

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

## Immunoblot による抗神経抗体検出の試み

研究分担者 奥村彰久 順天堂大学医学部小児科・准教授

### 研究要旨

近年、急性脳炎・脳症における自己抗体（抗神経抗体）の関与が注目されている。しかし、精密な抗神経抗体の検出は容易でなく、実施できる施設に限られる。我々は premade membrane を使う immunoblot を用いる簡便な方法で、抗神経抗体の検出を試みた。ヒト対照脳を用いた免疫組織化学染色にて抗神経抗体の存在が推定されている 4 例について、Immunoblot を施行した。その結果、3 例について過剰バンドを認め抗神経抗体の存在が示唆された。Immunoblot は感度には限界があるが、簡便で陽性反応的中率が高い可能性があり、抗神経抗体の検出方法の一つとして使用できると考えた。

### A．研究目的

近年、急性脳炎・脳症における自己抗体（抗神経抗体）の関与が注目されている。特に精神症状が特徴的である辺縁系脳炎については、いくつかの異なる抗神経抗体が関与することが明らかになりつつある。これらの自己抗体の検出には、培養細胞に標的となる抗原分子を発現させてそれに対する抗体を検出する方法が一般的である。この方法は生体内に近い条件で抗体の関与を評価することができるが、その実施は容易でなく実施できる施設は限られている。一方、premade membrane を使う immunoblot は抗神経抗体の簡便な測定に有用である可能性がある。我々は、premade membrane を用いて Immunoblot による抗体検出を試みた。

### B．研究方法

以下の 3 症例の急性期および遠隔期の血清について、抗神経抗体の検出を試みた。

症例 1：5 歳女児。急速に進行する舞蹈病・バリスムを 3 回反復し、いずれもステロイドパルス療法が有効であった。抗核抗体、Lupus anticoagulant、抗 ds-DNA 抗体、抗 RNP 抗体、抗 sm 抗体、抗 CLβ2GPI 抗体、抗基底核抗体は全て陰性。

症例 2：13 歳男児。亜急性に増悪するけいれん・意識障害・異常行動で発症し、辺縁系脳炎と診断された。

症例 3：11 歳女児。SLE で入院中に舞蹈様運動・アカシジアが出現し、ステロイドパルス療法が有効であった。

症例 4：5 歳男児。1 か月前から行動異常・

性格異常が出現した。その後をけいれん発作が出現し、徐々に1日10回以上まで増加した。脳血流SPECTにて前頭葉優位の血流増加を認め、自己免疫性脳炎と診断した。

Immunoblotは、ヒト脳組織由来のタンパクを電気泳動したpremade membraneを用いた。被験血清を50倍に希釈してincubationした後、Biotin-Streptoavidin法にて染色し判定した。

なお、4症例とも、ヒト対照脳を用いた免疫組織化学染色にて、抗神経抗体の存在が推定されている。

### C . 研究結果

図に結果を示す。

症例1・3・4では急性期および遠隔期の血清で矢印に示すような過剰なバンドが染色され、抗神経抗体の存在が示唆された。

症例2では通常染色される以外の過剰バンドを認めなかった。

### D . 考察

今回対象とした4例は、免疫組織化学染色の結果からは抗神経抗体を持っていた可能性がある。一方、Immunoblotでは3例に陽性と思われる所見を認めた。この結果は、Immunoblotは感度には限界があるが、陽性反応的中率は高い可能性があると思われた。抗神経抗体の証明には様々な測定法における再現性の確認が不可欠である。

Immunoblot単独による判定には限界があり、免疫組織化学染色などの複数の検出法を組み合わせる必要がある。

Immunoblotの利点としては、次のような点が考えられる。まず、特定のエピトープを標的としないため、未知のエピトープに対する抗体を検出し得る。また、抗体が単クローン性なのか、多クローン性なのか判別できる可能性がある。さらに、抗体が結合したタンパクの分子量をもとに、エピト

ープの同定ができる可能性がある。

### E . 結論

抗神経抗体の存在が推定される症例において、Immunoblotによる検出を試みた。Immunoblotの陽性率はあまり高くないと思われたが、他の方法にはない利点もあり抗神経抗体の検出方法の一つになり得ると思われた。

### F . 研究発表

#### 1 . 論文発表

Okumura A, Tsuji T, Kubota T, Ando N, Kobayashi S, Kato T, Natsume J, Hayakawa F, Shimizu T. Acute encephalopathy with 2009 pandemic flu: Comparison with seasonal flu. *Brain Dev* 2012; 34(1): 13-19.

Okumura A, Uematsu M, Imataka G, Tanaka M, Okanishi T, Kubota T, Sudo A, Tohyama J, Tsuji M, Ohmori I, Naiki M, Hiraiwa-Sofue A, Sato H, Saitoh S, Shimizu T. Acute encephalopathy in children with Dravet syndrome. *Epilepsia* 2012; 53(1): 79-86.

