

E. 結論

前駆期に対する研究アプローチの中で、NHALEの10%程度の症例に、前駆期症状と推定できる依存症などの既往歴があり、20-40歳の女性正常対照の中に血清NMDA型GluR抗体が著しく高値の群が見つかった。NMDA型GluR抗体をマウスにpassive transferする動物モデルにおいても、マウスに興奮性の行動変化が観察され、NMDA型GluR抗体高値の前駆期がNHALE発病前に存在するものと確信してきた。動物モデルと発病前献血保存血清を有機的に結びつけた前駆期病態研究を推進したい。

先行症状期の研究では、発熱、頭痛といった非特異的な症状が多いこと、脳炎症状出現前に髄液検査された18例中18例で無菌性髄膜炎の診断がされていたこと、血液検査ではリンパ球・血小板の減少、IgA高値、CRPの比較的低下が特徴として見られ、早期診断に繋がる可能性

があることが分かった。髄液検査でも髄液細胞数が非炎症性の疾病対照群に比べて有意に多く、脳炎発病に向けて低下した。リンパ球に発現するNMDA型GluRの破砕-抗原提示が起こり、CNS内でNMDA型GluR抗体産生にブースターがかかるために、NHALE発症につながる可能性が推定される。NHALEの発病予防のためには、末梢血およびCNSでリンパ球の細胞死を導く要因を検討する必要がある。NMDA型GluR抗体の抗原供給の観点から発病予防につながる治療があるか？今後検討したい。NMDA型GluR抗体による作用のみでは、痙攣や意識障害など説明しづらい症状がNHALE急性期にはあり、passive transferする動物モデルを用いて、NMDA型GluR抗体以外の脳炎に不可欠な因子を見出し、脳炎の予後を改善したい。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 2014年8月29日、NMDA型グルタミン酸受容体抗体による不安モデルマウスの開発、発明者：高橋幸利⇒特願2014-174749、出願：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団。
- 2014年10月30日、プライマーセット及び免疫介在性てんかんの診断方法、発明者：高橋幸利⇒特願2014-221632、出願：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

