

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

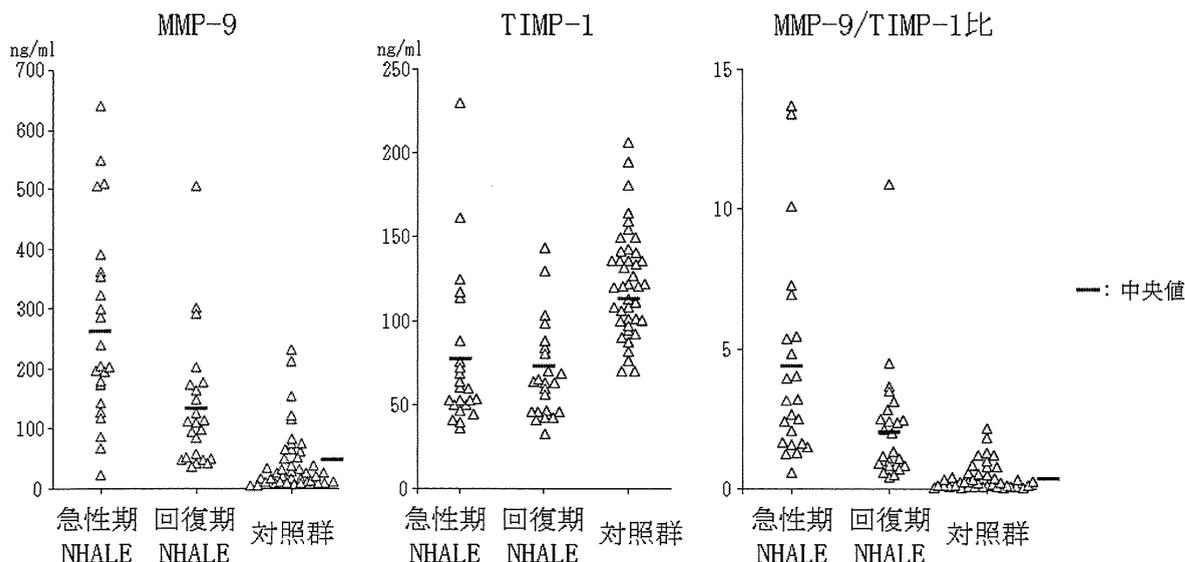
非ヘルペス性急性辺縁系脳炎・脳症 (NHALE) 23 例 (男性 6 例、女性 17 例; 15~79 歳、中央値 32 歳) と正常対照群として健康成人 41 例 (男性 5 例、女性 36 例; 15~78 歳、中央値 39 歳)。

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、中樞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)。

