

図 1. TBP-2KOEAE(♂)と EAE コントロール(♂)

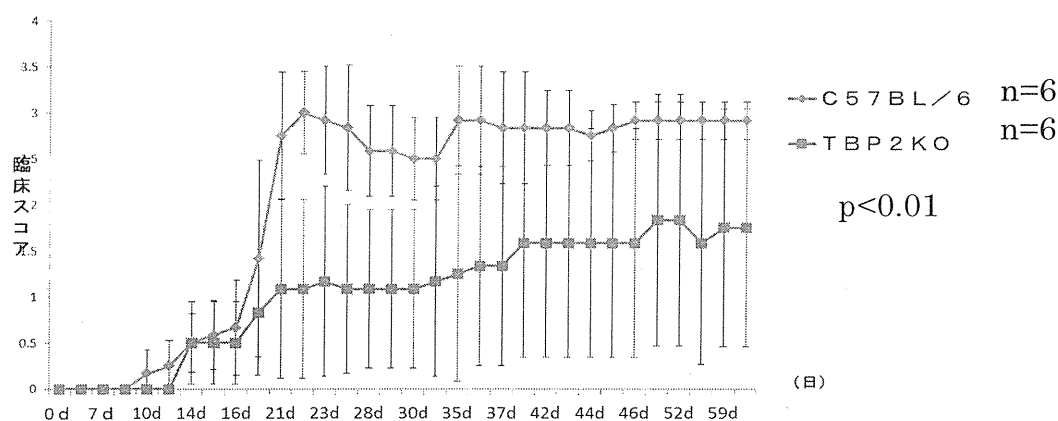


図 2. TBP-2KOEAE(♀)と EAE コントロール(♀)

図 1 : 雄マウスの TBP-2 KO では雄コントロールと比べ臨床スコアの有意な抑制を認めた($p < 0.05$)。

図 2 : 雌マウスの TBP-2 KO では雌コントロールと比べ臨床スコアの有意な抑制を認めた ($p < 0.01$)。

臨床症状が軽減した免疫学的機序を解明するために今後 Th1 細胞, Th2 細胞, Th17 細胞などの末梢血リンパ球サブセットならびにサイトカインと抗原提示細胞も含めた病理所見を検討する必要がある。

健康危険情報

なし

考察と結論

TBP-2KO マウス由来の樹状細胞は, 同レベルの MHC class II 抗原を発現するにもかかわらず, T 細胞の誘導能力は Wild type に比べて低下していると報告されている。(Son A et al. J Immunol 2008)

TBP-2KO マウスでは EAE の臨床症状が優位に抑制されてた一因は effector phase での T 細胞の誘導能力が低下したためと考えられる。

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

抗 GAD 抗体陽性小脳失調症： GAD65 ノックアウトマウスを用いた病因の生理学的検討

研究分担者 水澤英洋¹⁾

共同研究者 三苫 博²⁾、斎藤文仁³⁾、鈴木秀典³⁾、南里和紀⁴⁾

研究要旨

抗 GAD 抗体陽性小脳失調症は、抗 GAD 抗体が GABA の放出を阻害することで神経症状を発現すると考えられている。今回、我々は、抗 GAD 抗体の標的分子と GABA 放出障害の生理機構を明らかにすることを目的とし、GAD65 ノックアウトマウス (KO) とワイルドタイプマウス (WT) を用いたスライスーパッチクランプ法で、抗 GAD 抗体の作用を検討した。WT で見られた抗 GAD 抗体による抑制性シナプス伝達障害は、KO では消失していた。この結果は、抗 GAD 抗体は抑制性ニューロンの終末部の GAD を標的分子としていることを示唆する。

A. 研究目的

免疫的な機序によって発症する非傍腫瘍性の免疫性小脳疾患は、抗 GAD 抗体陽性小脳失調症、gluten ataxia、橋本脳症¹⁾ が知られている。これらは、50 歳以降に発症し、歩行失調を中心とする失調を示しながら、小脳の委縮の程度が軽く、免疫療法で改善する点が特徴である。また、それぞれ、抗 GAD 抗体、抗グリアジン抗体、抗甲状腺抗体という特異的な自己抗体が出現する。これらの抗体の中で、抗 GAD 抗体のみが病因として作用することが、現在確立している^{2,3)}。

つまり、抗 GAD 抗体は、ラット小脳のスライス標本において、小脳の抑制性ニューロンの終末部に作用し、GABA の放出を抑制する。さらに、抗 GAD 抗体をラットの小脳核に注入すると、小脳による大脳運動野への調節作用が消失する。

さらに、近年の研究により、抗 GAD 抗体は epitope 特異的に症状を発現することが明らかになっている。つまり、糖尿病にみられる抗 GAD 抗体と、Stiff-person 症候群・小脳失調症にみられる抗 GAD 抗体では、GAD 分子の認識部位が異なっている。また、Stiff-person 症候群と小脳失調症にみられる抗 GAD 抗体でも、GAD 分子の認識部位に若干の差があり、動物に注入した場合に発現する症状にも差があるという。

一方、その分子機構については未解決の問

1) 東京医科歯科大学大学院 神経脳機能病態

2) 東京医科大学 医学教育学

3) 日本医科大学 薬理学

4) 東京医科大学八王子医療センター神経内科

題も多い。抗 GAD 抗体が作用している標的分子は未だ明らかになっていない。さらに、抗 GAD 抗体が終末部に作用してから、GABA の放出が抑制されるまでの機序も、いまだ不明である。

そこで今回は、この終末部における分子機構を検討する目的で、GAD65 ノックアウトマウスを用いた解析を行った。

B. 研究方法

1 マウス

GAD6 ノックアウトマウス (KO) と、ワイルドタイプマウス (WT) を用いた。KO は GAD65 がノックアウトされているため、抑制性のシナプス伝達は GAD67 を用いて行われている。

2 抗体

抗 GAD 抗体陽性小脳失調症で見られる抗 GAD 抗体と、ほぼ同じ認識部位を持つモノクローナル抗体 b78 を利用した。

3 電気生理学的解析方法

日齢 14 日前後のラットから、200 μm の小脳スライス標本を作製し、スライスインプラック法による電気生理学的な解析を行った。すなわち、スライス標本を人工脳脊髄液で灌流しながら、顕微鏡下にプルキンエ細胞から whole-cell voltage clamp 法で記録を行い、周囲をガラス電極で微小刺激をして、抑制性介在ニューロンからの抑制性シナプス電流を誘発した。

