

経過をとる症例も存在する。これらの事実は、NHALEの発病前の前駆期から抗NMDA型GluR抗体が存在し、軽度の一過性中枢神経系症状を発現する可能性を示唆する(図1、2)。視神経脊髄炎(NMO)では発症の10年前から抗AQP4抗体が認

められた症例が東北大学より報告されており(Nishiyama, et al., Neuro1)、抗体が血清中に存在する前駆期がかなり長く存在することが分かっている。

目的: NHALE前駆期—先行感染症期の病態解明 → 障害の防止・軽減

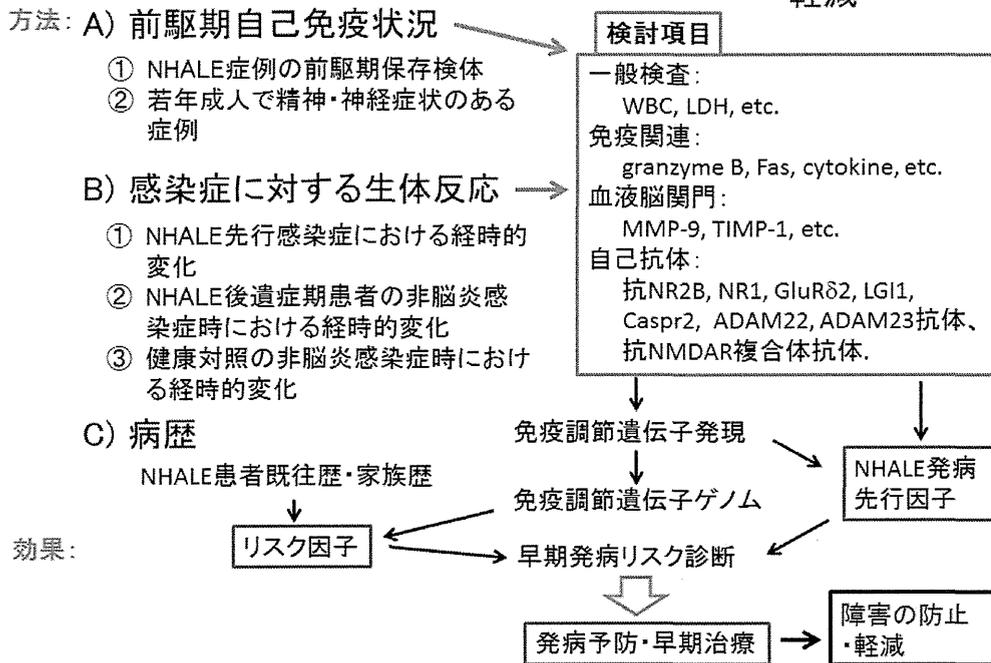


図1. 研究の目的、方法及び期待される効果 (流れ図)

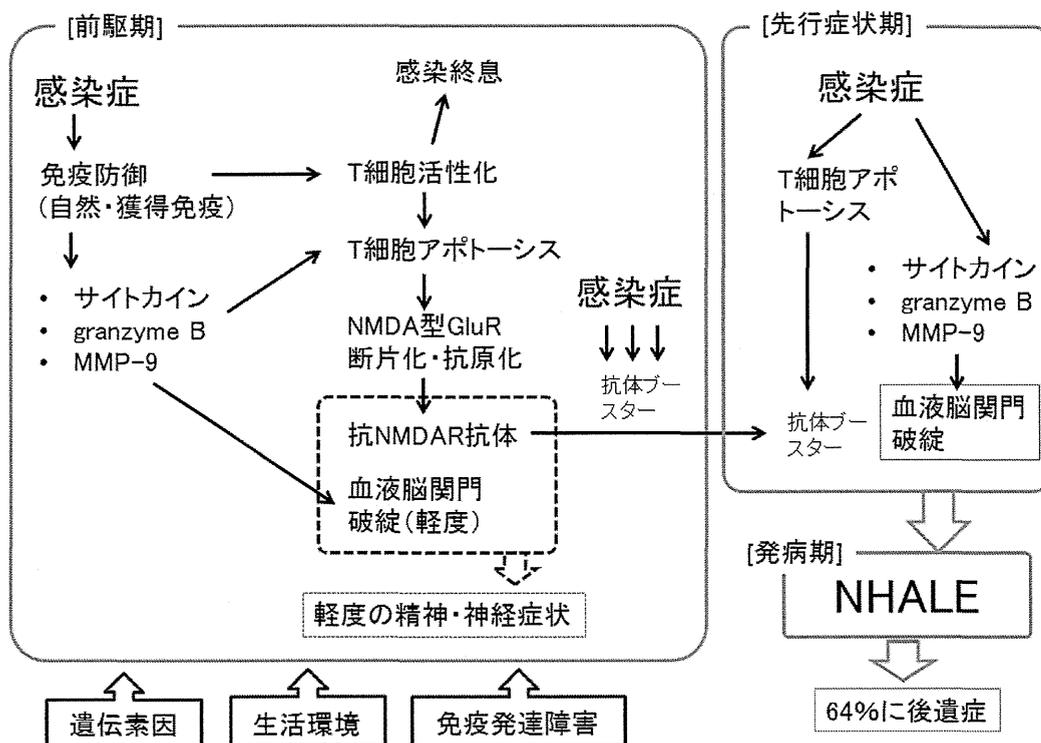


図2. 研究仮説

2. 2012年度研究計画

抗NMDA型GluR抗体のエピトープはGluRの細胞外ドメインから細胞内ドメインまで幅広く、感染交差免疫ではなくNMDA型GluR (NMDAR) 自身が抗原となっていることをこれまでに見出している。末梢血T細胞にNMDARが発現し、PHA刺激で発現増加することが知られており (Miglio, et al. BBRC 2005)、感染によるリンパ球の活性化→NMDAR発現→リンパ球アポトーシス→NMDAR断片化→抗NMDAR抗体産生という仮説を立てている(図2)。脳炎発病数年前(前駆

期)からこのプロセスが徐々に始まり、一部の症例では軽度の中樞神経症状が観察され、その後先行感染症に伴ってNHALEが発病するという病態仮説のもとに、今回の研究では、これまで国内外で検討されてこなかった前駆期と発病直前の先行症状期の病態を詳しく検討し、感染症出現時点でのNHALE発病リスク診断、NHALE発病抑止対策、早期治療を可能にする。

2012年度は表1に示す研究を計画した。

表1. 2012年度研究計画内容

1. NHALE 症例の前駆期保存検体を用いた前駆期自己免疫状況の検討 (H24-25 年度、高橋、森が担当) (図 1)
集積したNHALE症例400例に於いて、前駆期保存検体の有無、成人例献血(保存検体)の有無を調査し、協力が得られる症例の血清で血液脳関門攻撃因子(MMP-9)、サイトカイン(BioPlex)、細胞傷害性T細胞因子(granzyme B)、自己抗体(NR2B, NR1, GluRδ2, LGI1, Caspr2, ADAM22, ADAM23, NMDAR複合体)等を測定する。(目標20例)
2. 精神・神経症状のある若年成人の検体を用いた前駆期自己免疫状況の検討 (H24-26 年度、高橋、森が担当)
これまでに集積した20例を含め、前方視的に血清(髄液)でMMP-9、サイトカイン、granzyme B、自己抗体(前述)等を測定する。(目標50例)
3. NHALE 先行感染症期における一般・免疫マーカーの経時的変化の検討 (H24-26 年度、高橋、森が担当)
先行感染症期のリンパ球アポトーシス指標としてのWBC, LDH、等の一般検査値、MMP-9、サイトカイン、granzyme B、自己抗体(前述)等を、経時的に測定する。(目標50例)
4. NHALE 後遺症期患者の非脳炎感染症時における一般・免疫マーカーの経時的変化 (H24-26 年度、高橋、森が担当)
先行感染症時の一般・免疫マーカーの反応がNHALE特異的なのか? NHALE患者の素因に基づくものなのか?を明らかにするため、NHALE回復後の患者さんで感染症時の一般・免疫マーカーの変動を検討する。(目標20例)
5. 健康対照の非脳炎感染症時における一般・免疫マーカーの経時的変化 (H24-26 年度、高橋、森が担当)
先行感染症時の一般・免疫マーカーの反応がNHALE特異的なのか? NHALE患者の素因に基づくものなのか?を明らかにするため、健康対照で感染症時の一般・免疫マーカーの変動を検討する。(目標20例)
6. NHALE 患者既往歴・家族歴の検討 (H24-26 年度、高橋、西田が担当)
前駆期にみられる精神神経症状などの中樞神経症状を詳しく検討し、NHALE発病時の辺縁系症状などと比較検討する。またNRはリンパ球のみならず正常卵巣にも発現している (Tachibana, Takahashi, et al., 2010)、NHALE症例では不妊治療や帝王切開が直前に見られることがある。リンパ球以外のNR抗原供給が発病に影響していないか?病歴を調査する。家族歴における自己免疫疾患等の頻度を調査する。(目標300例)
7. 免疫調節遺伝子 (Foxp3, CTLA-4, PDCD-1, T-bet) の発現を検討 (ELISA, Real-Time PCR)
8. 免疫調節遺伝子 (Foxp3, CTLA-4, PDCD-1, T-bet) の SNP を検討