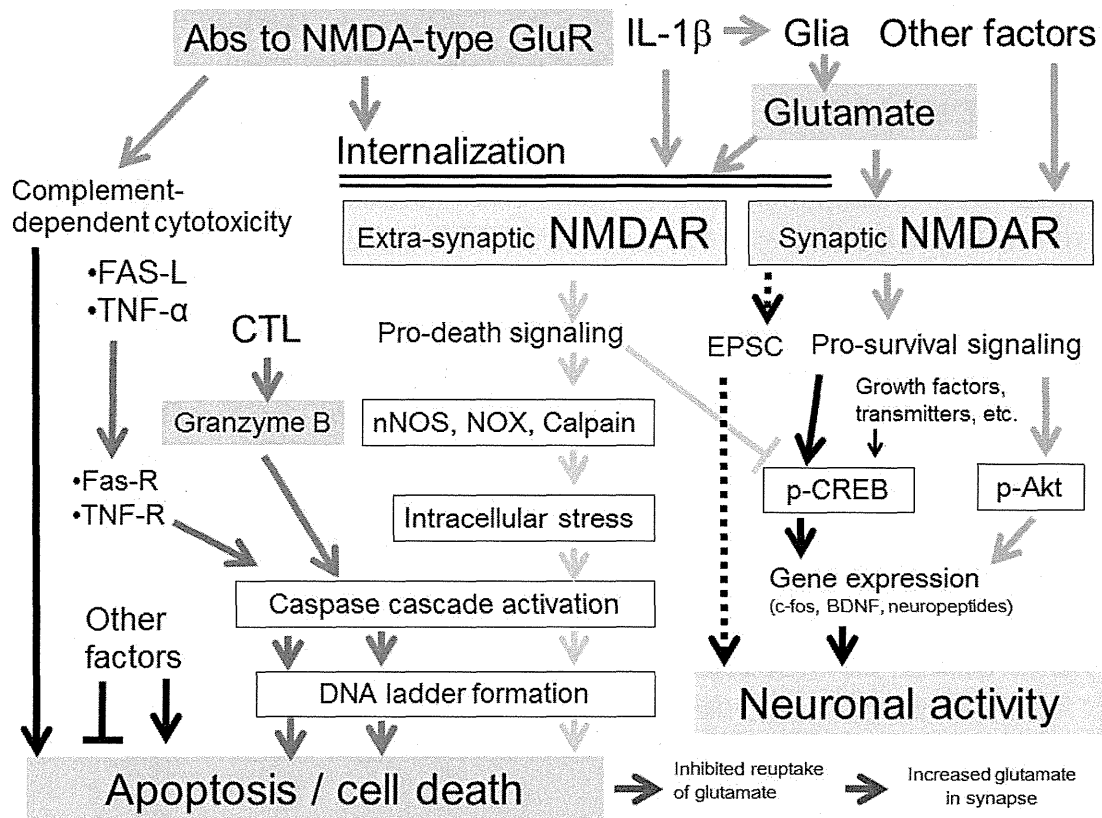


図5. NHALEにおける抗体、サイトカイン、granzyme Bなどの役割

参照1

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）
（総合）研究報告書

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】「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発病初期の発作症状③MRI拡散強調画像④抗GluR ϵ 2抗体⑤サイトカイン⑥血液脳関門機能⑦神経病理所見⑧予後⑨橋本脳症を加え、16項目34頁をHPに公開した

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

【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。

【NMDA型GluRサブユニット抗体測定法の改良】イムノプロット法より感度が高く簡便なELISAによるGluR ϵ 2（NR2B）、GluR ζ 1（NR1）、GluR δ 2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。

【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（イムノプロット法IgG）の陽性率は33.7%、髄液中抗GluR ϵ 2抗体（イムノプロット法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。卵巣奇形腫を合併する急性脳炎（AE-OT）における髄液中抗GluR ϵ 2抗体（イムノプロット法）の陽性率は39.6%、抗GluR ϵ 2-NT2抗体の陽性率は81.3%、抗GluR ϵ 2-CT抗体の陽性率は68.2%、抗GluR ζ 1-NT抗体の陽性率は71.4%、抗GluR ζ 1-CT抗体の陽性率は80.0%、Dalmau法のcell-based assayの急性期陽性率は82.6%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GluRに吸着するのは主

に抗GluRε2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GluRζ1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。

AE-OTの髄液抗NMDA受容体複合体抗体陽性の17例中16例が、抗GluRε2-NT2抗体、抗GluRζ1-NT抗体ともに陽性であり、GluRε2 (NR2B)、GluRζ1 (NR1) 両者に対する抗体を含んでいて、二つの抗体の優位性は、急性期は症例ごとに異なり、慢性期になるとGluRε2に対する抗体が優位となっていた。

【抗NMDA型GluR抗体の基礎的意義】 GluRε2N/R+GluRζ1N/R-EGFP共発現細胞 (ε2+ζ1) において、血清との反応を37℃の条件で行うと、NMDA型GluRが細胞内に取り込まれたが、GluRζ1の単独発現細胞 (ζ1) 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GluRε2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。

【NHALEの血液脳関門病態】 非傍腫瘍性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。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。TNF-αは動物実験で脳でのMMP-9を増加させることが明らかとなった。

【NHALEの中樞神経病理】 非傍腫瘍性NHALEの海馬病変ではCD68陽性マクロファージ/単球、ミクログリアの増勢に加えて、海馬CA1の実質内にCD8陽性T細胞が比較的多くみられことが分かった。

【AE-OTにおける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。

【NHALE予後】 成人非傍腫瘍性NHALEの後遺症では、ADL障害・精神症状・てんかん発作・知的障害・運動障害が約30%の症例に見られるのに対し、記憶障害は63.2%に見られた。

【NHALE治療】 パルス治療・IVIG治療ともに、治療開始が早いほど精神症状・急性期入院日数などの予後が良い傾向を示した。抗GluR抗体介在NHALEの治療では、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。

【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。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抗体陽性橋本脳症】 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。抗NAE抗体陽性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(神経)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、大分大学医学部総合内科学第三講座、教授
- 栗山 勝、福井大学第2内科(神経内科)、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、助教
- 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
- 佐々木真理、岩手医科大学先端医療研究センター、
- 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)。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。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2007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)、において、以下の点を明らかにできた(参照2)。