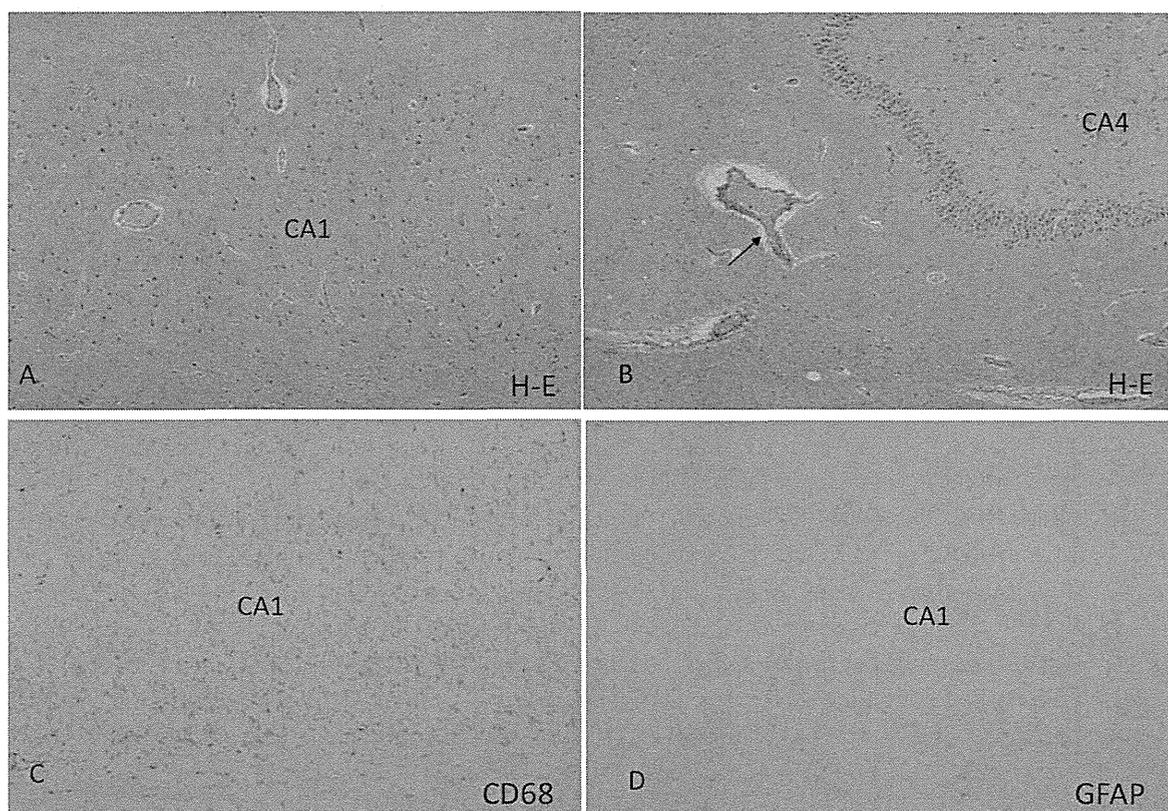


図 1. A-D : 海馬領域. A, C, D は隣接切片.

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パ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、大脳表面や割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。

