30 meningitis. *Cytokine* 2005; 30: 243-7.
5. Ichiyama T, Shoji H, Kato M, Sawaishi Y, Ozawa H, Matsubara T, Furukawa S. Cerebrospinal fluid levels of cytokines and soluble tumor necrosis factor receptor in acute disseminated encephalomyelitis. *Eur J Pediatr* 2002; 161: 133-7.
6. Ichiyama T, Morishima T, Isumi H, Matsufuji H, Matubara T, Furukawa S. Analysis of cytokine levels and NF- κ B activation in peripheral blood mononuclear cells in influenza virus-associated encephalopathy. *Cytokine* 2004; 27: 31-7.
7. Ichiyama T, Suenaga N, Kajimoto M, Tohyama J, Isumi H, Kubota M, Mori M, Furukawa S. Serum and CSF levels of cytokines in acute encephalopathy following prolonged febrile seizures. *Brain Dev* 2008; 30: 47-52.
8. Shiraishi M, Ichiyama T, Matsushige T, Iwaki T, Iyoda K, Fukuda K, Makata H, Matsubara T, Furukawa S. Soluble tumor necrosis factor receptor 1 and tissue inhibitors of metalloproteinases-1 in hemolytic uremic syndrome with encephalopathy. *J Neuroimmunol* 2008; 196: 147-52.
9. Ichiyama T, Hayashi T, Nishikawa M, Furukawa S. Cerebrospinal fluid levels of soluble tumor necrosis factor receptor in acute encephalitis. *J Neurol* 1996; 243: 457-60.
10. Ichiyama T, Nishikawa M, Yoshitomi T, Hayashi T, Furukawa S. Tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β and interleukin-6 in cerebrospinal fluid from children with prolonged febrile seizures. Comparison with acute encephalitis/encephalopathy. *Neurology* 1998; 50: 407-11.
11. Ichiyama T, Isumi H, Ozawa H, Matsubara T, Morishima T, Furukawa S. Cerebrospinal fluid and serum levels of cytokines and soluble tumor necrosis factor receptor in influenza virus-associated encephalopathy. *Scand J Infect Dis* 2003; 35: 59-61.
12. Ichiyama T, Shoji H, Takahashi Y, Matsushige T, Kajimoto M, Inuzuka T, Furukawa S. Cerebrospinal fluid levels of cytokines in non-herpetic acute limbic encephalitis: comparison with herpes simplex encephalitis. *Cytokine* 2008; 44: 149-153.

資料 11. 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-

— 血清 metalloproteinase-9 (MMP-9) と tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) の動態 —

A. 検討対象

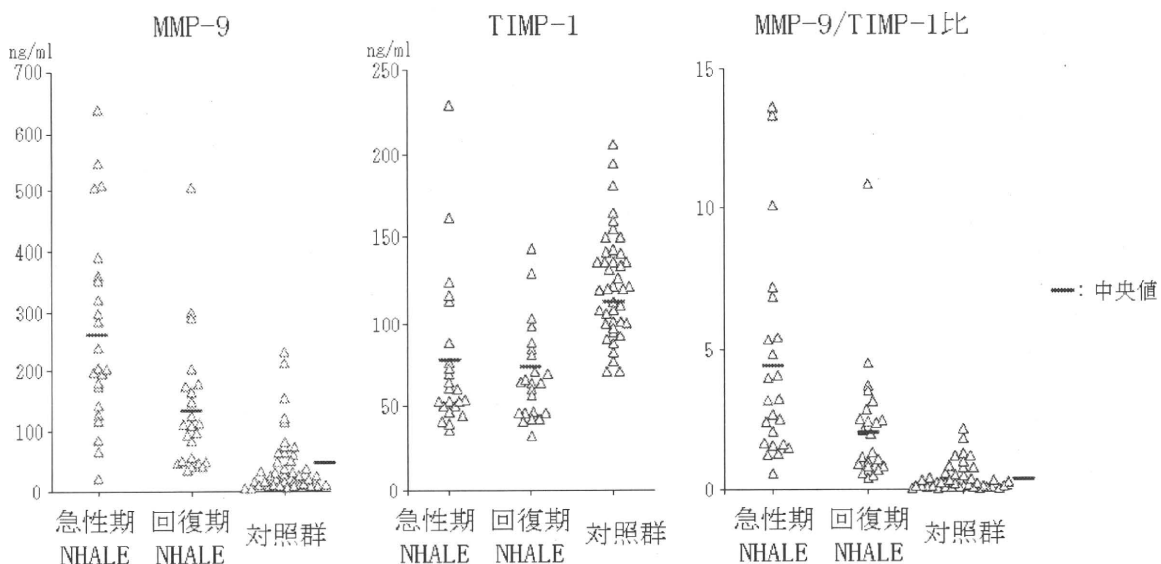
非ヘルペス性急性辺縁系脳炎・脳症 (NHALE) 23 例 (男性 6 例、女性 17 例; 15~79 歳、中央値 32 歳) と正常対照群として健康成人 41 例 (男性 5 例、女性 36 例; 15~78 歳、中央値 39 歳)。