あらかじめ、100 倍に希釈した b78 を約 7-8

分間投与し、抑制性シナプス後電流の振幅の変化を検討した。

(倫理面への配慮) 研究計画については、日本医科大学の倫理委員会に申請し、その承認を得た。

C. 研究結果

1 WT と KO の比較

モノクローナル抗体 b78 を投与して、IPSCs が、1) 80%以上振幅が減少するもの、2) その抑制作用が投与 3 分以内に出現し、20 分以上持続するものを responder cell、この基準を満たさないものを nonresponder cell と定義した。

WT では、14 例中 6 例が responder cell であったのに対して、GAD65 KO では、9 例中 responder cell は存在しなかった。

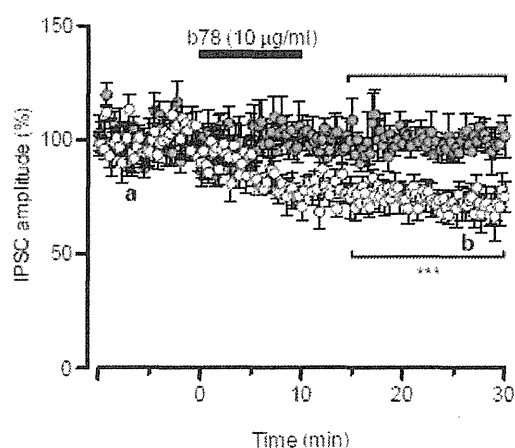


図 抑制性シナプス伝達に対するモノクローナル抗体 b78 の作用。WT (白丸) では抑制が起きたが、KO (黒丸) では作用は見られなかった。

2 放出機構における作用の検討

WTにおいて、miniature IPSCs (mIPSCs) に対する、b78 の作用を検討した。mIPSCs は自発的に放出される 1 つのシナプス小胞によって発生するシナプス後電流であり、放出過程の変化の指標として活用されている。

b78 を投与すると、mIPSCs の振幅は有意に低下し、さらに、放出頻度も有意に低下していた ($p < 0.01$)。

D. 考察

GAD65 ノックアウトマウスで抗 GAD 抗体が抑制性シナプス伝達に作用を示さなかったという結果は、抗 GAD 抗体の標的分子が GAD 分子であることを示唆する。一方、WT の mIPSCs に対し、抗 GAD 抗体はその振幅と頻度を減少させた。この結果は、抗 GAD 抗体により、シナプス小胞内の GAD が減少し、かつ、シナプス小胞の放出確率が低下することを示唆する。

近年の研究により、小脳プルキンエ細胞は、活動度依存性に抗体を取り込むことが明らかになっている。また、GAD は終末部の細胞質に存在するものに加え、シナプス小胞に結合しているものもあるという。今回の結果を併

せると、抗 GAD 抗体は抑制性ニューロンに取り込まれ、細胞質もしくはシナプス小胞に結合している GAD に、何らかの径路を介して結合すると考えられる。この結果、シナプス小胞への GABA の供給が低下し、さらに、シナプス小胞の放出も阻害されるのであろう。この二重の障害によって、抑制性ニューロンからの GABA の放出が低下し、小脳による運動中枢への制御が破綻し、小脳失調が発症すると考えられる。

D. 結論

抗 GAD 抗体は、GAD 分子を標的にし、GABA の合成と放出を阻害する。

E. 文献

- 1) 三苦博、水澤英洋.日本臨床 71; 921-6, 2013.
- 2) Mitoma H., et al. J Neurol Sci 208: 51-56, 2003
- 3) Mitoma H., et al..Brain Disord Ther 2; issue 2, 2013

健康危険情報：なし

知的財産権の出願・登録状況：なし

抗 NMDAR 抗体陽性脳炎の動物モデル作製と認知行動解析

研究分担者 松井 真¹⁾

共同研究者 田中恵子^{1) 2)}, 李 永智^{1) 2)}, 竹上 勉²⁾, 加藤伸郎³⁾

研究要旨

抗 NMDA 受容体抗体を生じる辺縁系脳炎 (抗 NMDAR 脳炎) は、意識障害・認知機能障害・けいれんなどを主症候とする自己免疫性脳炎である。抗体産生は疾患活動性と並行して推移し、抗体除去・産生抑制療法が有効であることから、抗体が本症の病態に直接的に関与している可能性が考えられてきた。しかしながら、抗体が中枢神経内で病態に関与するとの直接的証拠は得られていない。今回我々は患者髄液をマウスの脳内に慢性投与し、濃度依存的に認知機能を障害すること、マウス海馬領域で NMDAR 蛋白が減少すること、神経細胞の脱落やグリア増生、リンパ球浸潤は生じないことを明らかにした。このことより、抗 NMDAR 抗体は受容体機能を阻害するものの、神経細胞自体が保たれるため、本症の長期予後が良好である背景と考えられた。

研究目的

抗 NMDA 受容体抗体を生じる辺縁系脳炎 (抗 NMDAR 脳炎) では、意識障害・認知機能障害・けいれんなどが主症候であり、重篤な経過を辿るものの、長期予後は良好であることが多い。抗体産生は疾患活動性に平行し、抗体の除去または産生抑制療法が有効である。In vitro の実験系では、本症に生じる抗体が、培養海馬細胞の NMDA 受容体に endocytosis を生じさせ、受容体数を減じること、マウス海馬スライスでの長期増強誘導抑制に関わることが知られている。しかしながら、実際の神経症候に対し、直接的な関与があるかどうかは不明であった。今回我々は、マウス脳内に患者髄液を持続投与し、マ

ウスの行動に及ぼす影響を検討した。

研究方法

C57BL/6 雄マウス (8 週令) の側脳室内に、浸透圧ポンプを接続したカニューラを挿入し、以下の各検体を持続投与 (0.11 μ l/hr、計 28 日間) した。1) NMDAR 脳炎患者または非炎症性神経疾患の髄液 (1:1, 1:100, 1:200, 1:300, 1:500 の各濃度)、2) 患者または健常人由来血漿 IgG 分画 (20mg/ml)、3) IgG 分画+補体、4) PBS のみ、をそれぞれ 8 匹ずつ、計 15 グループのマウスに投与した。ポンプ挿入 6 日後から順次、1) Spontaneous locomotor activity (SLA)、2) Open field test (OF)、3) Novel object recognition test (NOR)、4) Morris water maze test (MWM) を用いた行動解を行なった。解析に関わる条件は各マウスで統一し、行動解析終了後は、

1) 金沢医科大学神経内科学

2) 金沢医科大学総合医学研究所

3) 金沢医科大学生理学 I

マウス脳組織について、形態学的、免疫組織染色および NMDAR NR1 の定量的解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は金沢医科大学臨床研究倫理審査委員会および動物実験に関わる審査委員会で承認され、患者へのインフォームド Consent のもと収集された検体を使用した。