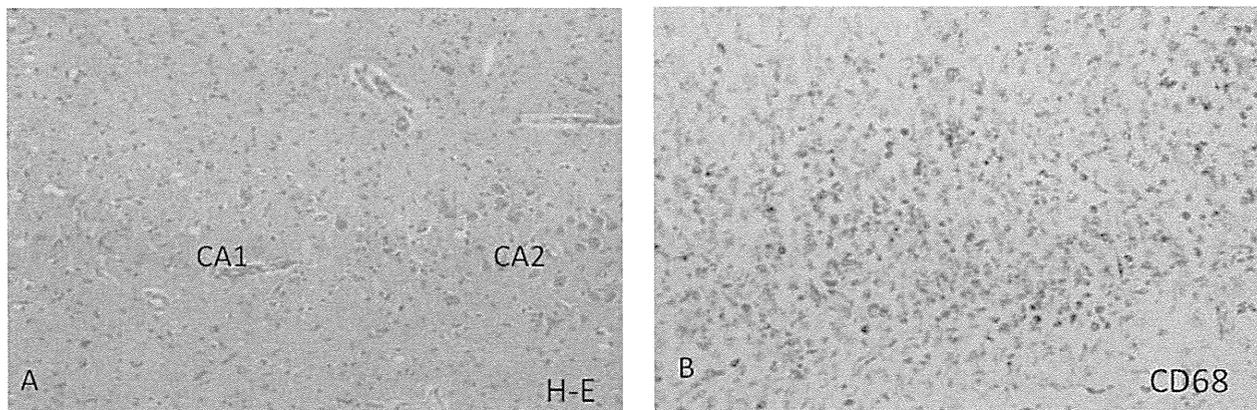


図 2. A と B は隣接切片。

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よく残存しており、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 (NHLE). *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% の症例が社会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±SD) (平均/満点%) で評価すると、ADL (20 点満点) = 17.8 ± 4.7 (89%)、てんかん発作 (4 点満点) = 3.4 ± 0.9 (85%)、精神症状 (2 点満点) = 1.7 ± 0.6 (85%)、知的障害 (5 点満点) = 4.1 ± 1.4 (82%)、記憶障害 (2 点満点) = 1.2 ± 0.8 (60%)、運動障害 (3 点満点) = 2.5 ± 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							
1.排便	0	失禁・おむつ	1	とどき失失敗(1週間に1回程度)	2	自立		
2.排尿	0	失禁、おむつ、またはカテーテルが必要(カテーテルを自分で処理できない)	1	とどき失失敗(24時間に1回以下)	2	自立(1週間以上にわたり1度も失敗がない)		
3.洗顔	0	洗顔、整髪、歯磨き、髪剃りに介護が必要	1	自立(用具の準備してもらってよい)				
4.便器の使用	0	全介助	1	部分介助	2	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	0	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)	1	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)	2	自立(食事は用意してもらってよい)		
6.起居・移乗	0	起居不能(座位バランスがとれない)	1	全介助だが、座位はとれる(1, 2人の介助を必要とする)	2	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)	3	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	0	歩行不可能	1	介助必要だが、曲がり角もうまく曲がれる	2	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)	3	独歩可(補助具を使用してもよい、監視・指示は不要)
8.更衣	0	全介助	1	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)	2	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	0	不可能	1	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)	2	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	0	介助	1	自立(監視なしに浴槽に入浴でき、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											
てんかん発作	0	日単位：毎日発作がある	1	週単位：週に数回発作がある	2	月単位：月に数回発作がある	3	年単位：年に数回発作がある(数年にも一回も含める)	4	発作はない		
精神症状	0	精神症状のため日常生活が自立困難	1	精神症状はあるが日常生活は自立可能	2	精神症状はない						
知的障害	0	最重度(IQ/DQ < 19)	1	重度(IQ/DQ = 34-20)	2	中等度(IQ/DQ = 49-35)	3	軽度(IQ/DQ = 69-50)	4	境界(IQ/DQ = 79-70)	5	正常(IQ/DQ ≥ 80)
記憶障害	0	記憶障害のため日常生活が自立困難	1	記憶障害はあるが日常生活は自立可能	2	記憶障害はない						
運動障害	0	四肢麻痺	1	障害があるが自力移動可能(はいはい・はい歩きなど)	2	支えなく歩行できるが走れない	3	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]

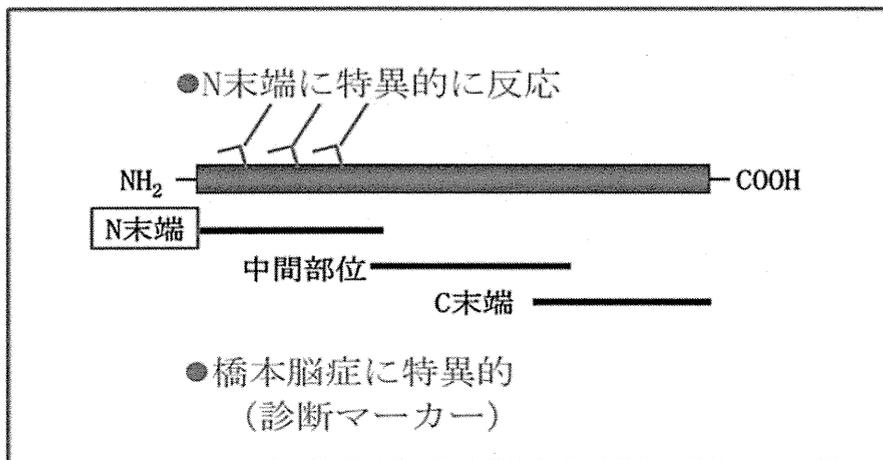
- ・出現し易い徴候：意識障害, けいれん, 認知症・精神症状, 振戦・ミオクローヌス
- ・出現しにくい徴候：末梢神経障害, 脊髄障害, 自律神経障害

[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.

Ⅱ 分担研究報告

ウサギ抗ヒトNMDA型GluR抗体のマウスPassive transferによる機能解析

研究代表者 高橋 幸利^{1, 2, 3}

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】非ヘルペス性急性辺縁系脳炎（NHALE）の病態に重要な役割を果たすNMDA型GluR抗体の生物学的機能を明らかにする。

【方法】GluN2B-NT2ペプチドを用いてウサギを免疫し、抗ヒトGluN2B-NT2抗体を作成した。その抗体をマウス海馬に投与、行動変化をIrwin法で観察し、生理食塩水投与群、正常ウサギ血清Protein A 分画投与群と比較した。組織を免疫組織学的に検討し、マイクロアレイで遺伝子発現変化を検討した。

【結果】GluN2B-NT2ペプチドで免疫したウサギ血清にはELISAでGluN2B-NT2ペプチド反応する抗体が含まれることを確認、GluN1とGluN2Bを発現するHEK細胞を用いたcell-based assayでもNMDA型GluRと反応する抗体の存在を確認し、ウサギ抗ヒトGluN2B-NT2抗体を得た。