B. 血清 matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) 及び tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) の測定

急性期および回復期 (21~247 病日、中央値 94 病日) における血清 MMP-9、TIMP-1 値を ELISA 法で測定した。

C. 血清 MMP-9 と TIMP-1 の動態

NHALE 群の急性期血清 MMP-9 値および MMP-9/TIMP-1 比は正常対照群に比し、有意に高値だった (ともに $p < 0.001$)。急性期血清 TIMP-1 値は正常対照群に比し、有意に低値だった ($p < 0.001$)。NHALE 群の回復期血清においても同様の傾向だった。NHALE 群の血清 MMP-9 値と MMP-9/TIMP-1 比は急性期に比し、回復期で有意に低下したが ($p = 0.004$, $p = 0.014$)、TIMP-1 値は有意差がなかった。



D. 考察

MMP-9 は脳の血管基底膜の主要構成成分であるコラーゲン IV を分解する。一方、TIMP-1 は MMP-9 活性を阻害する。従って血液脳関門に対し、MMP-9 は攻撃因子、TIMP-1 は防御因子である。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。血液脳関門機能の低下は末梢血中の免疫担当細胞の中樞神経系内への侵入を容易にし、中枢神経系内炎症を促進しやすい状態と考えられた。また急性期だけでなく回復期でも血清 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。

参考文献：

1. 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.

資料 12. 非ヘルペス性急性辺縁系脳炎・脳症の神経病理所見-20100728-

A. MRI で大脳に異常のみられない症例の剖検脳での所見(図 1)

1. 肉眼的には、大脳の表面や断面では明らかな異常はみられない。
2. ホルマリン固定パラフィン包埋切片でのヘマトキシリン・エオジン(H-E)染色では、海馬 CA1 領域を含め大脳皮質の神経細胞の変性・壊死像は目立たない(図 1A)。海馬領域を中心に小血管周囲にリンパ球浸潤がみられるが(図 1B 矢印)、出現しているリンパ球はB細胞優位と報告されている。
3. 海馬領域を含め、大脳皮質や基底核にはCD68 陽性のマクロファージが多数出現しているが(図 1C)、同部位には GFAP(glial fibrillary acidic protein)陽性の星状細胞の増生はほとんどない(図 1D)。
4. IgG の沈着がみられるが、補体の沈着はないと報告されている(文献 4)。