研究結果

1) 高濃度の患者髄液 (1:1, 1:100) を投与したマウスは投与後 1-3 日ですべて死亡した。髄液 1:200 のマウスの一部でけいれんを生じたことから、以後の行動解析は 1:300, 1:500 に希釈した髄液を用いた。

2) SLA, OF, NOR については、患者髄液群、対照髄液群の間に有意な差を認めなかったが、MWM では、患者髄液群が記憶力評価課題において有意な低下を認めた。

3) すべてのマウスでカニューレが側脳室内に挿入されていることが確認できた。

4) 髄液、血漿 IgG とも、患者群、対照群の脳組織の HE 染色では、脳実質内に炎症細胞浸潤は見られず、神経細胞の脱落、グリアの増生、また補体やグロブリンの沈着は見られなかった。

5) 海馬領域の脳組織を用いた western blot での NR1 蛋白の定量では、患者髄液投与群で NR1 量が減少していた。

考察

NMDAR 脳炎は、記憶障害、興奮、痙攣などを主徴とし、数か月にわたる呼吸管理やけいれん抑制を必要とするものの、長期的には後遺症状を残さないほどに改善する例が多い。また、本症の剖検神経組織では、血管周囲性にリンパ球浸潤を

認める以外、組織破壊を伴う病変を生じない。今回、我々はマウス脳内に患者髄液を持続投与することにより、本症の主要症候である記憶力障害を生じることを明らかにした。また、症状を呈したマウスの脳組織では、神経細胞の変性や炎症細胞の浸潤は見られなかった。このことから、抗 NMDAR 抗体は、NMDAR を発現する細胞に、一定期間機能障害を生じるものの、抗体の消失とともに細胞機能が回復すると考えられ、この経過に抗体介在性の組織炎症反応が乏しいことが明らかになった。

結論

NMDAR 脳炎は、記憶力障害や痙攣を主徴とし、病勢に並行して抗 NMDAR 抗体が検出される。これまで、抗体の病態に関わる直接的意義は不明であったが、今回の検討で、抗体を含む患者髄液を用いて動物に認知行動障害を再現できたことにより、本抗体の病態における意義が明らかになった。

健康危険情報

なし

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

卵巣奇形腫非合併抗 *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体脳炎の抗原提示部位： ウシ未受精卵・卵巣における NMDA 受容体完全型の同定

研究分担者： 池田修一¹⁾

研究協力者： ○立花直子²⁾、木下通亨¹⁾、亀谷富由樹³⁾、田中恵子⁴⁾、小松洋太郎⁵⁾、
小林幸弘⁶⁾

研究要旨

卵巣奇形腫非合併女性例における抗 NMDAR 脳炎の抗体産生部位およびその機序を明らかにする目的で、ウシ卵巣とウシ未受精卵を用いて免疫組織化学的検索を行ったところ、正常のヒトおよびウシの原始卵胞の胞体内には抗 NR2B が発現していた。さらにウシ卵巣と未受精卵を用いて NMDAR 脳炎受容体タンパクの分離同定を試みると、ウエスタンブロット法では NR1, NR2B の陽性バンドが得られ、アミノ酸分析では NMDA 受容体の NR1、NR2A・2C のペプチドフラグメントが同定できた。また、ウシ未受精卵細胞膜の NMDA 受容体の免疫原性を蛍光抗体法で検討すると、同細胞膜には本症患者血清中の IgG が強く結合することが判明した。

以上の結果は正常卵細胞の細胞膜には NMDA 受容体がほぼ完全な形で存在し、抗原決定基としての生物学的作用を有していることを示している。すなわち、女性では抗原提示可能な NMD 受容体が中枢神経外の正常組織、卵巣に存在するといえる。これらの正常卵巣内の NMDAR 抗原が何らかの機序で提示されることで、本症が若い女性に好発すると推論される。

研究目的

抗 *N*-methyl-D-aspartate(NMDA)受容体脳炎は NMDA 受容体の NR1/NR2 ヘテロマーに対する抗体が出現することにより発症する自己免疫性辺縁系脳炎である。本症は卵巣奇形腫内の神経組織が抗原として提示され発症する傍腫瘍性症候群の一型であると強調されてきた。しかし 577 例を検討した Dalmau らの報告によると、

本症女性例の約 6 割は脳炎発症時に卵巣奇形腫を伴っていない。このような卵巣奇形腫非合併患者における NMDA 受容体抗原の提示部位を明らかにする目的で、我々は正常のヒト・ウシ卵巣を免疫組織化学的に検索し、正常のヒト・ウシの原始卵胞内に NMDA 受容体関連タンパクが存在することを示してきた。今回、ウシ卵巣とウシ未受精卵を用いて NMDA 受容体タンパクを分離同定し、さらにウシ未受精卵の細胞表面における NMDA 受容体の発現を検討したため報告する。

1) 信州大学脳神経内科、2) 市立岡谷病院神経内科、
3) 東京都医学総合研究所 認知症高次機能研究分野 認知症プロジェクト 4) 金沢医科大学神経内科 5) 長野県畜産試験場 6) 信州大学医学部臨床検査部

研究方法

対象として剖検で得られたウシ 5 頭(年

齢2~6歳)の正常卵巣、ウシ未受精卵 1031 個を用いた。

方法は以下に示すとおりである。

1.ウシ卵巣およびウシ未受精卵内の NMDA 受容体タンパクの同定

ウシ卵巣と未受精卵をそれぞれ PBS 溶液でホモゲナイズし遠心分離。沈殿分画をさらに RIPA 溶液でホモゲナイズし遠心上清を NMDA 受容体サブユニットの各抗体で免疫沈降した。得られた沈降物を用いウエスタンブロッティングを行った。

2.ウシ未受精卵内 NR1・NR2A・NR2B・NR2C タンパクのペプチド分析

1と同様にウシ未受精卵を準備し、沈降物をトリプシン消化した後、液体クロマトグラフィー質量分析器で分析した。

3.ウシ未受精卵細胞表面の NMDA 受容体の発現の検討

ウシ未受精卵と抗 NMDA 受容体脳炎患者の血清 IgG を反応させ、両者の親和性を免疫蛍光抗体法で検討した。

研究結果

1.および 2.