ウサギ抗ヒトGluN2B-NT2抗体投与群マウスでは、生理食塩水投与群、正常ウサギ血清Protein A 分画投与群に比べて挙尾反応が高頻度に観察された。

免疫組織学的検討では、ウサギIgGは投与1時間では海馬神経細胞付近に見られたが、22日後では消失していた。ウサギ抗ヒトGluN2B-NT2抗体投与群などの3群で、組織の炎症性変化などの大きな違いは認めなかった。

脳組織マイクロアレイ解析では、ウサギ抗ヒトGluN2B-NT2抗体投与群では正常ウサギ血清Protein A 分画投与群に比べて、*napa*、*sv2c*、*pam*、*fam53b*の発現低下、*trappc2*、*pde5a*、*cwc22*、*nphs2*、*morn2*、*naaladl2*、*foxj1*、*gin1*、*ogn*、*gm6280*などの発現増加が認められた。

【結論】GluN2B-NT2抗体は、NMDA型GluRの内在化、シナプス・イオンチャネル関連遺伝子の発現変化を起こし、興奮性の行動変化をもたらす可能性が示唆された。

研究協力者：西村成子¹、高尾恵美子¹、笠井理沙¹、平松宏実¹、井上有史¹（1 国立病院機構 静岡てんかん・神経医療センター、2 岐阜大学医学部小児病態学、3 静岡県立大学薬学部）

A. 研究目的

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、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、運動障害は31.0%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。

2002年に我々はN-methyl-D-aspartate (NMDA)-type GluRsのサブユニットの一つであるGluN2B(ϵ 2、NR2B)に対する抗体を脳炎患者等の髄液中に見出し（高橋幸利、日児誌、2002）、2007年Dalmauらは卵巣奇形腫脳炎症例でNMDA型GluR複合体に対する抗体（抗NMDAR抗体）を報告（Dalmau、Ann Neurol、2007）、抗NMDAR抗体による脳炎が注目されるようになった。

抗NMDAR抗体役割として、2010年Hughesは患者髄液によるNMDA型GluRの内化を、培養海馬組織を用いて報告した(J Neurosci, 2010)。2011年我々は、NMDA型GluR抗体陽性脳炎髄液は培養神経細胞のアポトーシスを促進するが、髄液IgG分画はシナプス外NMDA型GluRを内在化し、興奮毒性によるアポトーシスを抑制することを報告した。このことからNMDA型GluR抗体はシナプス外NMDA型GluRを内在化して脳を護る作用を持つことが分かった。

2012年我々は、NMDA型GluR抗体のシナプスNMDA型GluRに対する作用を明らかにするために、シナプスNMDA型GluRの活性化でリン酸化されるAktについて、培養神経細胞を用いてNHALE髄液及び髄液IgG分画がどのように作用するかを検討した。7DIVのNHALE-CSF-IgG分画を加えた場合のリン酸化Akt濃度の値 (0.97 ± 0.09 , $n=14$) は、NHALE-total CSFを加えた場合の値 (1.06 ± 0.15 , $n=16$) に比べて有意に低く (Mann-Whitney test, $p=0.0312$)、NMDA型GluR抗体がシナプスNMDA型GluRを内在化して、Aktリン酸化を抑制しているものと考えた。

このように、NHALE患者髄液によるin vitro研究で、NMDA型GluR抗体を含むIgG分画がシナプス外NMDA型GluRを内在化して脳を護る作用を持つこと、シナプスNMDA型GluRを内在化して、Aktリン酸化を抑制しシナプス機能を低下させる可能性を見出したが、NMDA型GluR抗体そのものの作用かどうかは確定できていない。また、髄液IgG分画には痙攣や意識障害などの急性脳炎症状を説明できる作用を見いだせていない。田中らの研究でも患者髄液IgG分画をマウス脳室に投与しても脳炎は起こらなかったとされている。2014年度はNMDA型GluR抗体そのものの作用を明らかにするために、ウサギ抗ヒトNMDA型GluR抗体を作成、passive transfer、その作用をマウス行動解析等で検討した。