B. 研究方法

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

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、自己免疫病態を検討した。

2. 「急性辺縁系脳炎等の自己免疫介在性脳炎・脳症」の診断スキームの改訂

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ふことを目的としている。これまでに明らかになった知見を追加した(高橋)。

3. NHALE患者にみられる既往歴の検討

NHALEでは、発病時にうつ、幻覚、妄想、減裂な言動、行動異常などの精神症状が出現することが知られているが、NHALE患者には脳炎発病以前より何らかの精神障害の既往がみられることがある。NHALE患者の既往歴を調査し、脳炎発病以前からみられた精神症状を明らかにすることで、NMDARに対する抗体が脳炎の発病以前から中枢神経系機能に何らかの影響を及ぼしている可能性を示唆する所見を得ることを目的として、NHALE患者のうち非傍腫瘍性辺縁系脳炎患者217名を対象として、既往歴について後方視的に資料を検討した(西田)。

4. NHALE患者の前駆期自己免疫状況の検討

これまでに集積したNHALE症例について前駆期の有無を調査し、病院での保存検体の有無を確認する。

これまでに集積した症例あるいは、患者会の協力を得て、NHALE発病前に献血のある症例を調査する。院内の倫理委員会に研究を申請し、承認を得たのち、日赤血液センターの公募研究に応募し、献血保存血の使用を許可していただく。

各病院の保存血清検体あるいは献血保存検体について、血液脳関門攻撃因子(MMP-9)、サイトカイン(BioPlex)、細胞傷害性T細胞因子(granzyme B)、自己抗体(NR2B, NR1, GluRδ2,

LGI1, Caspr2, ADAM22, ADAM23, NMDAR複合体に対する抗体)等を測定する(高橋)。

5. NHALE前駆期の可能性のある精神・神経症状のある若年者の検体の自己免疫状況の検討

思春期から若年成人期にうつなどの精神症状を呈した症例で、血清あるいは髄液の血液脳関門攻撃因子(MMP-9)、サイトカイン(BioPlex)、細胞傷害性T細胞因子(granzyme B)、自己抗体(NR2B, NR1, GluRδ2, LGI1, Caspr2, ADAM22, ADAM23, NMDAR複合体)等を測定する(高橋)。

6. NHALE患者にみられる先行症状の検討

NHALEの先行症状期の病態を明らかにし、早期診断、脳炎発病予防を実現するため、髄液抗NMDAR抗体陽性非傍腫瘍性NHALE217例の先行症状期の臨床症状、病原体検索結果を検討した(高橋)。

7. NHALE先行症状期における一般・免疫マーカーの検討

NHALEの先行症状期の病態を明らかにし、早期診断、脳炎発病予防を実現するため、髄液抗NMDAR抗体陽性非傍腫瘍性NHALE217例の先行症状期の一般臨床検査値を検討する。さらに、先行症状期の保存検体を収集し、血清あるいは髄液の血液脳関門攻撃因子(MMP-9)、サイトカイン(BioPlex)、細胞傷害性T細胞因子(granzyme B)、自己抗体(NR2B, NR1, GluRδ2, LGI1, Caspr2, ADAM22, ADAM23, NMDAR複合体)等を測定する(高橋)。

8. 浮遊系293F細胞を用いた抗NMDAR抗体ならびに抗デルタ型GluR抗体測定系の開発

現在の固定培養細胞(HEK293T)を用いたcell-based assayによる細胞表面上NMDARを認識する自己抗体のスクリーニングシステムでは、定性反応であることと、結果判定までに約7日を要するという問題があった。そこで、浮遊系293F細胞にNMDARならびにデルタ型GluRの遺伝子発現ベクターを導入して、浮遊細胞を用いた簡便なスクリーニングシステムの開発を試みた(森)。

9. Autoimmune Encephalitis Mosaic1キットによる自己抗体スクリーニングの検討

Euroimmune社製のAutoimmune Encephalitis

Mosaic1のキットを用いて、抗NMDAR抗体、抗AMPA抗体、抗GABA_BR抗体、抗LGI1抗体、抗CASPR2抗体の測定を簡便に行えるかどうかを検討した。このキットはcell-based assayを少し改変したもので、各受容体発現ベクターを導入したHEK細胞をプレパラートに固定し、発現受容体を抗原として、自己抗体をスクリーニングするものである。

対象はNHALE6例（血清6検体、髄液4検体）、卵巣奇形種合併脳炎2例（血清2検体、髄液2検体）、再発性脳炎2例（血清2検体、髄液2検体）、痙攣重積型脳症1例（血清1検体、髄液1検体）、橋本脳症2例（血清3検体）、脳炎後部分てんかん3例（血清3検体、髄液3検体）、傍腫瘍症候群4例（血清4検体、髄液3検体）、精神症状1例（血清1検体、髄液1検体）、抗VGKC抗体陽性脳炎2例（血清2検体、髄液2検体）、亜急性脳炎2例（血清2検体、髄液2検体）であった（高橋）。

10. NHALEの神経細胞死に対する細胞傷害性T細胞の役割の検討

剖検で明らかになっているNHALEの海馬ニューロンの減少の原因を明らかにするため、NHALEの血清及び髄液のgranzyme BをELISAで測定し、髄液一般検査値、予後との関連を統計的に検討した（高橋）。

11. 抗NMDAR抗体のシナプスNMDA型GluRに対する作用の検討

NHALEの抗NMDA型GluR抗体のシナプスNMDARに対する作用を明らかにするために、培養ラット胎児神経細胞に抗NMDAR抗体陽性NHALE患者髄液あるいは患者髄液IgG分画を加え、培養上清のLDH濃度、培養細胞の総cAMP-Responsive-Element-Binding protein (tCREB) 濃度およびリン酸化CREB (pCREB) 濃度を測定し、同時測定対照との比を求めて髄液あるいは髄液IgGの神経細胞への影響を評価した（高橋）。

12. NHALE後遺症期患者の非脳炎感染症時における一般・免疫マーカーの経時的変化

NHALE回復後の患者さんで、上気道炎などの感染症罹患時の血清などを収集し、血液脳関門攻撃因子(MMP-9)、サイトカイン(BioPlex)、細胞傷害性T細胞因子(granzyme B)、自己抗体(NR2B, NR1, GluR ϵ 2, LGI1, Caspr2, ADAM2

2, ADAM23, NMDAR複合体)等を測定する(高橋)。

13. 健康対照の非脳炎感染症時における一般・免疫マーカーの経時的変化

健康対照あるいは疾病対照で、上気道炎などの感染症罹患時の血清などを収集し、血液脳関門攻撃因子(MMP-9)、サイトカイン(BioPlex)、細胞傷害性T細胞因子(granzyme B)、自己抗体(NR2B, NR1, GluR ϵ 2, LGI1, Caspr2, ADAM22, ADAM23, NMDAR複合体)等を測定する(高橋)。

14. 免疫調節遺伝子(Foxp3, CTLA4, PDCD1, T-bet)の発現を検討(Real-Time PCR)

NHALE患者の自己抗体などの自己免疫病態を解明する目的で、免疫調節遺伝子(forkhead box P3, Foxp3; Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4, CTLA4; programmed cell death-1, PDCD-1; T-bet)の発現を検討した。パックスジーンにて採血した血液からRNAを抽出し、QuantiTect® Reverse Transcription kit (QIAGEN)を用いてcDNAを作成、Real-Time PCR(LightCycler)用キット(ヒト:Foxp3リアルタイムPCRプライマーセット、ロシュ、4450205;ヒト:CD152リアルタイムPCRプライマーセット、ロシュ、488932;ヒト:PDCD1リアルタイムPCRプライマーセット、ロシュ、486777;ヒト:T-betリアルタイムPCRプライマーセット、ロシュ、487232)を用いて免疫調節遺伝子濃度を定量し、 β -actin遺伝子濃度との比で検討した(高橋)。

15. 免疫調節遺伝子(Foxp3, CTLA-4, PDCD-1, T-bet)のSNPの検討

患者のEDTA血から、ゲノムDNAをMagNA Pure(ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社)により分離し、連結可能匿名化した。その後、タカラバイオ株式会社にてゲノム多型変異解析を行った。CTLA4 遺伝子は全長6175bpを10領域に分け、PCR増幅した。PDCD1 遺伝子は全長9625bp及びエクソン1上流領域、エクソン5下流領域を16領域に分け、PCR増幅した。T-bet遺伝子は全長12876bp、プロモーター領域(-1993T>C、-1514T>C、-1499G>A)、5' UTR(rs17244544)、エクソン6下流領域(3' UTR(rs17250967))を10領域に分け、PCR増幅した。それぞれのPCR産物を鋳型に両鎖ダイレクトシーケンスを行った。得られたシーケンスデータは、解析ソフト(SEQUENCHER)にてリフ