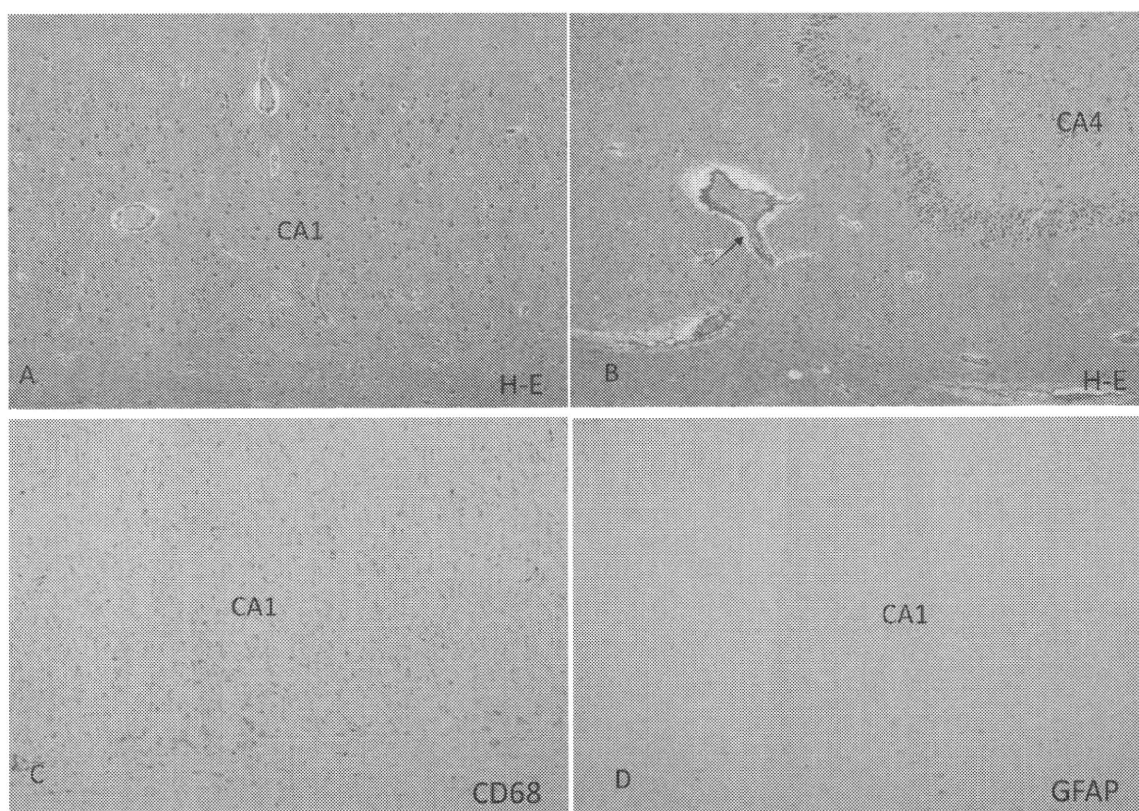


図 1. A-D: 海馬領域. A, C, D は隣接切片.

大脳, とくに海馬領域での広範なマクロファージの活性化と, 小血管周囲の軽度のリン球浸潤が主な所見であり, 神経細胞の変性・壊死像は目立たない.

B. MRI で辺縁系に病変がみられる症例の剖検例での所見(図 2)

1. 肉眼的には、大脳表面や剖面では明らかな異常はみられない。
2. 海馬領域では CA1 領域を中心に神経細胞の変性・壊死像，星状細胞の増生(図 2A)，小血管周囲の軽度のリンパ球浸潤がみられ，CD68 陽性のマクロファージの浸潤も著明である(図 2B)。
3. その他 MRI で病変のみられた部位にも星状細胞の増生，CD68 陽性のマクロファージの浸潤が多数みられる。