ウエスタンブロット法で NR1・NR2B 各サブユニットと考えられる陽性バンドが得られ (Fig.1)、液体クロマトグラフィー質量分析器では NMDA 受容体の遺伝子情報と一致する、NR1・NR2A・NR2B・NR2C のペプチドフラグメント (NR1 593-599 : SPFGRFK、869-874:KNLQDR、NR2A 339-348 : GVEDALVSLK、NR2B 1421-1429 : QPTVAGAPK、NR2C 817-823 : NEVMSSK) が同定できた (Fig.2,3)。

3.ウシ未受精卵は抗 NMDA 受容体脳炎患者の高力価の血清 IgG と強く反応し、細胞

膜表面に抗 NMDA 受容体が発現していることが示唆された (Fig.4)。

考察

抗 NMDAR 脳炎は、当初、卵巣奇形腫を高率に合併することが強調され、そして同腫瘍内の中枢神経組織に含まれる NMDAR 関連蛋白が抗原としてはたらき本症を発症するとして、傍腫瘍症候群と位置付けられていた。しかし最近の検索では、本症の 80%が女性に発症するものの、卵巣奇形腫の合併率は 40%であり、本症の発症機序を卵巣奇形腫に伴う傍腫瘍性と位置づけることは困難である。

本症の発症患者が生殖年齢の女性に偏っているという事実から、我々は卵巣奇形腫非合併例においても卵巣および生殖機能などが本症発症に関係しているのではないかと推論し、特に正常卵巣にも注目して一連の検索を行ってきた。

これらの検索で示されたのは、

1.ウシ未受精卵には NMDA 受容体を構成する NR1・NR2A・NR2B・NR2C 各サブユニットのタンパクが完全型として存在する、2.それらのサブユニットは NMDA 受容体の形で未受精卵の細胞膜表面に発現し、抗原決定基としての生物学的作用を有している、ということである。

これまで抗 NMDA 受容体脳炎の抗原提示部位は卵巣奇形腫内の神経組織または脳内とされてきたが、正常卵巣に NMDA 受容体の発現が示されたことから、本症女性例では卵巣奇形腫の合併・非合併を問わず卵巣における何らかの刺激が抗原提示を誘発し抗 NMDA 受容体抗体の産生、脳炎の発症につながると考えられた。

結論

抗NMDA受容体脳炎女性例では、卵巣に対する何らかの刺激が卵巣自体のNMDA受容体を抗原として提示し発症する可能性が示され、卵巣に起源をもつ自己免疫性シナプス脳炎と捉えることができると考えられた。

文献

- 1) Florance NR, Davis RL, Lam C, et al. Anti-N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) encephalitis in children and adolescents. *Ann Neurol* 2009 ; 66:11-8
- 2) Dalmau J, Gleichman A, Hughes EG, et al. Anti-NMDA-receptor encephalitis: case series and analysis of the effects of antibodies. *Lancet Neurol* 2008 ; 7:1091-8
- 3) Eker A, Sake E, Dalmau J, et al. Testicular teratoma and anti-N-methyl-D-aspartate receptor associated encephalitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008 ; 79 : 1082-3
- 4) Novillo-Lopez ME, Rossi J, Dalmau J, et al. Treatment-responsive encephalitis and NMDA receptor antibodies in man. *Neurology* 2008;70:728-9
- 5) Nishimura T, Miki K, Ogawa K, et al. Pathogenesis of aseptic acute non-herpetic encephalitis: young adult female patients with acute non-herpetic encephalitis who presented with severe prolonged coma, but achieved a good recovery. *Neuroinfection* 1997;2: 74-6 (in Japanese).
- 6) Dalmau J, Tüzün E, Wu HY, et al. Paraneoplastic Anti-N-methyl-D-Aspartate receptor encephalitis associated with ovarian teratoma. *Ann Neurol* 2007; 61:25-36
- 7) Iizuka T, Sakai F, Ide T, et al. Anti-NMDA receptor encephalitis in Japan: long-term outcome without tumor removal. *Neurology* 2008; 70: 504-11
- 8) Dalmau J, Lancaster E, Martinez-Hernandez E, et al. Clinical experience and laboratory investigations in patients with anti-NMDAR encephalitis. *Lancet Neurol* 2011; 10:63-74
- 9) Kamei S, Kuzuhara S, Ishihara M, et al. Nationwide survey of acute juvenile female non-herpetic encephalitis in Japan: relationship to anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis. *Intern Med* 2008;7:1091-8
- 10) Tachibana N, Shirakawa T, Ishii K, et al. Expression of various glutamate receptors including N-Methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) in an ovarian teratoma removed from a young woman with anti-NMDAR encephalitis. *Intern Med* 2010; 49:2167-2173
- 11) Irani SR, Bera K, Waters K, et al. N-methyl-D-aspartate antibody encephalitis : temporal progression of clinical and paraclinical observation in a predominantly non-paraneoplastic disorder of both sexes. *Brain* 2010;133: 1655-67
- 12) Tojo K, Nitta K, Ishii W, et al. A young man with anti-NMDAR encephalitis following Guillain-Barré syndrome. *Case Rep Neurol* 2011; 3:7-13
- 13) 立花直子、有馬邦正、池田修一: 抗NMDA受容体脳炎に合併した卵巣奇形腫と正常卵巣におけるNMDA受容体の分布. *最新医学*, 2011; 66:967-972
- 14) Titulaer MJ, McCracken L, Gabilondo I et al. Treatment and prognostic factors for long-term outcome in patients with anti-NMDA receptor encephalitis: an observational cohort study. *Lancet Neurol* 2013; 12: 157-165

15) Tachibana N, Kinoshita M, Saito Y, et al.
Identification of *N*-methyl-D-aspartate
receptor (NMDAR) related epitope,
NR2B, in the normal human ovary:
implication for the pathogenesis of
anti-NMDAR encephalitis. *Tohoku J Exp
Med* 2013; 230: 13-16

健康危険情報

なし

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

Fig.3 LC-MS/MSを用いたウシ未受精卵細胞膜の
NMDA受容体タンパクの分析(2)

NR2サブユニット

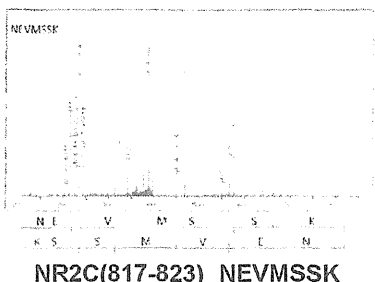
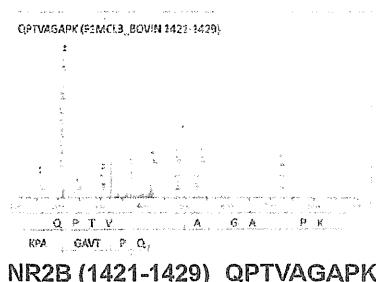
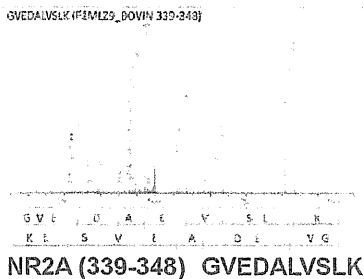