アレンス配列と比較し変異塩基をリストアップした。ゲノム頻度を日本人HapMapデータと比較した(高橋)。

16. アジア地域での原因不明脳炎患者の抗

NMDAR抗体の検討

既に報告した、NMDAR (GluR ϵ 2N/R-DsRed と GluR ζ 1N/R-EGFP)を安定的に発現するHEK293細胞株を用いたOn-cell Western法にて、本邦の症例、ならびに、大分大学との共同でアジア地域での原因不明脳炎患者の血清と脳脊髄液中の抗NMDAR抗体の定量的解析を行った(森)。

17. NHALE急性期の抗体産生に関わるNMDAR抗

原の検討

NHALE急性期の抗NMDAR抗体産生の抗原刺激となるNMDAR抗原の起源を明らかにする目的で、急性期の患者血液からRNAを抽出し、Quantigene Plex 2.0 Assay (Magnetic Assay)

kit (Veritas)を用いてGRIN2D、GRIN2A、PGK1、GAPDH、TBP、GRID2、GRIN1、GRIN2B、HPRT1、GRIN2Cの発現量を検討した(表2)(高橋)。

(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各研究は、倫理委員会の承認の方法にて行っている(表3)。

表2. GluRサブユニット命名法

	NC-IUPHAR subunit nomenclature	Previous nomenclatures	Human gene name
AMPA	GluA1	GLU _{A1} , GluR1, GluRA, GluR-A, GluR-K1, HBGR1	<i>GRIA1</i>
	GluA2	GLU _{A2} , GluR2, GluRB, GluR-B, GluR-K2, HBGR2	<i>GRIA2</i>
	GluA3	GLU _{A3} , GluR3, GluRC, GluR-C, GluR-K3	<i>GRIA3</i>
	GluA4	GLU _{A4} , GluR4, GluRD, GluR-D	<i>GRIA4</i>
Kainate	GluK1	GLU _{K5} , GluR5, GluR-5, EAA3	<i>GRIK1</i>
	GluK2	GLU _{K6} , GluR6, GluR-6, EAA4	<i>GRIK2</i>
	GluK3	GLU _{K7} , GluR7, GluR-7, EAA5	<i>GRIK3</i>
	GluK4	GLU _{K1} , KA1, KA-1, EAA1	<i>GRIK4</i>
	GluK5	GLU _{K2} , KA2, KA-2, EAA2	<i>GRIK5</i>
NMDA	GluN1	GLU _{N1} , NMDA-R1, NR1, GluR ζ 1	<i>GRIN1</i>
	GluN2A	GLU _{N2A} , NMDA-R2A, NR2A, GluRe1	<i>GRIN2A</i>
	GluN2B	GLU _{N2B} , NMDA-R2B, NR2B, hNR3, GluRe2	<i>GRIN2B</i>
	GluN2C	GLU _{N2C} , NMDA-R2C, NR2C, GluRe3	<i>GRIN2C</i>
	GluN2D	GLU _{N2D} , NMDA-R2D, NR2D, GluRe4	<i>GRIN2D</i>
	GluN3A	GLU _{N3A} , NMDA-R3A, NMDAR-L, chi-1	<i>GRIN3A</i>
Orphan	GluN3B	GLU _{N3B} , NMDA-R3B	<i>GRIN3B</i>
	GluD1	GluR δ 1	<i>GRID1</i>
	GluD2	GluR δ 2	<i>GRID2</i>

Greek symbols in NMDA receptor subunit names were applied to the mouse orthologue only.

Neuropharmacology, 2009 January; 56(1): 2-5. doi:10.1016/j.neuropharm.2008.06.063.

表3. 倫理委員会申請研究課題

承認番号	課題名	承認日
2007-12	ラスムッセン症候群等の自己免疫介在性中枢神経系疾患に関する研究 (2007改訂)	2007年7月20日
2008-19	自己免疫介在性中枢神経系疾患に関する国際共同研究	2008年11月28日
2009-25	自己免疫介在神経疾患の免疫調節関連遺伝子の解析	2010年3月30日
2012-3	自己免疫介在性脳炎・脳症の病態解明のための感染症症例に関する研究	2012年10月1日
2012-4	自己免疫介在性脳炎・脳症に関する多施設共同研究2012	2012年10月1日
2012-5	自己免疫介在性脳炎・脳症の病態解明ための精神症状例に関する研究	2012年10月1日
2012-12	自己免疫介在性脳炎・脳症に関する前駆期研究	2012年12月14日

C. 研究結果

1. 急性辺縁系脳炎・脳症の多施設共同研

2. 究による症例の収集

2010年-2012年の集積数は、NHALE (約140例/年)、卵巣奇形腫合併脳炎 (約15例/年)、痙攣重積型脳炎 (約40例/年)、その他の急性脳炎 (約70例/年)、局在関連性てんかん (約100例/年) など、合計約670例/年であった (表4)。

3. 「急性辺縁系脳炎等の自己免疫介在性脳炎・脳症」の診断スキームの改訂

2012年度は、2010年10月にホームページに掲載した診断スキーム

(<http://www.shizuokamind.org/images/stories/pdf/06-1-2-15.pdf>) を見直し、NMDA型GluR構造と抗GluR2 (NR2B) 抗体の項に最近の知見を加えた (参照2-資料9)。また、自己抗体介在性脳炎の特徴として、最近明らかになってきた抗AMPA抗体、抗GABA_BR抗体、抗LGI1抗体、抗CASPR2抗体、抗NAE抗体などの自己抗体の関係する脳炎の特徴を序論のところにもまとめ、7つの最近の文献を紹介した

(<http://www.shizuokamind.org/wp-content/uploads/2012/03/scheme20130317.pdf>) (高橋)。

4. NHALE患者にみられる既往歴の検討

NHALE患者のうち非傍腫瘍性NHALE患者217名を対象として、既往歴について後方視的に資料を検討した。精神障害関連既往症が21

名 (10%) で、自己免疫性疾患関連が9名 (4%) で、婦人科関連が8名 (4%) でみられた。精神障害関連既往症の内訳は、気分障害8名、依存症8名、発達障害5名だった (西田)。

5. NHALE患者の前駆期自己免疫状況の検討

髄液データのある非傍腫瘍性NHALE217例の中で、前駆期ありと推定できる症例が47例あり、前駆期保存検体がありそうな症例は数例あったが、紹介元病院で血清などの保存は必ずしも行われていない現状から、これまでの症例の前駆期の血液あるいは髄液の自己免疫病態の検討は困難と推定した。

そこで、これまでに集積した症例あるいは、患者会の協力を得て、NHALE発病前に献血のある症例で、献血保存検体を使用する研究を行うこととした。院内の倫理委員会で「自己免疫介在性脳炎・脳症に関する前駆期研究」を審議いただき、承認を得た。その後、2013年1月に日赤血液センターの公募研究に応募した。許可が出次第、献血保存血清の血液脳関門攻撃因子 (MMP-9)、サイトカイン (BioPlex)、細胞傷害性T細胞因子 (granzyme B)、自己抗体 (NR2B, NR1, GluR2, LGI1, Caspr2, ADAM22, ADAM23, NMDAR複合体) 等を測定する。現在6名の患者さんからご協力の申し出を得ている (高橋)。

6. NHALE前駆期の可能性のある精神・神経症

状のある若年者の検体の自己免疫状況の検討

思春期から成人期にうつなどの精神症状を呈した症例19例の髄液で検討した。検査時年齢(平均±SD)は 36.6 ± 15.5 歳であった。抗NR2B-NT2抗体(平均±SD)(最低-最高)は 0.358 ± 0.153 ($0.183-0.719$)で、半数が疾病対照の平均+2SDを超えていた。抗NR1-NT抗体は 0.533 ± 0.135 ($0.376-0.699$)で、3/4が疾病対照の平均+2SDを超えていた。抗GluR δ 2-NT抗体は 0.468 ± 0.166 ($0.255-0.820$)で、6/16が疾病対照の平均+2SDを超えていた。今後臨床症状との関係を含め、症例を増やして検討したい(高橋)。

7. NHALE患者にみられる先行症状の検討

207例(男、87例;女、120例)中162例(78%)に先行症状を認め、162例中23例(14%)で感染病原体が確定された。先行症状がありながら病原体の確定ができなかった139例について先行症状を検討すると、発熱(81%)>頭痛(53%)>悪心嘔吐(24%)>上気道炎症状(18%)>下痢(3%)の順で、上気道炎などの局所感染症状は比較的少なかった。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。先行症状から脳炎発症までの期間は、インフルエンザ(平均4.3日)、上気道炎(平均5.4日)、下痢(平均5.5日)では、無菌性髄膜炎(平均8.7日)より有意に短かった(高橋)。