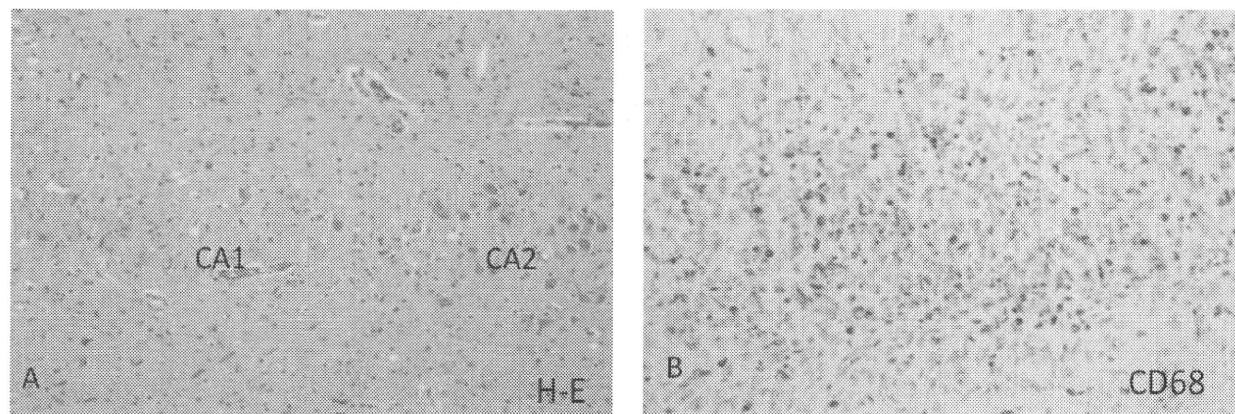


図 2. A と B は隣接切片。

比較的海馬の CA1 領域に局限した神経細胞の変性・壊死性病変，星状細胞の増生，CD 68 陽性のマクロファージの浸潤が主体である。CA2 領域の神経細胞は比較的好く残存しており，海馬の虚血性病変との類似性がみられ，けいれん重積による影響も否定できない。

参考文献

- 1) Mochizuki Y, Mizutani T, Isozaki E, Ohtake T, Takahashi Y: Acute limbic encephalitis: A new entity? *Neurosci Lett* 2006; 394: 5-8.
- 2) Okamoto K, Yamazaki T, Banno H, Sobue G, Yoshida M, Takatama M: Neuropathological studies of patients with possible non-herpetic acute limbic encephalitis and so-called acute juvenile female non-herpetic encephalitis. *Intern Med* 2008; 47: 231-236.
- 3) Maki T, Kokubo Y, Nishida S, Suzuki H, Kuzuhara S: An autopsy case with non-herpetic acute limbic encephalitis (NHALE). *Neuropathology* 2008; 25: 521-525.
- 4) Tüzün E, Zhou L, Baehring JM, Bannykh S, Rosenfeld MR, Dalmau J: Evidence for antibody-mediated pathogenesis in anti-NMDAR encephalitis associated with ovarian teratoma. *Acta Neuropathol* 2009; 118: 737-743.

資料 13. 非ヘルペス性急性辺縁系脳炎・脳症の予後 -20090620-

A. 検討対象：非ヘルペス性急性辺縁系脳炎・脳症 (NHALE)

抗 GluR 抗体測定目的で臨床情報ならびに血清・髄液などの検体送付を受けた急性脳炎・脳症関連 541 症例から、腫瘍合併例、再発例、慢性例、膠原病合併例、インフルエンザ脳症、単純ヘルペスウイルス PCR 陽性例などを除き、辺縁系症状で神経症状が始まった 15 歳以上の NPNHALE 86 例を対象とした。

B. 予後の判定方法

ADL 予後は Barthel score (20 点満点) (表 1) 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、表に示す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 (表 2)。スコアが満点でない場合を後遺症ありとした。

C. 後遺症の実態

ADL 障害は 33.3% に、てんかん発作は 36.2% に、精神症状は 26.3% に、知的障害は 39.7% に、運動障害が 31.0% に見られ、これらの後遺障害の頻度は約 30% であった。一方、記憶障害は 63.2% に見られ、他の障害に比べて高頻度であった。(ヘルペス脳炎では 30-40% の症例が社旗復帰できるとされている)