【疫学】鳥取県での後方視的急性脳炎罹患率調査では、成人脳炎19.0/100万人年、非ヘルペス性急性辺縁系脳炎・脳症(non-herpetic acute limbic encephalitis, NHALE)の罹患率は4.7/100万人年と推定され(中島)、NHALEはまれな疾患ではないことを明らかにした。小児の全国アンケート調査での罹患率は~56.4/100万人年と推定された(森島)。

【抗GluR2抗体】成人NHALEでは、血清抗GluR2(NR2B)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GluR2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末エピソードを含んでいた。抗GluR2抗体陽性NHALEの74.5%は15-34歳が占め、抗GluR2抗体は主として若年成人の脳炎に関与していた。抗GluR2抗体陽性NHALEの初発神経症状は、精神症状が主体で、抗GluR2抗体陰性NHALEに比べてけいれんが有意に少なかった。抗GluR2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GluRε2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抗体陽性辺縁系脳炎】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。

【橋本脳症】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NHLE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感染が証明できた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)】傍腫瘍性神経症候群 (PNS) において、免疫寛容に重要な働きをするCD4⁺CD25^{high}制御性T細胞 (Treg) 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。

【新規脳炎関連抗体探索】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】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。

以上より、急性脳炎・脳症の中には、かなりの頻度で抗GluRε2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. 2008年度からの研究戦略

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、研究を進めることにした。

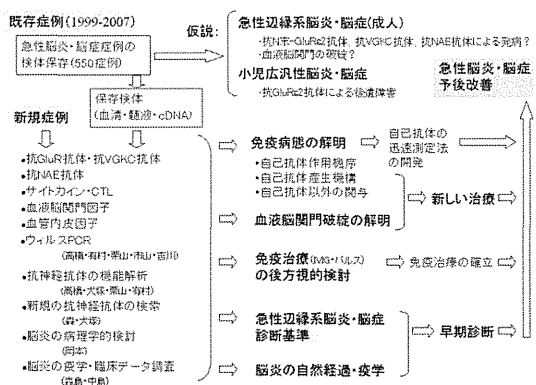


図1. 研究戦略

表2. 2008-2010年度研究計画内容

<研究全体の計画>

急性脳炎・脳症症状を呈する症例を、我々の研究班（H17-こころ一般-017）（2005-2007年度）にて作成した多施設共同研究プロトコールに従い症例登録し、各種ウイルス抗原検索、臨床データ解析、神経画像評価に加えて、血清・髄液の各種自己抗体、サイトカイン、細胞障害性T細胞、血液脳関門因子、血管内皮因子等を経時的に測定し、自己免疫病態を検討する。また、個々の自己抗体の産生機構・作用機序を基礎的に検討する。

<2008年度計画>

①. 脳炎の自己免疫病態の検討

- 抗神経自己抗体の測定：抗GluR ϵ 2・GluR δ 2抗体（高橋幸利担当）、抗NAE抗体（栗山勝担当）、抗VGKC抗体（渡辺修担当）、抗Yo抗体・抗Hu抗体・抗Ri抗体・抗CV2(CRM P-5)抗体・抗Ma-2抗体・抗amphiphysin抗体（田中恵子担当）などを測定する。
- 抗N末-GluR ϵ 2抗体の迅速測定法の確立：現在イムノブロットで5日かけている検査を、ELISA法で迅速に測定できるようにする（高橋幸利担当）。
- 卵巣奇形腫合併辺縁系脳炎症例のエピトープ解析：Dalmau教授との共同研究でNMDA型GluR複合体への自己抗体のエピトープを決定する（高橋幸利担当）。
- 新規自己抗体の検索：新たな脳炎自己抗体を見出すために、T7 Phage Display System（森寿担当）やラット脳の二次元免疫ブロッティングおよび高感度ナノLC-MS/MSシステム（犬塚貴担当）を用いた検討を行う。
- 抗神経抗体の産生機構・機能解析：抗GluR ϵ 2抗体をラット培養神経細胞に加え、その生物学的効果を、Caイメージで評価する（高橋幸利担当）。抗NAE抗体（栗山勝担当）、抗VGKC抗体（渡辺修担当）についても検討する。
- サイトカイン：脳炎患者の血清・髄液で経時的に測定する（市山高志担当）。
- 血液脳関門・血管内皮細胞：MMP-9、TIMP-1などの検討を行う（市山高志担当）。
- 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）。