8. NHALE先行感染症期における一般・免疫マーカーの検討

髄液抗NMDAR抗体陽性非傍腫瘍性NHALE217例中40例で一般臨床検査値を収集できた。今後詳細に検討する予定である。

先行症状期の保存検体の収集は、前方視的に依頼しているが、集まっていない。今後も依頼を継続していく予定である(高橋)。

9. 浮遊系293F細胞を用いた抗NMDAR抗体ならびに抗デルタ型GluR抗体測定系の開発

簡便で定量性の高い自己抗体検出系を確立するために、浮遊性293F細胞株を用いた安定発現株の作製とFACSによる自己抗体解析系の確立を進めている(森)。

10. Autoimmune Encephalitis Mosaic1キットによる自己抗体スクリーニングの検討

Euroimmune社製のAutoimmune Encephalitis Mosaic1のキットを用いて測定したところ、髄液の抗NMDAR抗体は卵巣奇形種合併脳炎1検体で陽性、他の疾患ではすべて陰性であった。血清の抗NMDAR抗体はNHALEの1/4で±、脳炎後部分てんかんの1/3で±、傍腫瘍性症候群の3/4で±、亜急性脳炎の1/2で±、VGKC抗体陽性脳炎で陰性であった(表5)。

抗AMPA R1抗体はすべての髄液、血清検体で陰性であった。髄液抗AMPA R2抗体は再発性脳炎の1/2で±であった以外はすべて陰性であった。血清抗AMPA R2抗体はすべての検体で陰性であった。

髄液抗CASPR2抗体はすべての検体で陰性、血清抗体は痙攣重積型脳症、精神症状症例で±であった。

髄液抗LGI1抗体は脳炎後部分てんかん症例2/3で±、他は陰性で、血清抗体は痙攣重積型脳症1例、橋本脳症2/3例、脳炎後部分てんかん2/3例、精神症状1例で±であったが、抗VGKC抗体陽性例では2例とも陰性であった。

髄液抗GABA_BR抗体は全例陰性で、血清抗体は痙攣重積型脳症1/1例、脳炎後てんかん1/3例、傍腫瘍性症候群1/4例、精神症状例1/1例で±であった(高橋)。

11. NHALEの神経細胞死に対する細胞傷害性T細胞の役割の検討

髄液はNHALE45検体、疾病対照47検体を解析、血清はNHALE43検体、対照18検体のデータを解析した。

血清granzyme B濃度はNHALEと対照との間に有意差がなかった。発病から20病日以内の髄液granzyme Bは疾病対照に比べ有意に高値で($p < 0.0009$)、髄液細胞数との間に正の相関があった($p < 0.005$)。血清と髄液のgranzyme Bの値に相関関係はなかった。髄液granzyme Bが疾病対照の平均+2SD以上の群ではそれ以下の群と比べて、抗NR2B-NT2抗体、抗NR2B-CT抗体、抗NR1-NT抗体、抗NR1-CT抗体が有意に高値であった。髄液granzyme Bは予後(急性期入院日数、Barthelスコア)との関連は認めなかった(高橋)。

12. 抗NMDAR抗体のシナプスNMDA型GluRに対する作用の検討

NHALE、疾病対照髄液を加えた培養ラット胎

児神経細胞系では平均 LDH 比が 1.00 以上であったが、NHALE 髄液 IgG を加えた系では平均 LDH 比が 1.00 以下で、髄液を加えた系に比べて有意に LDH 濃度比が低値であった。

培養ラット胎児神経細胞 tCREB 濃度比は、NHALE 髄液を加えた系では疾病対照を加えた系に比べて有意に高値であった。NHALE 髄液 IgG を加えた系の tCREB 濃度比は、疾病対照髄液を加えた系に比べて有意に高かった。NHALE 髄液を加えた系の 7DIV の pCREB 濃度比は、疾病対照髄液を加えた系と有意差がなかったが、10DIV の NHALE 髄液による pCREB 濃度比に比べて有意に高値であった。7DIV での NHALE 髄液による pCREB 濃度比は、NHALE 髄液 IgG を加えた系の pCREB 濃度比に比べて有意に高値であった。NHALE 髄液 IgG を加えた系では、7DIV での pCREB 比が平均 1.47 (>1.00) であり、CREB リン酸化は障害されることなく軽度亢進していた (高橋)。

13. NHALE 後遺症期患者の非脳炎感染症時に

おける一般・免疫マーカーの経時的変化

現在のところ、NHALE 回復後の患者さんで、上気道炎などの感染症罹患時の血清などを収集できていない。今後紹介医に依頼していく (高橋)。

14. 健康対照の非脳炎感染症時における一

般・免疫マーカーの経時的変化

てんかん患者の上気道炎などの感染症罹患時の血清12検体を収集した。今後さらに検体を

集める予定である (高橋)。

15. 免疫調節遺伝子 (Foxp3, CTLA-4, PDCD-1, T-bet) の発現を検討 (Real-Time PCR)

成人NHALE18例、小児NHALE15例、成人卵巣奇形種合併脳炎8例の測定を行った。今後データの増加を待つ解析を進める予定である (高橋)。

16. 免疫調節遺伝子 (Foxp3, CTLA-4, PDCD-1, T-bet) のSNPの検討

成人NHALE25例、小児NHALE9例、成人卵巣奇形種合併脳炎9例、小児痙攣重積型脳炎11例局在関連性てんかん5例、健康対照13例などの測定を行った。今後データの解析を進める予定である (高橋)。

17. アジア地域での原因不明脳炎患者の抗 NMDAR抗体の検討

アジア地域の原因不明脳炎の多数サンプル解析では、抗NMDAR抗体の検出頻度ならびに抗体価が非常に低い事が明らかとなった (森)。

18. NHALE急性期の抗体産生に関わるNMDAR 抗原の検討

成人NHALE16例、小児NHALE7例、成人卵巣奇形種合併脳炎8例、小児痙攣重積型脳炎8例、健康対照1例などの、末梢血のRNAを用いたGluR 発現量の測定を行った。今後データを増やしたのち解析を進める予定である (高橋)。

表4. 多施設共同研究の症例収集状況 病態分類別症例数

	201011-201110	201111-201210
非ヘルペス性急性辺縁系脳炎	136	141
卵巣奇形腫合併脳炎	20	14
痙攣重積型脳炎	44	37
脳幹脳炎	1	6
その他の急性脳炎	72	67
CNS ループス	6	11
橋本脳症	4	13
ADEM	7	7
再発性脳炎	19	29
亜急性脳炎	49	46
傍腫瘍性脳炎	7	2
ALS	10	7
CJD	17	7
精神疾患	26	29
Rasmussen 症候群	28	24
局在関連性てんかん	100	101
West 症候群	7	6
症候性全般てんかん	11	9
小脳炎	44	31
不随意運動	7	8
その他	63	79
合計	678	674

表5. Autoimmune Encephalitis Mosaic1キットによる自己抗体判定結果

疾患		NMDAR	AMPA1	AMPA2	CASPR2	LGI1	GABAR1
NHALE	血清	±, 1 ; -, 3	-, 4	-, 4	-, 4	-, 4	-, 4
	髄液	-, 4	-, 4	-, 4	-, 4	-, 4	-, 4
卵巣奇形腫 合併脳炎	血清	±, 1	-, 1	-, 1	-, 1	-, 1	-, 1
	髄液	+, 1 ; -, 1	-, 2	-, 2	-, 2	-, 2	-, 2
再発性脳炎	血清	-, 2	-, 2	-, 2	-, 2	-, 2	-, 2
	髄液	-, 2	-, 2	±, 1 ; -, 1	-, 2	-, 2	-, 2
痙攣重積脳 症	血清	-, 1	-, 1	-, 1	±, 1	±, 1	±, 1
	髄液	-, 1	-, 1	-, 1	-, 1	-, 1	-, 1
橋本脳症	血清	-, 3	-, 3	-, 3	-, 3	±, 2 ; -, 1	-, 3
脳炎後部分 てんかん	血清	±, 1 ; -, 2	-, 3	-, 3	-, 3	±, 2 ; -, 1	±, 1 ; -, 2
	髄液	-, 3	-, 3	-, 3	-, 3	±, 2 ; -, 1	-, 3
傍腫瘍症候 群	血清	±, 3 ; -, 1	-, 4	-, 4	-, 4	-, 4	±, 1 ; -, 3
	髄液	-, 3	-, 3	-, 3	-, 3	-, 3	-, 3
精神症状	血清	-, 1	-, 1	-, 1	±, 1	±, 1	±, 1
	髄液	-, 1	-, 1	-, 1	-, 1	-, 1	-, 1
抗VGKC抗体 脳炎	血清	-, 2	-, 2	-, 2	-, 2	-, 2	-, 2
	髄液	-, 2	-, 2	-, 2	-, 2	-, 2	-, 2
亜急性脳炎	血清	+, 1 ; -, 1	-, 2	-, 2	-, 2	-, 2	-, 2
	髄液	-, 2	-, 2	-, 2	-, 2	-, 2	-, 2