障害の程度をスコアの平均 (平均 \pm SD) (平均/満点%) で評価すると、ADL (20 点満点) = 17.8 \pm 4.7 (89%)、てんかん発作 (4 点満点) = 3.4 \pm 0.9 (85%)、精神症状 (2 点満点) = 1.7 \pm 0.6 (85%)、知的障害 (5 点満点) = 4.1 \pm 1.4 (82%)、記憶障害 (2 点満点) = 1.2 \pm 0.8 (60%)、運動障害 (3 点満点) = 2.5 \pm 0.9 (83%) であった。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、約 80% 程度のレベルに障害されているが、記憶は約 60% のレベルまで障害されており、成人 NHALE の後遺症では、記憶障害の頻度ならびに程度が、他の後遺症に比べて高度であることが特徴である。

表1. Barthel indexによる基本的ADL評価

合計20点満点

機能	各スコアと状態					
	0	1	2	3	4	5
1.排便	失禁・おむつ	とどき失敗(1週間に1回程度)	自立			
2.排尿	失禁、おむつ、またはカテテルが必要(カテテルを自分で処理できない)	とどき失敗(24時間に1回以下)	自立(1週間以上こわたり度も失敗がない)			
3.洗顔	洗顔、整髪、歯磨き、髭剃りに介護が必要	自立(用具の準備してもらってよい)				
4.便器の使用	全介助	部分介助	自立(下着を脱いだり下ろしたりできる、自分で拭ける、下着を上げたり着たりできる)			
5.食事	全介助(口の中まで運んでもらう、あるいはなかなか飲み込むことができない、経管栄養)	部分介助(おかずを細かく切ったり、バターをぬったり、その他食べやすいようにしてもらえば、自分で食べることはできる)	自立(食事は用意してもらってよい)			
6.起居・移乗	起居不能(座位バランスがとれない)	全介助だが、座位はとれる(1, 2人の介助を必要とする)	部分介助(1人で簡単に介助ができる、または監視・指示が必要)	自立(監視・指示なしに自分でベットから椅子に移れる、またはその逆も可能)		
7.歩行	歩行不可能	介助必要だが、曲がり角もうまく曲がれる	1人の介助で歩行可(監視・指示または身体を支えてもらう)	独歩可(補助具を使用してもよい、監視・指示は不要)		
8.更衣	全介助	介助必要だが、半分以上は自分でできる(ボタン・チャック等)	自立(ボタンかけ、チャック、紐を結ぶことなども可能)			
9.階段	不可能	介助必要(監視・指示・身体を支えてもらう、昇降装置を使用するなど)	昇降自立(歩行のための補助具を使用してもよい、監視・指示は不要)			
10.入浴	介助	自立(監視なしに浴槽に出入りでき、1人で体を洗える、監視・介助なしにシャワーが浴びられる)				

表2. てんかん発作・精神症状・知的障害・記憶障害・運動障害後遺症の評価基準

後遺症	各スコアと状態							
	0	1	2	3	4	5	6	7
てんかん発作	日単位：毎日発作がある	週単位：週に数回発作がある	月単位：月に数回発作がある	年単位：年に数回発作がある(数年に一回も含める)	発作はない			
精神症状	精神症状のため日常生活が自立困難	精神症状はあるが日常生活は自立可能	精神症状はない					
知的障害	最重度 (IQ/DQ < 19)	重度 (IQ/DQ = 20-29)	中等度 (IQ/DQ = 30-39)	軽度 (IQ/DQ = 40-49)	境界 (IQ/DQ = 50-59)	正常 (IQ/DQ ≥ 60)		
記憶障害	記憶障害のため日常生活が自立困難	記憶障害はあるが日常生活は自立可能	記憶障害はない					
運動障害	四肢麻痺	障害があるが自力移動可能(はいはい・低い歩きなど)	支えなく歩行できるが走れない	運動障害はない				

資料 14. 橋本脳症の臨床的特徴 -20100728-

[疾患概念]慢性甲状腺炎(橋本病)に伴う自己免疫性脳症

[発症年齢]平均 58 歳 (19~87 歳) (20 歳台と 50 歳台に二峰性のピーク)