②. 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

2006年8月より開始できた多施設共同研究の中で、急性辺縁系脳炎・脳症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、庄司紘史担当）。

③. 自己免疫介在脳炎の診断基準、治療マニュアル作成

多施設共同研究の中で画像所見に関する診断基準を検討する（湯浅龍彦、岡本幸市、犬塚貴、熊本俊秀、庄司紘史担当）。

④. 脳炎の自然経過・疫学検討

小児の後方視的疫学調査（全国対象）を行なう（森島恒雄担当）、成人領域の前方視的疫学調査（中島健二担当）を行なう。

⑤. 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）。

<2009年度計画>

- ①. 自己抗体が脳炎症状を引き起こすメカニズムについての研究
 - 抗GluR2抗体（高橋幸利担当）、抗VGKC抗体（渡邊修担当）について、IgGサブクラスを検討し、障害メカニズムを推定する。
 - 抗NAE抗体の生物学的効果を検討する（栗山勝担当）。
- ②. 自己抗体の迅速測定法の開発
 - 抗NMDAR1（GluR・1）抗体をELISA法で測定できるようにする（高橋幸利担当）。
 - 抗NMDAR複合体抗体測定法を確立する（森寿、田中恵子担当）。
 - 脳炎における新規自己抗原（抗体）の検索のために、T7 Phage Display System（森寿担当）やラット脳の二次元免疫ブロッティングおよび高感度ナノLC-MS/MSシステム（犬塚貴担当）を用いて検討を行う。
- 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発現を検討する。
 - 脳炎患者末梢Tリンパ球のCaspase-3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。
 - 全ゲノム対象タイピングによる辺縁系脳炎炎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
 - サイトカイン、MMP-9、TIMP-1などを脳炎患者の血清・髄液で経時的に測定する（市山高志担当）。
 - 動物モデルでサイトカインの影響を検討する（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NMDA R複合体抗体のエピトープとなっているサブユニットを決定する（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（高橋幸利担当）。
 - 卵巣奇形腫の画像の検討（湯浅龍彦担当）。
- ⑥. 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MRI所見に関する診断スキームを完成させる。
 - 多施設共同研究により辺縁系脳炎の予後のデータを加える。
 - 多施設共同研究により初発症状のデータを加える。
- 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）。

<2010年度計画>

- 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 GluR2 (NR2B)・GluR1 (NR1) 抗体と NMDA 型 GluR 複合体の内化 (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
ウィルス検出	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
病態分類別症例数

分類	20060807-	20070917-	20081101-	20091101-
	20070917	20081031	20091031	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
HHE	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

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2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。詳しい研究方法は本報告書内に再掲した2008年度-2010年度の各総括研究報告書(参照3-5)または各年度の総括・分担研究報告書を参照されたい。

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2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。

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2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。

4. GluRに対する各種抗体の測定

【イムノブロット】全長GluR ϵ 2・GluR δ 2分子を抗原とする抗GluR ϵ 2抗体・抗GluR δ 2抗体の測定は、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GluR ϵ 2・GluR δ 2の全長蛋白を抗原として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)。

【ELISA】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(図2・3)。

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、抗GluR ζ 1-CT抗体を、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、抗GluR δ 2-CT抗体を、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)(高橋)。

【Cell-based assay】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)(田中)。

NMDA受容体は、GluR ϵ 2+GluR ζ 1の複合体として細胞表面上に発現するが、細胞培養液中に存在するグルタミン酸とグリシンに反応して活性化し、カルシウム透過により細胞死が誘導されてしまう。Dalmauら、田中らはMK801でこの問題に対処しているが、患者血清スクリーニングのためには、より安定したNMDA受容体発現株の樹立が必要であり、細胞毒性の問題を解決するために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、GluR ζ 1N/R-EGFP)の発現ベクターを構築し、HEK293細胞に導入した。また、同様にGluR ζ 1N/R-EGFPを単独でHEK293細胞に導入した。これらの細胞株を用いて患者血清の抗NMDA型GluR複合体抗体、抗GluR ζ 1(NR1)抗体の測定を検討した(森)。

【on cell Western法】通常のNMDA受容体は、GluR ϵ (GluR2、NR2)とGluR ζ 1(GluR1、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(森)。