NMDAR, N-methyl-D-aspartate-type glutamate receptors; AMPAR, alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid-type glutamate receptors; AMPAR1, GluR1; AMPAR2, GluR2; CASPR2, contactin-associated protein 2; LGI1, leucine-rich glioma-inactivated protein 1; GABAR1, gamma-aminobutyric acid receptors B1; +, positive; ±, weak positive; -, negative; NHALE, nonherpetic acute limbic encephalitis; VGKC, voltage-gated potassium channel. +, 1 ; -, 1は陽性1検体、陰性1検体を示す。

D. 考察

前駆期に関する研究

1. NHALE患者にみられる既往歴の検討

NHALE患者の10%に、うつなどの気分障害およびアルコールや覚醒剤に対する依存症が既往歴として見られたが、いずれも辺縁系の機能障害との関連が示唆されており、抗NMDA型GluR抗体が何らかの影響を及ぼし、NHALEの前駆期の精神障害関連既往症をもたらしているとする仮説と矛盾しないと考えた。

Dalmauらの提唱する抗NMDA受容体自己抗体陽性脳炎では、100例中77例で不安、焦燥、奇異な行動、妄想、幻視、幻聴などの精神症状を呈した。また、3週間の経過のうちに88例が意識障害を呈し、緊張病様状態に進展した。一方、NHALEでも統合失調症様の精神症状で発病することが多く、抗NMDA受容体自己抗体陽性脳炎と共通の病態基盤がある可能性が考えられている。NMDA型GluR阻害作用をもつケタミン、フェンサイクリジンなどは統合失調症の陽性症状、陰性症状、認知機能障害と類似した症状を惹起することが知られておりNMDA型GluRと各種精神症状の関連が示唆されている（西田）。

2. NHALE前駆期の可能性のある精神・神経症状のある若年者の検体の自己免疫状況の検討

思春期から成人期にうつなどの精神症状を呈した症例では抗NR2B-NT2抗体が半数の症例で高値であり、抗NR1-NT抗体は3/4で高値、抗GluR δ 2-NT抗体は6/16で高値であり、精神症状、一過性の認知機能障害を呈する症例の中には、抗NMDAR抗体が関与するものがありそうである。よって、縦断的な証明はできていないが、うつなどの気分障害およびアルコールや覚醒剤に対する依存症が抗NMDAR抗体によりもたらされ、前駆期の既往歴を形成し、その後大量に抗NMDAR抗体が作用したり、あるいは他の病態も加わったりし、NHALEを発病する可能性があるかと推測した（高橋）。

3. 今後の方針

献血保存血清による研究の日赤承認を待って、血清中の自己免疫マーカーの研究を進める。また、非脳炎症例で精神症状、認知機能障害のある症例で、症状の内容と抗NMDAR抗体との関連を検討し、前駆期症状の早期発見につなげた

い（西田、高橋）。

先行症状期に関する研究

1. NHALE患者にみられる先行症状の検討

今回の207例のNHALEの検討では、NHALEの30-70%は、局所の感染症が先行しない無菌性髄膜炎で発病していると推定された。このような症例では先行症状から脳炎発症までが長く、前駆期から存在する抗NMDAR抗体が何らかの原因による緩徐な経過の血液脳関門障害で中枢神経系に至り、NMDA型GluRの内在化を起し、辺縁系脳炎を発病させていると推定した。この群のNHALEでは前駆期に抗NMDAR抗体の除去や血液脳関門障害の治療を行うことで、NHALEの発病予防が可能となる可能性がある。また、先行症状期に抗NMDAR抗体や血液脳関門障害によりNHALEリスクの存在の診断が可能となり、早期脳炎治療開始により予後が改善できる可能性がある。

一方、インフルエンザウィルス感染症などの局所感染症が先行する症例も25-70%存在し、そのような症例では先行症状から脳炎発症までが短く、先行感染症による急性の血液脳関門障害に伴い、抗NMDAR抗体が中枢神経系に至りNMDA型GluRの内在化を起し、辺縁系脳炎を発病させていると推定できる（高橋）。

2. 今後の方針

先行症状期の一般臨床検査値の検討を進め、早期診断を可能にする。また引き続き、先行症状期の保存血清の確保に努める（高橋）。

発病期に関する研究

1. NHALEの神経細胞死に対する細胞傷害性T細胞の役割の検討

今回のNHALEの血清、髄液granzyme Bの検討では、平均髄液granzyme B濃度が疾病対照に比べて有意に高く、髄液granzyme B濃度が髄液細胞数と相関したことから、髄液中の細胞傷害性T細胞からのgranzyme B分泌が起こっている可能性が示唆された。中枢神経系での細胞傷害性T細胞を標的とした治療が、予後を改善する可能性がある。

また髄液granzyme B濃度の高い群で髄液抗NR抗体が高値であったことから、granzyme B

による細胞傷害により遊離したNMDA型GluRが抗原となって中枢神経系内で抗NMDAR抗体が産生されている可能性が示唆された。この抗NMDAR抗体が、後遺症としての認知機能低下に関与している可能性があり、抗NMDAR抗体を標的とした治療が、予後を改善していきける可能性がある。髄液granzyme Bと予後因子が関連を示さなかった点は、用いた因子が重篤度をうまく反映していないためかもしれない（高橋）（図3）。

2. 抗NMDAR抗体のシナプスNMDA型GluRに対する作用の検討

今回の培養ラット胎児神経細胞に対するNHALE髄液あるいは髄液IgG分画の生物学的影響の検討から、以下のことが明らかになった。

①髄液を加える系ではNHALEも疾病対照もLDH比が1.00以上であり、対照髄液の中にも初期の培養ラット胎児神経細胞を細胞死に導く因子が含まれていることを示唆し、生理的なアポトーシス誘導因子かもしれない。

②NHALE髄液の中には7DIVから10DIVにかけて失活する、軽いt CREB増加因子があり、IgG分画もわずかにt CREB増加作用を有する。おそらくはNHALE髄液内の細胞死誘導因子でアポトーシスに傾くために、その代償として細胞生存のためのt CREBが増えているものと推定した。

③NHALE及び対照髄液の中には、7DIVから10DIVにかけて失活するIgG以外の強いp CREB増加因子が存在する。おそらくは成長因子や神経伝達物質やホルモンなどが関与しているものと思われる。NHALE髄液IgG分画も1.47倍にp CREBを増加させることから、抗NMDAR抗体がシナプス外NMDA型GluRを内在化することでシナプス外NMDA型GluRによるCREBリン酸化抑制を抑制することで、CREBリン酸化が増えている、あるいはシナプスNMDA型GluRを活性化させてCREBリン酸化が増えている可能性がある。

NHALE髄液IgGによりCREBリン酸化が障害されないことから、抗NMDA型GluR抗体によるシナプスNMDA型GluRの内在化（減少）は起こらない、起こっても軽度と推定される。おそらくはシナプスNMDA型GluRが多くの蛋白でシナプスにアンカーされているため内在化が困難であるためと思われる。Dalmauらの免疫組織検討でもシナプスNMDA型GluRは保持されているように見

える。

以上から、NHALEの髄液成分は抗NMDAR抗体のみならず、granzyme Bなど複数の因子が病態に影響していて、複雑な病態を形成しているものと思われる（高橋）（図3）。

3. 今後の方針

発病期の自己抗体産生のメカニズムを明らかにするために、末梢血におけるNMDA型GluR抗原等の発現検討をさらに進め、免疫調節遺伝子の発現量を検討する。神経細胞死の病態を、自己抗体、granzymeB以外の因子についても検討を行い、予後の改善につなげる（高橋）。

その他の研究

1. Autoimmune Encephalitis Mosaic1キットによる自己抗体スクリーニングの検討

Euroimmune社製のAutoimmune Encephalitis Mosaic1のキットを用いて、髄液、血清のスクリーニングを検討した。痙攣重積型脳症の血清は抗GABA_BR抗体、抗LGI1抗体、抗CASPR2抗体について弱陽性であり、この検出系には特異性の問題がある可能性がある。抗VGKC抗体陽性例の血清では抗LGI1抗体、抗CASPR2抗体ともに陰性であり、これらの抗体検出系の感度が低いと思われる。抗AMPA抗体は再発性脳炎の1例の髄液で弱陽性であったが、感度がやはり低い可能性がある。抗NMDAR抗体は髄液では卵巣奇形種合併脳炎1検体で陽性、他の疾患ではすべて陰性であり、特異性が高い可能性があるが、卵巣奇形種合併脳炎でも陰性例があり、抗NR2B-NT2抗体がELISAで高い症例でも陰性であり、感度が低い可能性がある。キットにはポジコン血清が1種類ついているのみであるため、判定が困難な面があり、多種類の自己抗体を判定できるようになるには複数回購入し、熟練を要する（高橋）。