Fig.4 ウシ未受精卵と患者血清・髄液IgGを用いた
immunofluorescence analysis

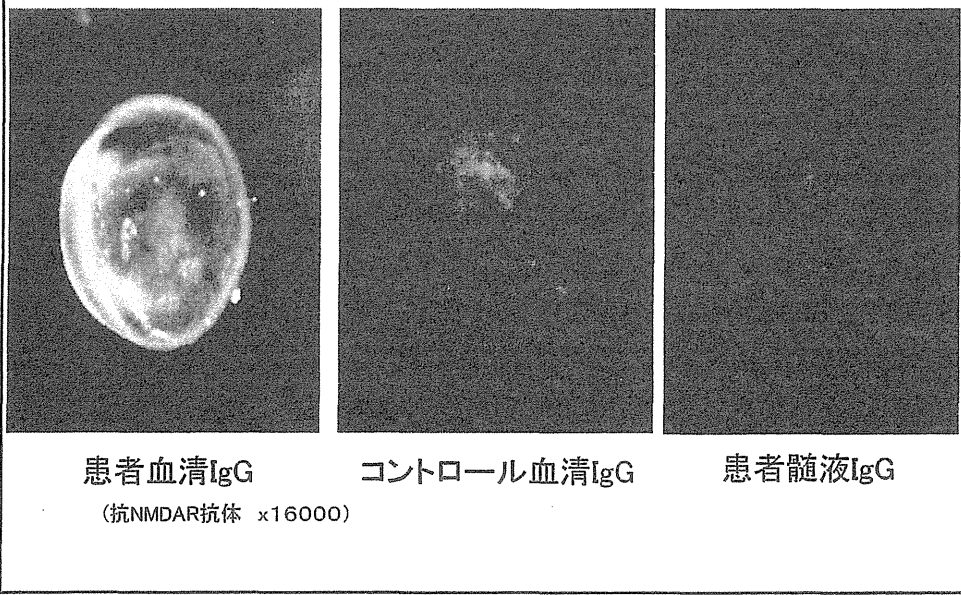


Fig.1 NMDA受容体タンパクのimmunoblotting 法による解析結果

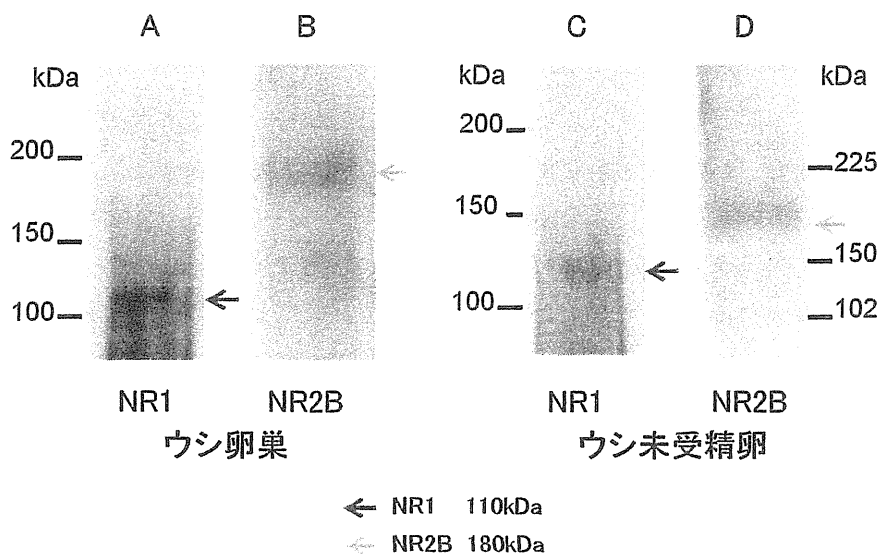
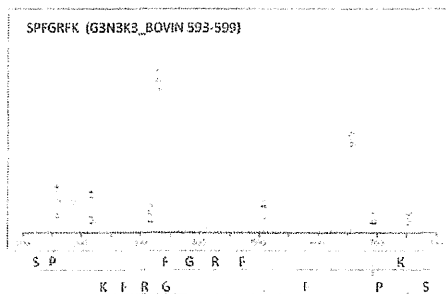
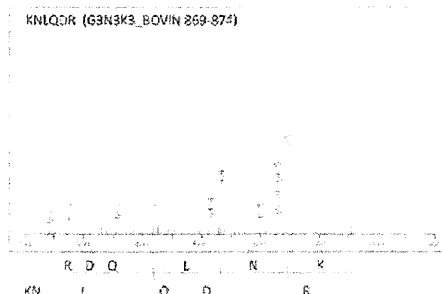


Fig.2 LC-MS/MSを用いたウシ未受精卵細胞膜の NMDA受容体タンパクの分析 (1)

NR1サブユニット



(593-599) SPFGRFK



(869-874) KNLQDR

辺縁系脳炎型橋本脳症の臨床的特徴

研究協力者 米田 誠¹⁾

共同研究者 松永晶子²⁾、岸谷 融²⁾、村松倫子²⁾、井川正道²⁾

研究要旨

これまでに我々は、橋本脳症患者では、患者血清中に NH₂ 末端 α -enolase 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。また、国内外の多数例の橋本脳症の臨床・免疫学的検討より、橋本脳症の一部に辺縁系脳炎型が占めることが明らかとなった。

辺縁系脳炎型橋本脳症は、他の非ヘルペス性辺縁系脳炎と同様に、情動・記憶障害を主とした辺縁系症状を呈し、頭部 MRI で側頭葉内側に異常所見を呈するが、脳波の徐波化を伴い、発症経過により臨床症状の差異を認めた。ただし、治療開始時期に関わらず良好な治療反応性を示すため、非ヘルペス性辺縁系脳炎の鑑別疾患として、治療可能な橋本脳症の可能性を念頭に置く必要があると考えられた。

更に、辺縁系脳炎型橋本脳症患者血清中に海馬ニューロンに反応する抗体が存在することが明らかとなった。

研究目的

「辺縁系脳炎型」橋本脳症の臨床的特徴を明らかとし、他の原因による辺縁系脳炎と比較する。更に、患者血清中の自己抗体の海馬組織への免疫反応性を検討する。

研究方法

(1) 対象症例

当施設に抗 NAE 抗体解析の依頼があった症例より、精神・神経症状を有し、抗甲状腺抗体 (抗 TG 抗体や抗 TPO 抗体) 陽性、抗 NAE 抗体陽性、頭部 MRI 検査で辺縁系に異常信号を呈し、ステロイドなどの免疫療法に反応性を示した橋本脳症 14 症例を対象とした。また、他の原因が除外された症例とした。