5. 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)。

6. 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)。

7. 血液脳関門への影響評価

脳炎急性期および回復期における血清Matrix metalloproteinase-9(MMP-9)、Tissue inhibitor of metalloproteinase-1(TIMP-1)値を、Amersham Biosciences社ELISAキットで測定した。検定はMann-Whitney検定、Wilcoxon検定、 χ^2 検定で行った。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)。

マウスにIL-6、IL-1 β 、TNF- α を投与し、Evans blue extravasation into brain法により血液脳関門の評価を行い、MMP-9の変化を検討した(森島)。

8. サイトカイン、ケモカインの測定

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-1 α 、RANTES等をELISAキットで測定した(市山、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、MIP-1b、PDGF-bb、Rantes、TNF- α 、VEGFの各サイトカイン濃度を検討した。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した(田中、高橋)。

9. 病理研究

辺縁系脳炎を含む8例の海馬領域のパラフィ

ン包埋切片に対して、抗ヒトCD3ウサギポリクロナール抗体 (T細胞) (DAKO, 1:100)、抗ヒトCD20マウスモノクロナール抗体 (B細胞) (DAKO, 1:800)、抗ヒトCD8マウスモノクロナール抗体 (サプレッサー/細胞障害性T細胞) (DAKO, 1:200)、抗ヒトCD68マウスモノクロナール抗体 (マクロファージ) (DAKO, 1:100) を用いて免疫染色し、出現しているリンパ球の性状を検討した (岡本)。

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

11. 抗VGKC抗体の測定

抗VGKC抗体の測定は、家兎脳ホモジネートと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た (渡邊、有村)。

12. 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 (×200)・髄液 (×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 (×200)・髄液 (×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)。

13. NAE (N末端 α -enolase) 抗体の測定

ヒト中枢神経組織の一次元・二次元免疫プロットを行い、一例の橋本脳症患者血清に対して

特異的に反応する蛋白を免疫学的に検出した。次に、橋本脳症患者血清に強く反応した蛋白を標的抗原候補蛋白とし、Matrix-assisted laser absorption ionization time-of-flight/mass spectroscopic (MALDI-TOF/M) により質量分析を行い、得られた質量スペクトルを元にデータベース解析を行い、標的抗原候補蛋白の同定を行った (peptide mass fingerprinting; PMF)。

同定された標的抗原候補蛋白を3分割 (N末端部位、中間部位、C末端部位) し、組み換えプラスミドを作製し、哺乳類細胞に形質転換し、発現蛋白をカラムにて精製した。

哺乳類細胞で発現・精製した標的抗原候補蛋白の組み換え蛋白を用いて免疫プロットを行い、抗 NAE (N末端 α -enolase) 抗体を検出する (米田、栗山)。

14. 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)。

15. 新しい抗神経抗体・抗原の検索

ラット大脳ホモジネートをサンプルとして二次元免疫プロットを施行し、PVDFメンブレン上の抗体反応スポットと一致したゲル上のスポットを切り出しトリプシン消化後MALDI-TOF-MSを用いてその認識抗原蛋白の同定を試みた。二次元免疫プロットでは一次抗体としてNHLE患者3名とHLE患者2名の急性期の髄液 (×200) を用いた (犬塚)。

16. 抗LMNA抗体の検討

髄液中抗LMNA抗体の検出: ヒトLMNAリコンビナント蛋白 (Abnova社製) をサンプルとして対象患者の髄液 (×200) を用いてウエスタンブロットを行った (犬塚)。

17. 抗NOLC1抗体の測定法の開発

これまでの検討で、脳炎患者血清中抗体と反応することが判明しているNucleolar and coiled-body phosphoprotein 1 (NOLC1, NM_004741) 分子について、大腸菌を用いてNOLC1組換え蛋白質を発現・精製した後、ELISAによ

る抗NOLC1抗体の測定法を構築した（森）。

18. 髄液・血中ウイルスの検討

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）。

19. 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で比較した。（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