2. 自己抗体測定系の改良

抗NMDAR抗体の、より簡便で定量性の高い検出系を確立するために、浮遊性293F細胞株を用いた安定発現株の作製とFACSによる自己抗体解析系の確立を進め、ビーズ法による抗体測定系確立の検討を行っていく（森、高橋）。

3. 自己免疫介在性脳炎・脳症の診断スキームの作成

2012年度は「急性辺縁系脳炎等の自己免疫介

在性脳炎・脳症」の診断スキームの自己抗体部分をアップデートした（参照2：
<http://www.shizuokamind.org/wp-content/up>

loads/2012/03/scheme20130317.pdf)。今後さらに病態等の知見を加えていく予定である。

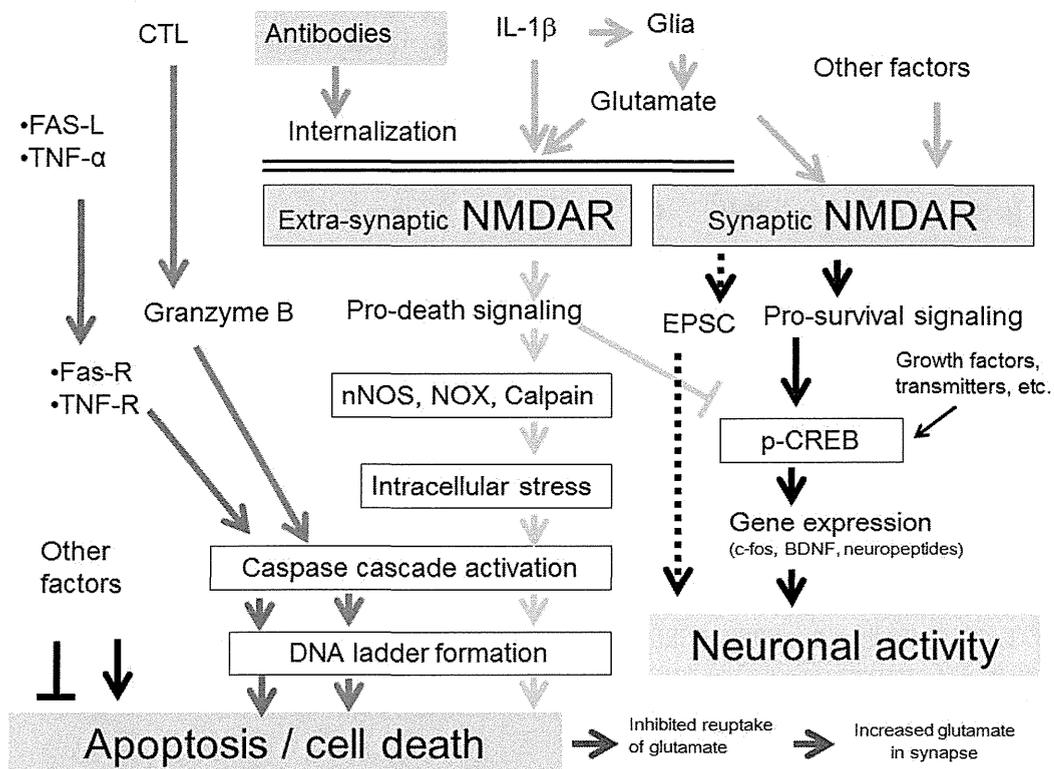


図3. NHALEの病態仮説

E. 結論

NHALE既往歴の検討からは①NHALE患者の10%に、うつなどの気分障害およびアルコールや覚醒剤に対する依存症が既往歴として見られること、②思春期から成人期にうつなどの精神症状を呈した症例の髄液中に、抗NMDAR抗体陽性例がかなり存在すること、先行症状期の検討から③中枢神経系以外の感染症が先行せず、髄膜炎で発病している症例がかなりに上ることが明らかになった。これら①-③の知見は、NHALE患者に抗NMDAR抗体がかなり以前から存在し、軽度の精神神経症状を呈しうる前駆期があるとする理解しやすい。

NHALE発病期の検討では、①抗NMDAR抗体などの自己抗体がシナプス外NMDARを内在化し、アポトーシスを抑制していること(2010年度報告)、②抗NMDAR抗体などの自己抗体によるシナプスNMDARの内在化は乏しいこと、③髄液のIgG以外の成分に、アポトーシス促進因子が含まれ、④granzymeBはアポトーシス促進因子の一つであること、⑤髄液のIgG以外の成分に t CREB、pCREB 増加因子が含まれることが明らかになった。

Euroimmune社製のAutoimmune Encephalitis

Mosaic1のキットを用いた抗NMDAR抗体、抗AMPA抗体、抗GABABR抗体、抗LGI1抗体、抗CASPR2抗体のスクリーニングには課題が多く、現状では臨床的には用いることは難しいと考えた。抗NMDAR抗体をはじめ、個々の自己抗体の感度、特異度の高い、簡便な測定法の開発が望まれる。

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
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

参照3

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）
総括研究報告書

非ヘルペス性急性辺縁系脳炎の前駆期-先行感染症期の病態解明による 障害防止研究

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・神経医療センター副院長

研究要旨

【目的】我々のこれまでの研究で、成人発病の非ヘルペス性急性辺縁系脳炎（NHALE）は年間220人が罹患していて、記憶障害は63.2%に残り、1万人程度がNHALEによる記憶障害などの後遺障害を患っている可能性が明らかになっている。これらの障害を防ぐために、発病の数年前の前駆期、発病直前の先行症状期に着目し、その病態を明らかにすることで、早期診断治療、発病予防につなげたい。

【前駆期-既往歴研究】卵巣奇形腫を主体とした傍腫瘍性NHALE患者107名中に、産婦人科関連既往症が9名（8%）、精神障害関連が5名（5%）、脳炎・髄膜炎が4名（4%）、てんかんが3名（3%）みられた。産婦人科関連の内訳は、妊娠中・出産直後・帝王切開4名、卵管手術2名、子宮頸癌1名、子宮筋腫手術1名、不妊治療1名だった。精神障害関連既往症の内訳は、気分障害3名、不安障害1名、摂食障害1名だった。

【前駆期-正常対照の抗体値研究】0-20歳の非炎症性の病因のてんかん症例（55例）と、静岡てんかん・神経医療センター職員（74例）の血清を用いて、正常対照のグルタミン酸受容体（GluR）抗体（抗原：GluN2B-NT2, GluN1-NT, GluD2-NT）を検討した。20-40歳の女性の中に、回帰曲線からかなり外れた高い値をとる群が存在し、NMDA型GluR抗体が高い前駆期症例の存在を示唆した。

【前駆期-passive transfer研究】ウサギGluN2B-NT2抗体をマウス海馬に投与し、Irwin法で行動観察を行ったところ、生理食塩液投与群と正常ウサギ血清protein A 吸着fraction投与群と比較して、有意な行動変化を見だし、現在検討中である。

【前駆期-てんかん精神病患者研究】てんかん精神病患者23名中3名（13%）が血清GluR抗体高値を示したが、3名は発作間欠期精神病の病像を有し、発病から検査までの期間が1年以内と短かった。てんかん精神病の一部が、NHALEの前駆期症状を示している可能性がある。

【先行症状期-一般検査値研究】非傍腫瘍性NHALE42例、てんかん患者で感染症状を呈した年齢・性を合わせた感染症対照42例、年齢・性を合わせた感染のないてんかん小児と健康成人対照42例について、一般臨床検査値を比較検討した。非傍腫瘍性NHALEのリンパ球数は感染症対照（ $p < 0.01$ ）、対照（ $p < 0.01$ ）に比べて有意に低値で、発病日に向けて低下する傾向を認めた。血小板数は感染対照（ $p < 0.05$ ）や対照（ $p < 0.01$ ）より有意に低値であった。CRPは、発病日に向けて増加する傾向を認め、対照（ $p < 0.02$ ）より有意に高値であったが、感染症対照（ $p < 0.01$ ）より有意に低かった。IgAは感染症対照（ $p < 0.03$ ）や対照（ $p < 0.01$ ）より有意に高値であった。

【発病期-患者髄液in vitro研究】培養ラット胎児神経細胞にNMDA型GluR抗体陽性NHALE患者髄液あるいは患者髄液IgG分画を加え、培養細胞の総Akt濃度およびリン酸化Akt濃度の変化を見た。NHALE髄液（IgG及びIgG以外の成分）は、対照髄液に比べてAktリン酸化に特異的な影響を示さなかった。