¹⁾ 福井県立大学看護福祉学部

²⁾ 福井大学医学部第二内科 (神経内科)

年齢：58.6±18.7 歳。

性別：男性 4 例，女性 10 例。

入院までの期間：29.7 日 (3 日 - 4 か月)。

(2) 方法

1) 免疫ブロット：N 末端側の α -enolase (1-157 アミノ酸) cDNA をヒト由来培養細胞 (HEK293) に導入し、組換え蛋白として精製。免疫ブロットにより 320 倍希釈の患者血清を用いて自己抗体の有無を検討した。また、血清を倍々希釈し、抗体価を検討した。

2) 臨床徴候の解析：発症様式、臨床徴候、検査・画像所見、免疫療法に対する反応性等を後方視的に解析した。

発症様式毎で比較検討を行った。統計処理は χ^2 検定を用い、 $p < 0.05$ を有意とした。

3) 患者血清中の自己抗体の海馬組織への免疫反応性の免疫蛍光組織染色による検討

ラット海馬スライスを用いて、一次抗体：患者血清（1:100）、抗 Neurofilament 抗体（1:100）、二次抗体：抗ヒト IgG 抗体、抗マウス IgG 抗体 で検討。

（倫理面への配慮）

本研究は福井県立大学および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、プライバシー保護には十分に配慮した。

研究結果

（1）抗 NAE 抗体免疫ブロット

14 例全例で抗 NAE 抗体 陽性
抗体価 x320～x40,960

（2）臨床徴候

- ・発症から治療開始までの期間：急性（～2 週間） 7 例、亜急性（2 週間～4 か月） 7 例。
臨床症状：意識障害 8 例（急性 7 例/亜急性 1 例、以下 急性/亜急性）、痙攣 6 例（5 例/1 例）（全般発作 5 例、部分発作 1 例）、
・精神症状 7 例（1 例/6 例）、記憶障害 9 例（2 例/7 例）。
- ・検査所見：髄液細胞数上昇 7 例（正常 6 例）、髄液蛋白上昇 7 例（正常 6 例）、脳波徐波 12 例（1 例正常）。
- ・頭部 MRI 側頭葉内側異常信号 14 例。
- ・治療反応性：著効（後遺症なく改善） 5 例、中等度（軽度の後遺症あり） 5 例、軽度 3 例、自然軽快 1 例。再発：4 例
<臨床経過の違いによる臨床像の比較>
- ・意識障害とてんかん全般発作は、急性経過例で有意に多かった（ $p < 0.01$, $p < 0.05$ ）。
- ・精神症状と記憶障害は、亜急性経過例で有意に多かった（ $p < 0.05$, $p < 0.01$ ）。

（3）免疫蛍光組織染色

患者血清はラット海馬ニューロンの核周囲に一部反応した。

（4）結果のまとめ

- ・急性経過例と亜急性経過例を同数認めた。
- ・意識障害とてんかん全般発作は全体の半数にみられ、ほとんどが急性経過例であった。
- ・精神症状は全体の約半数にみられ、大部分が亜急性経過例であった。
- ・髄液細胞数増多と脳波異常を認める例が多かった。
- ・急性・亜急性経過ともに免疫療法が奏効した。
- ・患者血清中に海馬ニューロンに反応する抗体が存在した。

考察および結論

抗 NAE 抗体陽性辺縁系脳炎型橋本脳症は、橋本脳症は、辺縁系脳炎の鑑別疾患として重要である。また、急性・亜急性の経過に関わらず免疫療法が奏効し、予後も良好である。

患者血清中に海馬ニューロンに反応する自己抗体が存在する。

文献

Ishitobi M, Yoneda M, et al. Hashimoto's encephalopathy with hippocampus involvement detected on continuous arterial spin labeling. Psychiatry Clin Neurosci. 2013;67:128-9

健康危険情報

なし

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

小脳失調症 49 例における自己抗体陽性率、免疫治療効果についての検討

研究分担者 水澤英洋¹⁾

共同研究者 三苫 博²⁾、南里和紀³⁾

研究要旨

小脳失調症の中には自己免疫性小脳失調症が含まれており免疫治療有効例が多数報告されている。我々は、皮質性小脳失調症の患者において抗 GAD 抗体、抗甲状腺抗体、抗グリアジン抗体を測定、また HLA-DR タイピング検査を行い、陽性率、免疫治療の効果について検討した。49 例中 9 例（18,4%）が抗グリアジン抗体陽性であり 5 例に免疫治療が有効であった。抗 GAD 抗体陽性は 6 例（12,2%）であり 3 例に大量免疫グロブリン治療を行い 2 例に有効であった。抗甲状腺抗体単陽性患者は 10 例（20,4%）で 7 例に免疫治療を行い 3 例に有効であった。HLA タイピング検査を行った 28 人中 14 人（50%）が DR4 陽性で自己抗体陰性の DR4 陽性女性例に免疫治療が有効であった。自己免疫性小脳失調症の診断については自己抗体、HLA 体位ピング検査が有用と考えられた

A. 研究目的

小脳失調症には治療可能な様々な原因の疾患が含まれている。近年、その原因の 1 つとして自己免疫性小脳失調症、つまり、抗 GAD 抗体陽性小脳失調症¹⁾ 小脳失調型橋本脳症²⁾、グルテン失調症（抗グリアジン抗体陽性小脳失調症）³⁾ が報告されている。

本研究の目的は、小脳失調症患者における抗 GAD 抗体、抗グリアジン抗体、抗甲状腺抗体陽性率、またグルテン失調症患者で HLA-DQ2

に次いで保有率が高いといわれている HLA-DR4 用成立について検討し、小脳失調症患者における自己免疫病態の関与を明らかにすることである。

B. 研究方法

2005 年以降に当院を受診した緩徐進行性小脳失調症患者のうち、voxel-based morphometry を含む MRI 検査で小脳萎縮、SPECT にて小脳血流低下を確認できた患者のうち、多系統萎縮症、遺伝性脊髄小脳変性症、担癌患者、フェニトイン内服