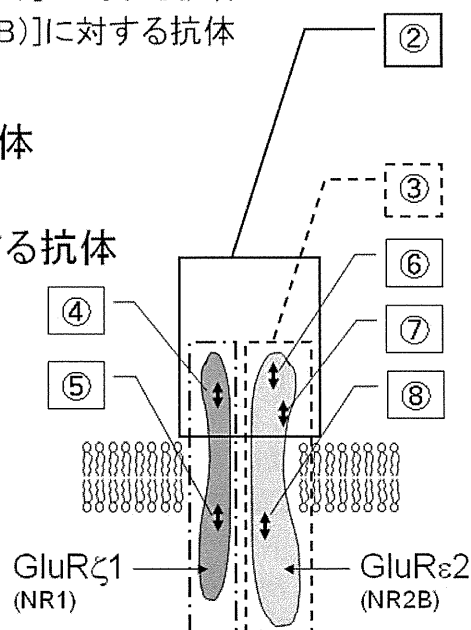
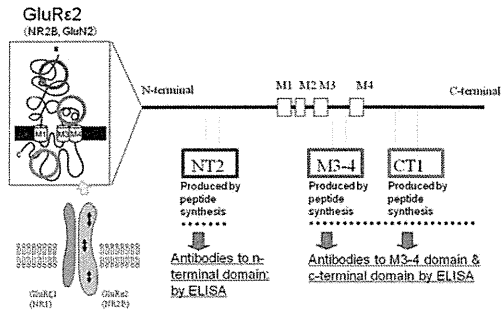
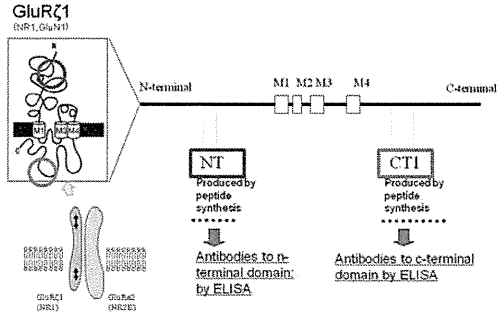


図2. NMDA型GluR サブユニット、複合体に対する抗体の分類

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

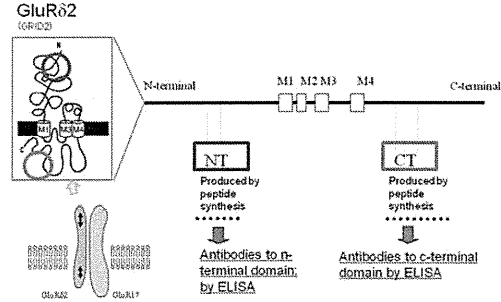
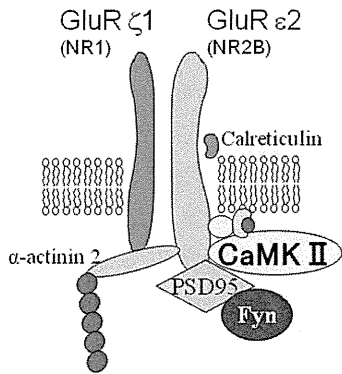


図3. 抗GluR抗体測定のための抗原エピトープ

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2007年9月で200症例を、2007年9月からは年間約320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、鳥取県における急性辺縁系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平均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平均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

2008度は自己免疫介在性急性辺縁系脳炎について、MRI画像の診断スキームを加えるべく、検討会議を4回開催した (表6) (湯浅、岡本、熊本、高橋)。

表6. MRI画像の診断スキーム検討会議

①2008年度第1回画像検討会議
2008年5月16日 (金曜日)
パシフィコ横浜 会議センター
②2008年度第2回画像検討会議
2008年9月23日 (祝日)
鎌ヶ谷総合病院
③2008年度第3回画像検討会議
2008年10月11日 (土曜日)
アルカディア市ヶ谷 (私学会館)
④2008年度第4回画像検討会議
2009年2月28日 (土曜日)
東京ステーションコンファレンス 603会議室

2009年度は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) の発病初期の発作症状 (seizure symptom) (参照1-資料7)、③抗GluRε2抗体 (参照1-資料9)、④非ヘルペス性急性辺縁系脳炎・脳症 (NHALE) の予後 (参照1-資料13) を、「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、2009年8月にホームページに掲載した (参照1) (湯浅、岡本、熊本、森、佐々木、高橋)。

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って、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GluRε2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GluRε2抗体陽性例でより多くみられる傾向にあった (西田)。

5. NHALEのMRI拡散強調画像標準化判定法

施設や操作者 (技師・医師) によりウィンドー幅やレベルが異なるため、誤った判断になる可能性があるため、標準化した以下の方法でDWI画像を表示・判定する (参照1-資料8)。