B. 研究方法

1. 抗体の作成：ウサギ（日本白色種）にGluN2B-NT2ペプチド（KERKWERVGVKWKDK）を用いて2週間おき5回免疫し、血清からProtein

- in A 精製によりポリクローナルIgG抗体（ウサギ抗ヒトGluN2B-NT2抗体）を得た。
- ウサギ抗ヒトGluN2B-NT2抗体の特性：ELISAで抗体がGluN2B-NT2ペプチドと反応することを確認した後、GluN2B及びGluN1を発現するHEK細胞と反応することをcell-based assayで確認した。
 - Passive transfer：SPFマウスはCrl:CD1 (ICR) (IGS)を用い、予め脳内にカニューラを留置した。マウスを、ウサギ抗ヒトGluN2B-NT2抗体（蛋白濃度18.9 mg/mL、 $1 \mu\text{l}/1$ 回投与）投与群、正常ウサギ血清Protein A 分画（蛋白濃度11.6 mg/mL、 $1 \mu\text{l}/1$ 回投与）投与群、生理食塩水（ $1 \mu\text{l}/1$ 回投与）投与群（各群5匹）に分けた。マウス脳には、ウサギ抗ヒトGluN2B-NT2抗体などをDay 0（初回投与日）、Day 7、Day 14及びDay 21に計4回、イソフルラン吸入麻酔下で、カニューラを経て投与した。
 - 一般状態の観察：一般症状の有無（立毛、低体温、呼吸数）、眼症状の有無（眼瞼閉鎖、眼球突出）、分泌症状の有無（流涎、排尿、下痢）、中枢興奮の有無（振戦、痙攣）、運動障害の有無（異常歩行）、運動性（自発運動）を観察した。
 - Irwin法による観察：行動的プロフィール、神経的プロフィール、自律神経的プロフィールを定法に従い、pre (Day -1)、Day 1、Day 4、Day 7、Day 14及びDay 21の抗体などのカニューラ投与前に盲検下にて観察実施した。
 - 脳の採取：Day 22に脳（嗅球を除く）を摘出し、ブレインマトリックスにセットして、投与部位を約3 mmの厚さにスライスした（凍結切片用）。凍結切片用以外の脳は、前方を凍結保存、後方を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。
 - 免疫染色：スライスした脳をドライアイス上で凍結用包埋皿にコンパウンドを満たして包埋し、投与部位についてはクリオスタットで切片を作製、作製した切片のうち、1枚は常法に従いHE染色を施し、投与部位

を確認、残りの切片は、免疫染色を施し、ウサギIgGの海馬への集積の有無を顕微鏡下で確認した。

8. マイクロアレイ解析:凍結保存した脳組織からmiRNeasy mini Kit (QIAGEN)を用いてtotal RNAを精製し、Low Input Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies)を用いてcDNAの合成とcRNAのラベルと増幅を行い、RNeasy mini spin columns(QIAGEN)によりラベル化cRNAを精製し、RNeasy mini spin columns(QIAGEN)によりcRNAターゲット溶液の精製を行った。SurePrint G3 Mouse GE 8x60K 1color解析(Agilent Technologies)でハイブリダイゼーションを行い、洗浄、スキャン、データ解析を行った。
9. マイクロアレイ統計解析:T検定で、ウサギ抗ヒトGluN2B-NT2抗体投与群、正常ウサギ血清Protein A fraction投与群について、遺伝子発現量の変化の有意差検定を実施した。

(倫理面への配慮)

本試験はIACUC (Institutional Animal Care and Use Committee, 動物実験審査委員会)によって承認された(承認番号2013-111)。なお、当試験施設はAAALAC (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International、国際実験動物管理公認協会)の認証を取得した施設で行った(認証番号:001182)。

C. 研究結果

1. ウサギ抗ヒトGluN2B-NT2抗体の特性

GluN2B-NT2ペプチドで免疫したウサギの血清にはELISAでGluN2B-NT2ペプチド反応する抗体が含まれることを確認、次に免疫ウサギ血清をProtein A精製した分画(ポリクローナルIgG)の中にもGluN2B-NT2ペプチド反応する抗体が含まれることをELISAで確認した。次にGluN1とGluN2Bを発現するHEK細胞を用いたcell-based assayで、Protein A精製IgGがNMDA型Glu