1) 東京医科歯科大学大学院 脳神経病態学

2) 東京医科大学 医学教育学

3) 東京医科大学八王子医療センター神経内科

患者を除いた 49 例を対象とした。

自己抗体測定については、抗 GAD 抗体、抗グリアジン抗体、抗甲状腺抗体を測定した。また、HLA-DR タイピング検査を行った。

免疫治療の効果については、ICARS の姿勢歩行障害の項目で 2 点以上改善し、その効果が 1 か月以上持続し、かつ患者本人・家族が有効と治療効果判断した場合に、免疫治療有効と判定した。

C. 研究結果

49 例中 9 例 (18.4%) が抗グリアジン抗体陽性であった。陽性例 9 例中 5 例は IgA のみが陽性となり、1 例は IgG、IgA ともに陽性、IgG のみ陽性は 3 例であった。9 例中 5 例に大量免疫グロブリン治療 (IVIg) を行ったが、1 例は著効、3 例は有効、1 例は無効であった。4 例にステロイド治療を行ったが 1 例に失調症状の改善を認め、1 例は免疫吸着療法が有効であった。1 例は無グルテン食により失調症状が改善した。

抗 GAD 抗体陽性は 6 例 (12.2%) であった。3 例に IVIg を行い 2 例に有効であった。有効例 1 例は、徐々に有効性が低下し、歩行不能となったが、他 1 例は 1 回の治療のみで緩解を長期に維持し、抗 GAD 抗体は徐々に低下してきている。

抗甲状腺抗体は 13 例 (26.5%) で陽性であり、うち 3 例は抗グリアジン抗体も陽性であった。抗 GAD 抗体・抗グリアジン抗体陰性の抗甲状腺抗体陽性患者は 10

例 (20.4%) で、うち 7 例に免疫治療を行ったが 3 例 (42.9%) に有効であった。

HLA タイピングについては、検査を行った 28 人中 14 人 (50%) が HLA-DR4 陽性であった。自己抗体がすべて陰性の HLA-DR4 陽性 60 歳女性例に免疫治療を行ったが、ステロイド治療、IVIg により、失調性歩行、構音障害の改善を認め、10 ヶ月間改善を維持している。

自己抗体陽性小脳失調症 19 例に免疫治療を行い 10 例 (52.6%) に有効であった

D. 考察

Hadjivasilliou らは、孤発性失調症患者の病因について検討し、37%がグルテン失調症であり、抗 GAD 抗体陽性失調症は 2.6%であった。そして、特発性孤発性失調症の 47%が自己免疫疾患を有し、60%が抗小脳抗体陽性であったことから、孤発性小脳失調症の原因として、自己免疫病態の関与の重要性を報告している⁴⁾。

我々の検討においても、49 例中 24 例 (49%) と約半数で抗 GAD 抗体、抗グリアジン抗体、抗甲状腺抗体のいずれかが陽性であり、免疫治療が抗グリアジン抗体陽性患者 9 例中 5 例、抗 GAD 抗体陽性患者 3 例中 2 例、抗甲状腺抗体陽性患者 7 例中 3 例に有効で自己抗体陽性小脳失調症 19 例中 10 例で有効であったことから、小脳失調症患者には自己免疫病態の患者が含まれ免疫治療により改善が期待できることが示唆された。

グルテン失調症の診断では HLA-DQ2 の疾患感受性が重要視されている。そし

て、HLA-DQ2 陰性例のほとんどが HLA-DR4 陽性であると報告されている⁵⁾。本邦において HLA-DR4 は、原田病 (陽性率 93%)⁶⁾、自己免疫性肝炎 (陽性率 88.7%)⁷⁾、関節リウマチ⁸⁾ などの自己免疫疾患との関連が強く、1 型糖尿病や多腺性自己免疫症候群⁹⁾ との関連も報告されている。本邦における HLA-DR4 の健常人の陽性率は 30~44%¹⁰⁾ と報告されているが、我々の検討では 28 例中 14 例 (50%) が陽性であった。また、自己抗体陰性で HLA-DR4 陽性であった 60 歳女性例にステロイド・IVIg 治療を行い有効であったことから、自己免疫性小脳失調症の診断については自己抗体の検索のみではなく HLA タイピングについても検討していく必要があると考えられた。

E. 結論

今回の検討では、原因不明小脳失調症の約半数に小脳失調症に関連するといわれる自己抗体が陽性であり、それら自己抗体陽性例の約半数で免疫治療が有効であったことから、小脳失調症の診療における自己免疫性小脳失調症の診断の重要性が示唆された。また、HLA タイピングについても診断に有用である可能性がある

F. 文献

- 1) Matsunaga A, Ikawa M, Fujii A, Nakamoto Y, Kuriyama M, Yoneda M. Hashimoto's encephalopathy as a treatable adult-onset cerebellar ataxia mimicking spinocerebellar degeneration. *Eur Neurol*, 2013; 69, 14-20.
- 2) Ohyagi M, Ohkubo T, Yagi Y, Ishibashi S, Akiyama J, Nagahori M, Watanabe M, Yokota T, Mizusawa H. Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy in a patient with Crohn's disease. *Intern Med* 2013; 52: 125-128.
- 3) Nanri K, Niwa H, Mitoma H, Takei A, Ikeda J, Harada T, Okita M, Takeguchi M, Taguchi T, Mizusawa H. Low-Titer Anti-GAD-Antibody-Positive Cerebellar Ataxia. *Cerebellum* 2012; 12: 171-175.
- 4) Abe Y, Hashimoto K, Iinuma K, Ohtsuka Y, Ichiyama T, Kusuhara K, Nomura K, Mizuguchi M, Aiba H, Suzuki Y, Mizusawa H, Hosoya M. Survey of Subacute Sclerosing Panencephalitis in Japan. *J Child Neurol*, 2012; 3 March, (on line)
- 5) Suzuki F, Kubota T, Miyazaki Y, Ishikawa K, Ebisawa M, Horihata S, Ogura T, Mizusawa H, Imai T, Miyasaka N, Nanki T. Serum level of soluble CX3CL1/fractalkine is elevated in patients with polymyositis and dermatomyositis, which is correlated with disease activity. *Arthritis Res. Therap* 2012; (on line)
- 6) Nanri K, Niwa H, Mitoma H, Takei A,

Ikeda J, Harada T, Okita M, Takeguchi M, Taguchi T, Mizusawa H. Low-Titer Anti-GAD-Antibody-Positive Cerebellar Ataxia. *Cerebellum* 2012; 12: 171-175.

7) Nozaki Y, Nagare Y, Hino S, Yano T, Kishimoto K, Shimazu H, Ikoma S, Kinoshita K, Funauchi M. (2010). Therapeutic strategy and significance of serum rheumatoid factor in patients with rheumatoid arthritis during infliximab treatment. *Jpn J Clin Immunol* 2010; 33, 135-141.