- 装置コンソールやDICOM画像表示端末上で、b0 (ビーゼロ) 画像 (DWIと同時に取得されるEPI T2強調画像) における正常脳実質 (視床など) のIntensityを測定し、SI b0とする。
- DWI画像ディスプレイのウィンドー幅をSI b0とし、ウィンドーレベルを0.5×SI b0とする。
- 小児ではADCが大きいので、ウィンドーレベルは0.6×SI b0程度とする。

低磁場機器のDWI画像は評価しないほうが良い。1.5T以上の機器で判断する。DWIは正常者でも高信号となる部位があり、側頭葉内側部、前頭葉内側部、島は高信号に出やすい。DWI高信号病変であっても、SPECTなどで血流増加し

た部位は、けいれん重積等を反映した病変である可能性がある。といった点に注意が必要であることが分かった。また、再発性脳炎症例には、DWI高信号病変を認めるが、ADCの低下はない症例があった(湯浅、岡本、熊本、佐々木、高橋)。

6. NHALEのMRI拡散強調画像の特徴

特徴としては、①両側あるいは片側の内側側頭葉(海馬など)に淡いADCの低下を示すDWI高信号病変が出現する。②特徴的病変が出現しない症例が多く、我々の典型的臨床症状を示したNHALE14例の内2例(14.3%)に典型的な側頭葉内側部のDWI高信号病変出現が確認された。③典型的DWI所見が出たのは、0~1病日と早期であった。所見出現時期については今後症例を増やして検討する必要がある。④一過性脳梁膨大部所見が典型的臨床症状のNHALE 14例中2例(14.3%)に見られた(参照1-資料8)。

NHALEを疑われた症例の中に、新皮質のDWI高信号病変が見られた症例が3例あったが、2例はNHALEではない症例で発作重積型の脳炎症例、認知症あるいはposterior reversible encephalopathy syndrome (PRES)と思われる症例であった。1例は臨床症状がNHALEではあるが、微小血栓症の合併によるDWI高信号病変と推定された。新皮質のDWI高信号病変はNHALEの特異的所見ではないと思われる。

再発性脳炎に見られた側頭葉内側部のDWI高信号病変はNHALEのものに似るが、NHALEとは異なりADCの低下がなく、ADCの低下の確認が重要である(湯浅、岡本、熊本、佐々木、高橋)。

7. 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)。

8. 成人NHALEの治療と予後に関する検討

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%に見られたのに対し、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(図5)。後遺障害の程度をスコアの平均(平均±SD)(平均/満点%)で評価すると、ADL7.8±4.7(89%)、てんかん発作3.4±0.9(85%)、精神症状1.7±0.6(85%)、知的障害4.1±1.4(82%)、記憶障害1.2±0.8(60%)、運動障害2.5±0.9(83%)であった。パルス治療の有無でADL障害、てんかん発作、精神症状、知的障害、記憶障害、運動障害の予後に有意差はなかったが、早期治療で精神症状が良い傾向があり、急性期入院日数が短縮した(図6)。IVIG治療が早期に行われるとADL・運動障害・てんかん発作予後が良い傾向を示し、急性期入院日数が短縮した。抗GluRe2抗体陽性群ではパルス治療の方がIVIGより有意にてんかん発作予後が良好であった(高橋)。

9. 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、ADL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)。

10. NMDA型GluRサブユニットに対する高感度迅速抗体測定法の確立

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法が可能となった。

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、抗GluR ζ 1-CT抗体を、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法が可能となった。

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、抗GluR δ 2-CT抗体を、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法が可能となった(高橋)。

11. 抗NMDA型GluR複合体抗体cell-based assayの開発

HEK293細胞に通常のNMDA型GluRサブユニット(GluR ζ 1およびGluR ϵ 1またはGluR ϵ 2)を共発現させた細胞を用いて患者髄液と1:5で反応させたところ、J. Dalmauらの抗NMDAR複合体抗体測定結果と一致した。6例中2例は抗体価が低く、検体の希釈倍率を1:1としたところ、検出が可能であった(田中)。