[性差]男性：女性 1:2~3 (橋本病では 1:20)

[脳症発症時の橋本病の既往]2 割強

[臨床病型]

急性脳症型 7 割 (辺縁系脳炎含む)

慢性精神失調型 2 割

その他の病型 1 割 (慢性純粋小脳失調, クロイツフェルト・ヤコブ病類似病型)

[精神・神経徴候]

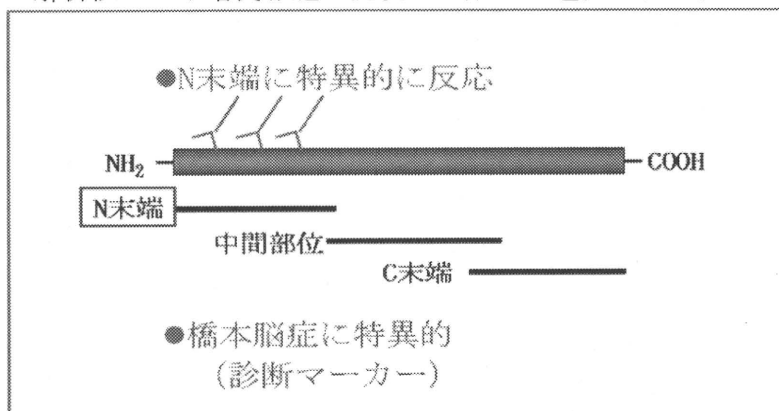
- ・出現し易い徴候：意識障害, けいれん, 認知症・精神症状, 振戦・ミオクローヌス
- ・出現しにくい徴候：末梢神経障害, 脊髄障害, 自律神経障害

[血液・髄液検査]

- ・抗甲状腺抗体：全例で陽性
- ・甲状腺機能：7 割は正常 (高度の機能低下・亢進は稀)
- ・髄液：半数で蛋白上昇. 細胞増多は稀

[抗 N 末端 α -エノラーゼ (NAE) 抗体]

- ・橋本脳症の 43%で陽性 (免疫学的多様性あり)
- ・疾患特異性は極めて高い (全長 α -エノラーゼに対する自己抗体は疾患特異性低い)
- ・解析法：ヒト培養細胞で発現・生成した遺伝子組み換え NAE を用いた免疫ブロット



[脳波]

異常頻度は極めて高い (9 割), 多彩な異常所見. 基礎波の徐波傾向が多いが, 鋭波や周期性突発波も出現)

[頭部 MRI]

異常頻度は低い (2 割程度). 時に, 血管炎, び慢性白質病変や辺縁系病変

[頭部血流 SPECT]

び慢性血流低下を呈することが多い(7 割)

[治療]

多くはステロイドが奏功する. 一部で, 免疫グロブリン大量療法や血漿交換が効果あり. ステロイド減量時の再燃予防のため免疫抑制剤 (アザチオプリンなど) の併用が一部で効果あり.

参考文献:

1. Yoneda M., et al., High prevalence of serum autoantibodies against the amino terminal of α -enolase in Hashimoto's encephalopathy. *J Neuroimmunol* 2007; 4; 185: 195-200.
2. 米田誠. 橋本脳症の診断と治療. *臨床とホルモン*2008; 56: 89-93.
3. 米田誠. Clinical Topic橋本脳症. *BIO Clinica* 2009; 24: 70-76.