8) Martins Rde C, Gandolfi L, Modeli IC, Almeida RC, Castro LC, Pratesi R. Serologic screening and genetic testing among brazilian patients with celiac disease and their first degree relatives. *Arq Gastroenterol* 2010; 47, 257-262.

9) Hadjivassiliou M, Boscolo S, Tongiorgi E, Grünewald RA, Sharrack B, Sanders DS, Woodroffe N, Davies-Jones GA. Cerebellar ataxia as a possible organ-specific autoimmune disease. *Mov Disord* 2008; 23, 1370-1377.

10) Hadjivassiliou M, Grünewald R, Sharrack B, Sanders D, Lobo A, Williamson C, Woodroffe N, Wood N, Davies-Jones A. Gluten ataxia in perspective: epidemiology, genetic susceptibility and clinical

characteristics. *Brain* 2003 126(Pt 3), 685-691.

11) Betterle C, Zanchetta R. Update on autoimmune polyendocrine syndromes (APS). *Acta Biomed*, 2003; 74, 9-33.

12) Miyakawa H, Kitazawa E, Abe K, Kawaguchi N, Fuzikawa H, Kikuchi K, Kako M, Komatsu T, Hayashi N, Kiyosawa K. Chronic hepatitis C associated with anti-liver/kidney microsomal-1 antibody is not a subgroup of autoimmune hepatitis. *J Gastroenterol*, 1997; 32, 769-776.

13) Islam SM, Numaga J, Fujino Y, Hirata R, Matsuki K, Maeda H, Masuda K. HLA class II genes in Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35, 3890-3896.

14) 岸本浩、酒匂崇、吉国長利、中村宏志、田中信次、吉留鶴久、山口正男.疫学調査における RA 因子検出試験と HLA 抗原分析. *整形外科と災害外科* 1991; 39, 1072-1079.

健康危険情報：なし

知的財産権の出願・登録状況：なし

Encephalomyeloradiculoneuropathy (EMRN) 患者に共通して検出された抗中性糖脂質抗体

研究協力者 武藤多津郎

共同研究者 島さゆり、植田晃広、新美芳樹、伊藤信二、朝倉邦彦

研究要旨

脳脊髄根末梢神経炎 (Encephalomyeloradiculoneuropathy : EMRN) は神経系の全てが、同時あるいは前後して障害されるまれな病態である。文献上 10 数例が報告されてきたが、一例報告が多く、複数例をまとめた報告がないため、その病態や臨床像については不明な点が多い。この疾患はこれまで ADEM+GBS、MS+CIDP などとして報告されている症例や、Combined Central and Peripheral Demyelination との identity が議論されてきたが、現在のところ、明確な回答は得られていない。我々はこれまで EMRN と思われる症例を複数例経験し、検索の進んだ 4 例について、臨床像、神経生理学的所見、神経放射線学的所見からその共通する臨床像を抽出した。さらに本症に特異的なバイオマーカーを検索し、病勢に相関し、かつ疾患特異的な中性糖脂質に対する自己抗体の検索を感度・特異性の高い方法を新規に導入し行った。

研究目的

脳脊髄根末梢神経炎

(Encephalomyeloradiculoneuropathy : EMRN)

は神経系の全てが、同時あるいは前後して障害されるまれな病態である。文献上 10 数例が報告されてきたが、一例報告が多く、複数例をまとめた報告がないため、その病態や臨床像については不明な点が多い。

EMRN と思われる 4 症例において、臨床像、神経生理学的・神経放射線学的所見などから、共通する臨床像を抽出した。また、EMRN に特異的なバイオマーカーと考えた中性糖脂質に対する自己抗体の検出に成功し、病勢との相関や、疾患特異性などの検討を行った¹⁾。

藤田保健衛生大学 脳神経内科学

研究方法

1)対象 EMRN 患者 4 名、他の神経疾患 47 名 (多系統萎縮症 8 名、視神経脊髄炎 4 名、多発性硬化症 15 名、慢性炎症性脱髄性多発根神経炎 15 名)、健常ボランティア 28 名 (age-matched and sex-matched)

2)自己抗体の検索方法

Far-Eastern blot 法…抗原標品となる酸性・中性糖脂質を薄層クロマトグラフィープレートを用いて分離し²⁾、この分離された各糖脂質を ATTO 社製のサーマルプロッターを用いて PVDF 膜上に転写。以後はこの PVDF 膜を通常の Western blot 法を行うように患者血清・髄液と反応させ、化学蛍光発光法で陽性バンドを検出。この方法では、抗原標品に不純物が混入していても薄層クロマトグラフィー上で分離・精製されるので、各種糖脂質に特異的な反応が検出でき、

ELISA 法の弱点が克服される。

研究結果

4 例の EMRN 患者血清のうち、治療前は全例で lactosylceramide (LacCer) に対する抗体活性を認め、2 例に galactosylceramide (GalCer) に対する弱い抗体活性を重複して認めた。治療後にこれらは消失。その他神経疾患や、健常ボランティアからは抗中性糖脂質抗体は検出されなかった。また EMRN 患者急性期髄液中にも同様の抗体活性を検出した。

考察

本研究では EMRN 患者血清・髄液中における中性糖脂質に対する自己抗体の検出に成功した。中性糖脂質は脂質ラフト中に局在し、主に細胞内外の情報伝達に参与している。従ってまた、これら中性糖脂質に対する自己抗体が存在すると、正常なラフト機能を障害する可能性があると考えられる。実際、ヒト好中球に対して抗 LacCer 抗体は導細胞の貪食能や過酸化物の産生を変化させることが報告され、また抗 GalCer 抗体は家兎に脱髄を惹起させることが明らかとなっている。本研究で検出された自己抗体は EMRN の病勢に相関していたことから、本病態の良いマーカーと成り得る可能性が示唆された。

結論

1. 中性糖脂質に対する自己抗体を検出した。
2. これらの抗体は治療前の EMRN 患者血清から全例に検出され、治療後の症状の改善した時期に採取された検体からは抗体活性が消失していた。また、急性期髄液にも

同様の抗体活性が確認できた。

3. 従って、抗中性糖脂質抗体は EMRN の病勢を反映する良いマーカーと成り得る可能性が示唆された。

文献

1. Shima S Mutoh T et al. Anti-neutral glycolid antibodies in encephalomyeloradiculoneuropathy. *Neurology*. 2014 Jan 14;82(2):114-118
2. Mutoh T et al. Abnormal cross-talk between mutant presenilin 1 (I143T, G384A) and glycosphingolipid biosynthesis. *FASEB J* 2012; 26: 3065-3074

健康危険情報

なし

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