Miyata R, Tanuma N, Hayashi M, Imamura T, Takanashi J, Nagata R, Okumura A, Kashii H, Tomita S, Kumada S, Kubota M. Oxidative stress in patients with clinically mild encephalitis/encephalopathy with a reversible splenial lesion (MERS). *Brain Dev* 2012; 34(2): 124-127

Oikawa N, Okumura A, Oyama S, Baba H, Shimizu T, Kato A. A 15-month-old boy with reduced consciousness and convulsion. *J Clin Virol* 2012; 53(4): 276-279.

Hoshino A, Saitoh M, Oka A, Okumura A, Kubota M, Saito Y, Takanashi J, Hirose S, Yamagata T, Yamanouchi H, Mizuguchi M. Epidemiology of acute encephalopathy in Japan, with emphasis on the association of viruses and syndromes. *Brain Dev* 2012; 34(5): 337-343.

Hiraiwa-Sofue A, Ito Y, Mori H, Ichiyama T, Okumura A. Pertussis-associated encephalitis/encephalopathy with marked demyelination in an unimmunized child. *J Neurol Sci* 2012; 320(1-2): 145-148.

Hayashi N, Okumura A, Kubota T, Tsuji T, Kidokoro H, Fukasawa T, Hayakawa F, Ando N, Natsume J. Prognostic factors in acute encephalopathy with reduced subcortical diffusion. *Brain Dev* 2012; 34(8): 632-639.

Kato T, Okumura A, Hayakawa F, Tsuji T, Natsume J. Transient reduced diffusion in the cortex in a child with prolonged febrile seizures. *Brain Dev* 2012; 34(9): 773-775.

Kawashima H, Morichi S, Okumura A, Nakagawa S, Morishima T; collaborating study group on influenza-associated encephalopathy in Japan. National survey of pandemic influenza A (H1N1) 2009-associated encephalopathy in Japanese children. *J Med Virol* 2012; 84(8): 1151-1156.

Kawashima H, Morichi S, Okumura A, Nakagawa S, Morishima T; The Collaborating Study Group On Influenza-Associated Encephalopathy In Japan. Treatment of pandemic influenza A

(H1N1) 2009-associated encephalopathy in children. *Scand J Infect Dis* 2012; 44(12): 941-947.

## 2 . 学会発表

Akihisa Okumura, Tetsuo Kubota, Motomasa Suzuki, Tatsuya Fukazawa, Shinpei Abe, Mitsuru Ikeno, Mariko Hosozawa, Toshiaki Shimizu, Masaharu Hayashi. Autoimmune Encephalitis Proven by Immunohistochemical Study. 第 54 回日本小児神経学会総会、札幌、2012.5.17

Akihisa Okumura. Neonatal EEG in determining risk to the preterm brain. Joint congress of the 12th International Child Neurology Congress and the 11th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology, Brisbane, Australia, 2012.6.1.

奥村彰久、池野充、久田研、東海林宏道、清水俊明 . *TUBA1A* 変異による滑脳症・脳室拡大・小脳低形成の 1 剖検例 . 第 48 回日本周産期・新生児医学会学術集会、さいたま、2012.7.10.

奥村彰久 . 新生児および乳幼児の発作 - aEEG による評価 - . 第 46 回日本てんかん学会、東京、2012.10.10.

Akihisa Okumura, Keiko Shimojima, Tetsuo Kubota, Shinpei Abe, Shintaro Yamashita, Katsumi Imai, Tohru Okanishi, Hideo Enoki, Tatsuya Fukasawa, Takuya Tanabe, Toshiaki Shimizu, Toshiyuki Yamamoto. PRRT2 Mutation in Japanese Children with Benign Infantile Epilepsy. 第 46 回日本てんかん学会、東京、2012.10.11.

奥村彰久 . Hemorrhagic shock  
andencephalopathy . 第 595 回日本小児科  
学会東京都地方会講話会、東京、  
2012.10.13.

奥村彰久 . 新生児発作の神経画像所見 . 第  
7 回小児神経放射線研究会、京都、  
2012.10.27.

奥村彰久 . 小児急性脳症の脳波 . 第 17 回日  
本神経感染症学会総会、京都、2012.10.19.

奥村彰久 . 新生児および小児における  
amplitude-integrated EEG の臨床応用 . 第  
42 回日本臨床神経生理学会・学術大会、東  
京、2012.11.10.

Akihisa Okumura, Keiko Shimojima ,  
Tetsuo Kubota , Shinpei Abe, Shintaro

Yamashita , Katsumi Imai, Tohru Okanishi,  
Hideo Enoki, Tatsuya Fukasawa, Takuya  
Tanabe, Shino Shimada, Leanne M  
Dibbens, Toshiaki Shimizu, Toshiyuki  
Yamamoto. *PRRT2* Mutation in Japanese  
Children with Benign Infantile Epilepsy.  
The 16th Annual Meeting of American  
Epilepsy Society, San Diego, CA, USA ,  
2012.12.2.

## **G . 知的所有権の取得状況**

1 . 特許取得

なし

2 . 実用新案登録

なし

3 . その他

なし