〈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）
（総合）研究報告書

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

主任研究者 高橋 幸利

独立行政法人国立病院機構 静岡てんかん・神経医療センター臨床研究部長

研究要旨

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

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

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

【抗GluR ϵ 2抗体】成人NHALEでは、血清抗GluR ϵ 2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GluR ϵ 2抗体は急性期（51.8%）、回復期（41.4%）、慢性期（28.6%）と、徐々に陽性率が低下し、全例N末エpiteープを含んでいた。抗GluR ϵ 2抗体陽性NHALEの74.5%は15-34歳が占め、抗GluR ϵ 2抗体は主として若年成人の脳炎に関与していた。抗GluR ϵ 2抗体陽性NHALEの初発神経症状は、精神症状が主体で、抗GluR ϵ 2抗体陰性NHALEに比べてけいれんが有意に少なかった。抗GluR ϵ 2抗体陽性NHALEでは陰性NHALEに比べて、急性期症状のけいれん・けいれん重積の出現が遅く、髄液細胞数が多かった。

【若年女性に好発する急性非ヘルペス性脳炎（AJFNHE）】AJFNHEでは12例中8例で抗GluR ϵ 2抗体が陽性で、14例中4例で卵巣腫瘍との関連を確認、その一部はDalmauらの報告する卵巣奇形腫に合併する抗NMDA型GluR複合体抗体脳炎に包含された。

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

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

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

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

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

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

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

【結語】急性脳炎・脳症の中には、かなりの頻度で抗GluR ϵ 2抗体、抗VGKC抗体、抗NAE抗体などの自己抗体が陽性の脳炎・脳症が存在することが判明した。これらの自己抗体が陽性となる急性脳炎・脳症は、サイトカインなどの免疫機構が関与し、ステロイド治療が有効である共通性を持つことが分かり、早期診断・治療が望まれる。

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

分担研究者：

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

統括診療部・神経部長

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

研究協力者：

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

A. 研究目的

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

不能があると思われる (表1)。

表1. 急性 (亜急性) 脳炎・脳症の病態分類 (案)

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

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

我々は、グルタミン酸受容体 (GluR) ϵ 2に対する自己抗体を代表とする各種神経自己抗体と、サイトカイン、ウイルス因子、宿主因子等について研究を進め、自己免疫介在脳炎の診断法の確立、免疫学的な観点からの新たな脳炎治療法の確立につなげることは、大きな意義があると考えている (図1)。①ウイルス直接侵襲に分類される単純ヘルペス脳炎等では抗ウイルス剤による治療法があるが、多くの脳炎は対症療法的に治療されているのが現状で、病態に応じた治療法の確立が望まれている。

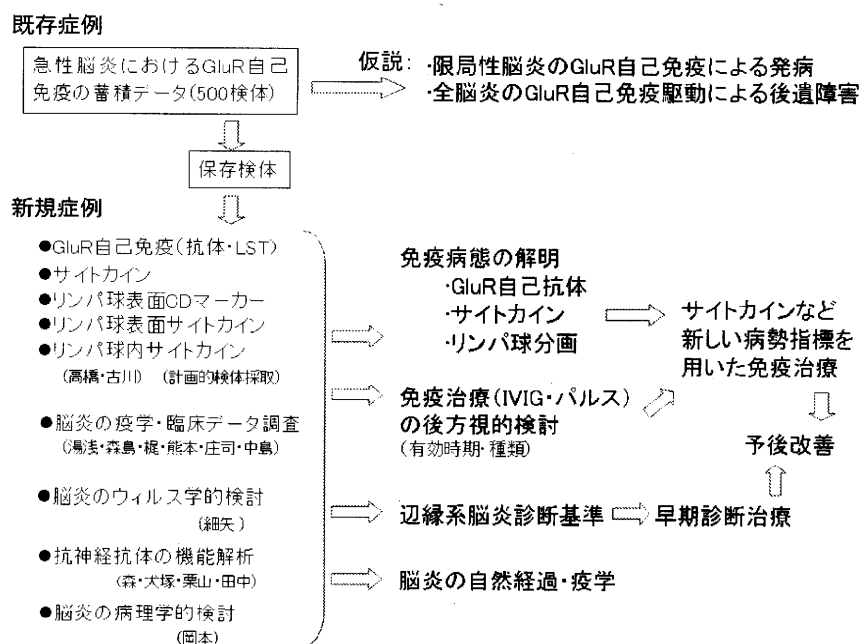


図1. 研究戦略

B. 研究方法

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

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

1. 急性辺縁系脳炎・脳症の多施設共同研究

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

自己抗体等の測定は表2に示すような施設で分担して行う。

2. 疫学研究

急性脳炎症状を呈する症例の日本における発生率、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、後方視的・前方視的疫学調査を行う。