12. NMDA型GluR免疫染色と患者由来抗NMDA型GluR抗体による染色比較

NMDA型GluR各サブユニット(GluR ζ 1(NR1)およびGluR ϵ 1(NR2A)、GluR ϵ 2(NR2B))に対する抗体による、マウス的大脑・小脳組織の免

疫組織染色では、いずれも神経細胞の辺縁が染色され、GluR ζ 1ではニューロンの突起を含め細胞辺縁のシャープな染色パターンが得られ、GluR ϵ 1では、細胞周囲がやや厚みを持って染色され、GluR ϵ 2では、細胞周囲がfineなdot likeパターンで縁取りされる染色像であった。NHLE-OT患者髄液ではGluR ϵ 2に近いパターンで、血清ではGluR ϵ 1に類似の染色パターンが得られた(図7)(田中)。

13. 抗NMDA型GluR複合体抗体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細胞を、1次抗体、2次抗体と4°Cで反応させた後に固定しNMDA型GluRを検出した。GluR ϵ 2N末に対するコントロールウサギ抗体を用いた蛍光免疫染色により、GFPを発現している細胞表面でのみGluR ϵ 2の発現を確認した。また、GluR ζ 1N/R-EGFPを単独で発現させた細胞でも、M3-M4間を認識するマウス抗体を用いた蛍光免疫染色で、GluR ζ 1の染色を確認した。よってGluR ζ 1は単独でも細胞表面上に発現すると考えられた。これらの結果より、GluR ϵ 2N/RとGluR ζ 1N/R-EGFPを共発現させた細胞(以下 ϵ 2+ ζ 1と表記)と、GluR ζ 1-EGFPを単独で発現させた細胞(以下 ζ 1と表記)によるNMDA受容体に対する安定した自己抗体スクリーニング系が確立した(森)。

14. 抗NMDA型GluR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り、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)。

15. 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、cell-based assay (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 (NHAE) 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-CT1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8)。Dalmau法のcell-based assayの陽性率は75.0%であった (高橋)。

16. 卵巣奇形腫を合併する急性脳炎・脳症 (AE-OT) の各種NMDA型GluR抗体陽性率

全長GluR ϵ 2 (NR2B) 分子を抗原とする抗GluR ϵ 2抗体 (イムノブロット法) の血清IgG型の陽性率は、急性期46.9%、回復期33.3%、慢性期43.8%であった。髄液IgG型の陽性率は、急性期39.6%、回復期38.9%、慢性期53.8%であった。GluR ϵ 2 (NR2B) 分子のN末およびC末ドメインを抗原とする抗体 (抗GluR ϵ 2-NT2抗体、抗GluR ϵ 2-CT1抗体) は、AE-OTでは対照に比べて有意に高値で、髄液では81.3%、68.2%の検体が陽性であった。GluR ζ 1 (NR1) 分子のN末およびC末ドメインを抗原とする抗体 (抗GluR ζ 1-NT抗体、抗GluR ζ 1-CT抗体) は、AE-OTでは対照に比べて有意に高値で、髄液では71.4%、80.0%の検体が陽性であった。抗NMDA受容体複合体抗体 (Dalmau法) は、急性期82.6%、回復期100.0%、慢性期20.0%で陽性であった (図9)。

髄液抗NMDA受容体複合体抗体陽性の17例中16例が、抗GluR ϵ 2-NT2抗体・抗GluR ζ 1-NT抗体

ともに陽性であり、NR2B、NR1両者に対する抗体を含んでいた。

髄液中の抗GluR ϵ 2-NT2抗体/抗GluR ζ 1-NT抗体の比、抗GluR ϵ 2-CT1抗体/抗GluR ζ 1-CT抗体の比で判断すると、急性期は症例ごとに異なっていて一定の傾向が見られなかったが、慢性期になるとGluR ϵ 2に対する抗体が優位となっていた (高橋)。

17. 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10)。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。急性期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 (高橋)。

18. 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。

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)。

19. 抗NMDA型GluR抗体によるNMDA型GluRのinternalization (細胞内取り込み)

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細胞) において、NMDARは細胞の表面をとり囲むclusterとして観察された。患者血清との反応を37°Cの条件で行うと、NMDARがinternalizationしている像が観察された。これは辺縁系脳炎、および卵巣奇形腫に伴う傍腫瘍性脳炎のどちらの検体でも認められた。

さらに、GluR ζ 1の単独発現細胞 (以下 ζ 1)