Rと反応することを確認し、ウサギ抗ヒトGluN2B-NT2抗体を得た(図1)。

2. Passive transferマウスの一般状態

一般状態に特筆すべき異常は認められず、投与期間中の体重値は経日的に増加した。

3. Passive transferマウスのIrwin法による観察

ウサギ抗ヒトGluN2B-NT2抗体投与群でのみ挙尾反応がDay 1、4、7、14及び21に観察された。挙尾反応は、GluN2B-NT2抗体投与後Day 1では5/9匹のマウスに出現、Day 4では一部のマウスで消褪し1/9匹に観察されたが、Day 7には出現頻度が5/9匹と増加し、Day 14には6/9匹、Day 21日には7/9匹となった。Day7-21では正常ウサギ血清Protein A分画投与群に比べて有意に高頻度であった(Mann Whitney test、 $p=0.0114, 0.0032, 0.0032$)。挙尾反応は抗ヒトGluN2B-NT2抗体の繰り返し投与により経日的に頻度が増加した(Two-way ANOVA)(図2)。その他のIrwin法による観察項目に有意な変化はなかった。

4. 脳組織所見

カニューラは海馬に到達しており、生理食塩水、正常ウサギ血清Protein A分画、ウサギ抗ヒトGluN2B-NT2抗体は海馬に投与されていた。免疫染色では投与1時間では海馬神経細胞付近にウサギIgGが見られたが、Day 22では消失していた。

Day 22の剖検時に各群の代表5例について評価を行った。投与部位の炎症細胞(好中球、好酸球及び単核細胞)浸潤は、生理食塩水投与群の4例で軽度、正常ウサギ血清Protein A分画投与群の1例で軽度、3例で中等度、ウサギ抗ヒトGluN2B-NT2抗体投与群の全例で軽度に認められた。海馬領域では、血管周囲性炎症細胞(好中球、好酸球及び単核細胞)浸潤が生理食塩水投与群の1例で軽度、正常ウサギ血清Protein A分画投与群の4例で軽度に認められた。脳室周囲の炎症細胞(好中球、好酸球及び単核細胞)浸潤は、生理食塩水投与群の全例で軽度、正常ウサギ血清Protein A分画投与群の2例で軽度、3例で中等度、ウサギ抗ヒトGluN2B-NT2抗体投

与群の4例で軽度、1例で中等度に認められた。軟膜の炎症細胞浸潤は、正常ウサギ血清Protein A 分画投与群の2例で軽度、ウサギ抗ヒトGluN2B-NT2抗体投与群の1例で軽度に認められた。免疫染色では、生理食塩水投与群、正常ウサギ血清Protein A 分画投与群、ウサギ抗ヒトGluN2B-NT2抗体投与群の全例でウサギIgGは陰性であった(表1)。3群で組織的変化の大きな違いは認めなかった。

5. マイクロアレイ解析

各群の脳組織から抽出したRNAのTotal RNA quality checkは問題がなかった。ウサギ抗ヒトGluN2B-NT2抗体投与群と生理食塩水投与群の比較では、2倍以上に発現増加した遺伝子が1000-10000遺伝子あり、発現減少した遺伝子が400-2000遺伝子あった。ウサギ抗ヒトGluN2B-NT2抗体投与群と正常ウサギ血清Protein A 分画投与群の比較では、2倍以上に発現増加した遺伝子が300-10000遺伝子あり、発現減少した遺伝子が800-6000遺伝子あった。

有意差検定では、ウサギ抗ヒトGluN2B-NT2抗体投与群では正常ウサギ血清Protein A 分画投与群に比べて、*napa*、*sv2c*、*pam*、*fam53b*の発現低下(表2)、*trappc2*、*pde5a*、*cwc22*、*nphs2*、*morn2*、*naaladl2*、*foxj1*、*gin1*、*ogn*、*gm6280*などの発現増加が認められた(表3)。

D. 考察

ウサギ抗ヒトGluN2B-NT2抗体をマウス海馬に反復投与することで、海馬には生理食水投与群、正常ウサギ血清Protein A 分画投与群と同程度の組織炎症変化が見られたに過ぎないが、挙尾反応が高率に認められ、反復投与でその頻度が増加した。挙尾反応は、モルヒネ投与時などに見られるマウスの興奮性行動変化と考えられており、NMDA型GluRの一つのサブユニットであるGluN2BのN末に対する抗体が行動変化を起こすことが分かった。