成人症例の急性（亜急性）脳炎・脳症の発生率を把握するために、鳥取県の各地域（東部・

中部・西部）の11基幹病院神経内科に当研究班にて作成された診断登録基準（資料1）を送付し前方視的に調査を行う（分担：中島）。

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

表2. 研究班における自己免疫病態解析の分担

検査項目	分担施設
抗GluRε2・GluRδ2自己抗体	静岡てんかん・神経医療センター
傍腫瘍症候群関連自己抗体 抗Yo抗体、抗Hu抗体、抗Ri抗体、抗Ma-2抗体、抗CRMP-5抗体、抗amphiphysin抗体、等	新潟大学脳研究所神経内科
抗VGKC抗体	鹿児島大学神経病学
抗NAE抗体	福井大学第2内科
サイトカイン（IL-6、IFN γ 、等）	山口大学医学部小児科学 静岡てんかん・神経医療センター
サイトカインなどのRNA遺伝子発現	静岡てんかん・神経医療センター
ウィルス検出	藤田保健衛生大学小児科 福島県立医科大学小児科
HLA	静岡てんかん・神経医療センター

3. 病理研究

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

4. 新しい抗神経抗体・自己抗原の検索

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

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

5. 抗神経自己抗体の測定

① 抗GluRε2自己抗体の検討：

抗GluRε2・GluRδ2自己抗体はNIH3T3細胞中にてreverse tetracycline-controlled transactivator (rtTA)を用いた遺伝子発現系により合成したGluRε2・GluRδ2の全長蛋白を抗原として、自己抗体の有無を判定する（分担：高橋）。

抗GluRε2自己抗体のエピトープ解析は、GluRε2蛋白のN末の細胞外ドメイン（NT1）と、C末の細胞内ドメイン（CI-3）の3箇所をコードするDNAシークエンスを大腸菌発現ベクター-pGEXまたはpMALに組み込み、IPTG誘導により蛋白を合成させ抗原とし、測定する（分担：高橋）。

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

融合蛋白を抗原としたELISAで確定診断を行う（分担：田中）。

③ 抗VGKC抗体の検討：

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

④ 抗NAE抗体の検討

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

6. サイトカイン・ケモカインの役割の検討

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

傍腫瘍症候群では、Bio-Plex Suspension Array Systemを用いてIL-1b、IL-1ra、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12(p70)、IL-13、IL-15、IL-17、IP-10、Eotaxin、FGF basic、G-CSF、GM-CSF、IFN-γ、MCP-1 (MCAF)、MIP-1a、MIP1-b、PDGF-bb、Rantes、TNF-α、VEGFの各サイトカイン濃度を検討する。測定は、Human Cytokine 27-plex Premixed Kitのサイトカインスタンダードを、0、20、0.78、3.13、12.5、50、200、800、3200 pg/mlの8濃度について標準曲線を作成し、サンプルの蛍光値を外挿して計算する(分担:田中)。

7. ウィルスに関する検討

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

8. 単純ヘルペスウィルス型特異抗体測定法の開発

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

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

9. BBB機能(血清MMP-9・TIMP-1)の検討

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

10. CD4⁺CD25^{high}制御性T細胞(Treg)の検討

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

(倫理面への配慮)

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

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

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

C. 研究結果

1. 急性辺縁系脳炎多施設共同研究の立ち上げとその後の経過

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

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

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

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

表3. 多施設共同研究の立ち上げ

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

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

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

表4. 多施設共同研究の症例収集状況

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

2. 「急性辺縁系脳炎等の自己免疫介在性脳炎・脳症」の診断スキームの作成

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