【発病期-髄液NMDA型GluR抗体IgGサブクラス研究】非傍腫瘍性NHALE髄液では、IgG 1-4すべて

のサブクラスが疾病対照髄液に比べて高値であった。脳炎発病後の経過で見ると、発病から10-15病日にかけてIgG1、IgG3のサブクラスが高値となる検体が増加、IgG4サブクラスは徐々に低値の検体が増加した。IgG1サブクラスは、急性期入院日数・てんかん発作予後・認知機能予後と直線的回帰が認められ、相関関係が認められた。IgG3サブクラスは、Barthel score・てんかん発作予後・認知機能予後・運動機能予後と直線的回帰が認められ、相関した。サブクラスと関係する補体が予後を規定している可能性がある。

【その他-新規抗体測定系開発研究】浮遊性293F細胞株を用いたデルタ型GluRの安定発現細胞株を得た。今後、cell-based assayによるGluR δ 2 抗体の測定系を開発する。

【まとめ】NHALE患者には、発病のかなり前からNMDA型GluR抗体が存在し、前駆期として軽度の精神神経症状を呈し得る。先行症状期にはリンパ球・血小板が減少することが明らかとなり、リンパ球・血小板に発現するNMDA型GluRが抗原として抗体をブースターし、発病に至る可能性がある。NHALE発病期の病態はNMDA型GluR抗体のみでは説明できず、granzymeB、補体などの複数の因子が関与していると考えられる。

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。
- 西田拓司、静岡てんかん・神経医療センター、精神科医長。

研究協力者：

- 宮 一志、富山大学大学院医学薬学研究部小児科学講座、助教。
- 田村賢太郎、富山大学大学院医学薬学研究部小児科学講座、医員。
- 千葉悠平、横浜市立大学、精神科。
- 西村成子、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。
- 高尾恵美子、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。
- 笠井理沙、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。
- 平松宏美、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。
- 井上有史、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。

- 東本和紀、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。
- 吉富晋作、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。
- 渡辺陽和、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。
- 植田佑樹、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。
- 山口解冬、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。
- 那須裕郷、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。
- 大谷英之、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。
- 池田浩子、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。
- 今井克美、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。
- 重松秀夫、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。

A. 研究目的

1. 2011年度までの研究のまとめ

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2008-10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、非ヘルペス性急性辺縁系脳炎（NHALE）を中心に病態解明を行い（参照1：2008-2010研究班総合報告書）、「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-にまとめた。

2. 後遺障害の頻度

我々のこれまでの研究で、成人発病のNHALEは年間220人が罹患していて、ADL障害は33.3%に、てんかん発作は35.1%に、精神症状は26.3%に、知的障害は38.6%に、運動障害が29.8%に、記憶障害は63.2%に見られ、1万人程度がNHALEによる記憶障害などの後遺障害を患っている可能性が明らかになっている。

免疫介在性脳炎であるNHALEは、病態解明、早期診断、治療法改良により予後を改善できる可能性があり、この研究班では病態解明に取り組んできている。

3. 2012年度からの研究仮説

NHALE 100例の既往歴を調査すると、脳炎発病の数年前（前駆期と呼ぶ）から、うつ症状（6例）、薬物等依存（5例）、発達障害（5例）等が見いだされ、前駆期からすでに18例で何らかの中枢神経症状が始まっている可能性が示唆された。またNHALEには、急性期に言動異常が1-2日あるのみで発熱や痙攣や意識障害がなく収束し、その後記憶障害が明らかとなる軽症例も見られる。また、脳炎症状が再発性の経過をとる症例も存在する。これらの事実は、NHALEの発病前の前駆期からNMDA型GluR抗体が存在し、軽度の一過性中枢神経系症状を発現する可能性を示唆する（図1、2）。視神経脊髄炎（NMO）

では発症の10年前からAQP4抗体が認められた症例が東北大学より報告されており（Nishiyama, et al., Neurology）、抗体が血清中に存在する前駆期が、かなり長く存在することが分かっている。

これまでの研究で、NMDA型GluR抗体のエピトープはGluRの細胞外ドメインから細胞内ドメインまで幅広いことが分かり、NMDA型GluR抗体は感染交差免疫ではなくNMDA型GluR自身が抗原となって産生されていることを推測している。末梢血T細胞、血小板などにNMDA型GluRが発現し、PHA刺激で発現増加することが知られており（Migilio, et al. BBRC 2005）、感染によるリンパ球の活性化→NMDA型GluR発現→リンパ球アポトーシス→NMDA型GluR断片化→NMDA型GluR抗体産生という仮説を立てている（図2）。脳炎発病数年前（前駆期）からこのプロセスが徐々に始まり、一部の症例では軽度の中枢神経症状が観察され、その後先行感染症に伴ってNHALEが発病するという病態仮説のもとに、これまで国内外で検討されてこなかった前駆期と発病直前の先行症状期の病態を詳しく検討し、先行症状出現時点でのNHALE発病リスク診断、NHALE発病抑止対策、早期治療を、今回の研究では可能にする。

目的: NHALE前駆期—先行感染症期の病態解明 → 障害の防止・軽減

方法: A) 前駆期自己免疫状況

- ① NHALE症例の前駆期保存検体
- ② 若年成人で精神・神経症状のある症例

B) 感染症に対する生体反応

- ① NHALE先行感染症における経時的变化
- ② NHALE後遺症期患者の非脳炎感染症時における経時的变化
- ③ 健康対照の非脳炎感染症時における経時的变化

C) 病歴

NHALE患者既往歴・家族歴

効果:

リスク因子

早期発病リスク診断

発病予防・早期治療

障害の防止・軽減

検討項目

一般検査:
WBC, LDH, etc.
免疫関連:
granzyme B, Fas, cytokine, etc.
血液脳関門:
MMP-9, TIMP-1, etc.
自己抗体:
抗NR2B, NR1, GluR82, LGI1,
Caspr2, ADAM22, ADAM23抗体、
抗NMDAR複合体抗体。

免疫調節遺伝子発現

免疫調節遺伝子ゲノム

NHALE発病
先行因子

図1. 研究の目的、方法及び期待される効果（流れ図）

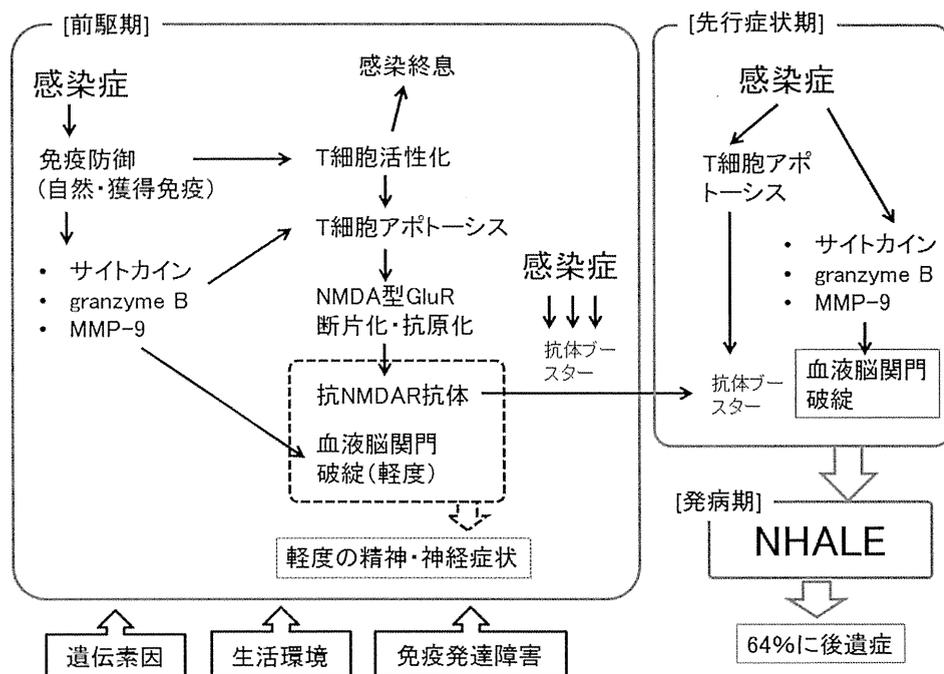


図2. 研究仮説

4. 2012年度研究結果 (参照 2)

非傍腫瘍性NHALE患者217名の検討では、精神障害関連既往症が21名 (10%)に、自己免疫性疾患関連が9名 (4%)に、婦人科関連疾患が8名 (4%)にみられた。精神障害関連既往症の内訳は、気分障害8名、依存症8名、発達障害5名であった。

非傍腫瘍性NHALE患者207例中162例 (78%)に先行症状を認め、162例中23例 (14%)で感染病原体が確定された。先行症状がありながら病原体の確定ができなかった139例について検討すると、発熱 (81%) >頭痛 (53%) >悪心嘔吐 (24%) >上気道炎症状 (18%) >下痢 (3%)の順で、上気道炎などの中樞神経系以外の局所感染症状は比較的少なかった。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。

NHALE発病から20病日以内の髄液granzyme B濃度は、疾病対照に比べ有意に高値で ($p < 0.009$)、髄液細胞数との間に正の相関があった ($p < 0.005$)。髄液granzyme Bが疾病対照の平均+2SD以上の群ではそれ以下の群と比べて、NMDA型GluR抗体が有意に高値であった。

培養ラット胎児神経細胞にNMDA型GluR抗体陽性NHALE患者髄液あるいは患者髄液IgG分画を加え、培養上清のLDH濃度、培養細胞の総cA

MP-Responsive-Element-Binding protein (t CREB) 濃度およびリン酸化CREB (pCREB) 濃度を測定し、同時測定対照との比を求めて評価した。NHALE髄液IgGを加えた系では、髄液を加えた系に比べて有意にLDH濃度比が低値であった。NHALE髄液を加えた系の7DIVのpCREB濃度比は、疾病対照髄液を加えた系と有意差がなかったが、10DIVのNHALE髄液によるpCREB濃度比に比べて有意に高値であった。7DIVでのNHALE髄液によるpCREB濃度比は、NHALE髄液IgGを加えた系のpCREB濃度比に比べて有意に高値であった。NHALE髄液IgGを加えた系では、7DIVでのpCREB比が平均1.47 (>1.00)であり、CREBリン酸化は障害されることなく軽度亢進していた。

これらの知見から、NHALE患者ではNMDA型GluR抗体がかなり以前(前駆期)から存在し、軽度の精神神経症状を呈しうるとすると理解しやすい。NHALE発病期の病態はNMDA型GluR抗体のみでは説明できず、granzymeBなどの複数の因子が関与している。

5. 2013年度研究目標

2013年度は表1に示す研究を計画し、前駆期、先行症状期などの病態解析を行うことにした。

表1. 2013年度研究計画内容

「前駆期関連」

1. NHALE 症例の前駆期保存検体を用いた前駆期自己免疫状況の検討

髄液抗体陽性の207例を抽出し、前駆期保存検体の有無、成人例献血（保存検体）の有無をアンケート調査し、協力が得られる症例の血清で血液脳関門攻撃因子（MMP-9）、サイトカイン（BioPlex）、細胞傷害性T細胞因子（granzyme B）、自己抗体（NR2B, NR1, GluRδ2, LGI1, Caspr2, ADAM22, ADAM23, NMDAR複合体抗体）等を測定する。現在9名のNHALE等の脳炎患者さんの献血保存血研究使用同意を得ており、厚労省の使用許可をまって、前駆期の免疫病態を検討する。（目標20例）

2. Passive transfer マウスモデルを用いた前駆期自己免疫状況の検討

NR2Bペプチドに対するウサギ抗体を作成し、マウスにpassive transferを行い、動物モデルで前駆期の免疫病態を検討する。

3. 精神症状を有する症例の精神症状と免疫マーカーの関連を検討

NHALE前駆期の可能性がある精神症状を持つ若年者で、血液・髄液免疫マーカーと精神症状の関連を検討する。（目標20例）

「先行症状期関連」

4. NHALE 先行症状期における一般血液検査値の経時的変化の検討

先行症状期のリンパ球アポトーシス指標としてWBC, LDH、等の値を、感染対照、健康対照と比較する。（目標50例）

5. NHALE 先行症状期における免疫マーカーの経時的変化の検討

先行症状期の血清を集め、MMP-9、サイトカイン（BioPlex）、granzyme B、自己抗体（NR2B, NR1, GluRδ2, LGI1, Caspr2, ADAM22, ADAM23, NMDAR複合体抗体）等の免疫マーカーを、経時的に測定する。（目標50例）

6. NHALE 先行症状期に無菌性髄膜炎を呈した症例の髄液所見の検討

無菌性髄膜炎からNHALEに至った症例(18例確保)と、通常は無菌性髄膜炎のみを呈した症例で髄液所見を比較する。

7. Passive transfer マウスモデルを用いた先行症状期自己免疫状況の検討

NR2Bペプチドに対するウサギ抗体を作成し、マウスにpassive transferを行い、動物モデルで先行症状期の免疫病態を検討する。

「その他」

8. 免疫調節遺伝子（Foxp3, CTLA-4, PDCD-1, T-bet）の発現解析、ゲノム解析

NHALE発病期の血液中RNAを用いて、免疫調節遺伝子の発現を検討し、免疫寛容の状況を調べ、自己抗体形成のメカニズムを検討する。さらに、ゲノムの変異の有無を検討する。

9. 抗神経抗体の測定法開発

抗NMDA型GluR抗体を含む抗神経抗体測定法の改良、開発を行う。

B. 研究方法

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

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3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、自己免疫病態を検討した。

2. 「急性辺縁系脳炎等の自己免疫介在性脳炎・脳症」の診断スキームの改訂

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ふことを目的としている。これまでに明らかになった知見を追加する(高橋、森、西田)。

3. NHALE患者にみられる既往歴の検討

2012年度の非傍腫瘍性NHALEの検討に引き続き、2013年度はNHALE患者のうち傍腫瘍性辺縁系脳炎患者107名で、既往歴について後方視的に資料を検討した(西田)。

4. NHALE患者の前駆期自己免疫状況の検討

2012年度研究で、髄液データのあるNHALE217例で前駆期ありと思われる47例を検討したが、紹介元病院で前駆期の血清などの保存は必ずしも行われていない現状が判明した。2013年度は207例全例にアンケート調査を送付し、前駆期の保存検体を調査する。

NHALE発病前に献血のある症例で、献血保存検体を使用する研究を行うこととし、2012年度に院内の倫理委員会で「自己免疫介在性脳炎・脳症に関する前駆期研究」を審議いただき、承認を得た。その後、2013年1月に日赤血液センターの公募研究に応募した。

紹介元での保存検体の取得、日赤での許可が出次第、保存血清の血液脳関門攻撃因子

(MMP-9)、サイトカイン(BioPlex)、細胞傷害性T細胞因子(granzyme B)、自己抗体(GluN2B, GluN1, GluD2, LGI1, Caspr2, ADAM22, ADAM23, NMDA型GluR複合体)等を測定する(高橋)。

5. NHALE前駆期の可能性のある精神・神経症状を有する若年者の検討：精神疾患

対象は、静岡てんかん・神経医療センターに

入院中の患者で、Structured Clinical Interview for DAM-IV Axis I Disorders

(SCID-I)で、調査時あるいは過去の精神病症状が確認できたてんかん患者23名である。患者血清中のGluN2B-NT2抗体、GluN2B-CT抗体、GluN1-NT抗体、GluD2-NT抗体をELISAにより測定し(高橋、2013)、臨床症状と比較検討した(西田)。

6. NHALE前駆期の可能性のある精神・神経症状を有する若年者の検討：甲状腺自己免疫疾患

抗甲状腺抗体陽性で精神症状のある症例において、NMDA型GluR抗体の有無と精神症状の内容の違いを検討した(千葉、高橋)。

7. 健常者の年齢・性別NMDA型GluR抗体分布と推移

倫理委員会承認の方法で同意を得られた0-20歳の非炎症性の病因のてんかん症例(55例)と、静岡てんかん・神経医療センター職員(74例)の血清を用いて、自己抗体(GluN2B, GluN1, GluD2, LGI1, Caspr2, ADAM22, ADAM23, NMDA型GluR複合体)等を測定する。自己抗体の値と一般臨床検査値との比較を行う(高橋)。

8. NMDA型GluR抗体のPassive transfer-行動解析

ウサギにGluN2B-NT2ペプチドを用いて免疫し、ポリクローナルIgG抗体(ウサギGluN2B-NT2抗体)を得た。ウサギGluN2B-NT2抗体がGluN2B, GluN1を発現するHEK細胞と反応することを確認したのち、マウス脳室内に1週おきに4回投与し、マウスの行動観察(Irwin法)を盲検下にて実施し、中枢神経系への影響を検討した。さらに開始後22日に脳を摘出し、病理組織学的検査を実施した。対照として、生理食塩液、正常ウサギ血清protein A 吸着fraction(以下、正常ウサギ血清)も脳室内に投与する群を作った(高橋)。

9. NHALE患者にみられる先行症状期の一般マーカーの検討

NHALEの先行症状期の病態を明らかにし、早期診断、脳炎発病予防を実現するため、2012年度に髄液抗NMDAR抗体陽性非傍腫瘍性NHALE217例の先行症状期の臨床症状、病原体検索結果