免疫組織検討からは、ウサギ抗ヒトGluN2B-NT2抗体海馬投与初期には海馬に抗体が見られたが、投与開始22日後には消失し、NMDA型GluRに結合して内在化されてしまったものと推測

される。

ウサギ抗ヒトGluN2B-NT2抗体をマウス海馬に反復投与することで、*napa*、*sv2c*、*pam*、*fam53b*の発現低下が見られたが、*napa*はヒトではシナプス放出系のタンパク α -SNAPにあたり、その発現低下はシナプス小胞のリサイクルに障害をもたらし、シナプス機能低下につながる可能性がある。*sv2c*はヒトでは線条体などで発現するシナプス小胞タンパクにあたり、*glutamate*よりもGABAを輸送するシナプス小胞に多く含まれ、*sv2c*の低下はGABA作動性抑制性シナプス伝達に障害をもたらし、興奮性行動につながる可能性がある。*Pam* (Protein associated with Myc)は、ヒトではTuberinのユビキチン化を行い、mTOR系を活性化する。*Pam*が低下するとmTOR系が低下し、タンパク合成が低下し、神経機能抑制につながる可能性がある。*Pam*は*kcc2*に作用しCl⁻イオンを細胞外にくみ出す作用があるが、*Pam*が低下すると細胞内のCl⁻イオンが増加し、GABAがGABA_A受容体に作用するとCl⁻イオンが細胞外に流れ、発達初期と同じく興奮性の作用を示す可能性がある。

ウサギ抗ヒトGluN2B-NT2抗体をマウス海馬に反復投与することで、*trappc2*、*pde5a*、*cwc22*、*nphs2*、*morn2*、*naaladl2*、*foxj1*、*gin1*、*ogn*、*gm6280*などの発現増加が見られたが、*Trappc2*は粗面小胞体からゴルジへの輸送に関与、*Cwc22*はmRNAスプライシングに関与するが、海馬組織侵襲の回復のための普遍的なタンパク合成の増加を起こしている可能性がある。*Nphs2*はシナプス形成に関与するが、修復機構を担っている可能性がある。

GluN2B-NT2抗体はNMDA型GluRを内在化し、NMDA型GluR拮抗作用をもたらすのみではなく、*Napa*、*Sv2c*、*Pam*などのタンパクの低下をもたらし、NH₄LEにおける興奮性行動変化など種々の神経機能の変化をもたらしていると推測した(図4)。しかしこの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あり、NMDA型GluR抗体のみならず、複数の病態因子があると思われる。病態をさらに検討し、脳炎の予後を改善したい。

我々がGluN2B-NT2抗体のELISA測定に用いているペプチドで作成した抗体が、passive transferで行動変化並びに遺伝子発現変化を起こすことを証明できた。よってこのペプチドで測定するELISA抗体は臨床的に意義があると推測できる。

E. 結論

GluN2B-NT2抗体は、NMDA型GluRの内化、シナプス・イオンチャネル関連遺伝子発現変化を起こし、興奮性の行動変化をもたらす可能性が示唆された。GluN2Bの細胞外ドメイン (N末) 抗体はNMNHALEなどの神経症状の一部を担っていると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yoshiaki Yamamoto, Yukitoshi Takahashi, et al., Interaction between sulthiame and clobazam: Sulthiame inhibits the metabolism of clobazam, possibly via an action on CYP2C19, *Epilepsy & Behavior*, 2014; 34: 124-126.
2. Armangue T, Takahashi Y, et al., A novel treatment-responsive encephalitis with frequent opsoclonus and teratoma. *Ann Neurol*. 2014; 75(3): 435-441.
3. Kimura N, Takahashi Y. et al., Brain perfusion SPECT in limbic encephalitis associated with autoantibody against the glutamate receptor epsilon 2. *Clin Neurol Neurosurg*. 2014; 118: 44-48.
4. Yamaguchi Y, Takahashi Y, et al., Multifocal Encephalopathy and Autoimmune-mediated Limbic Encephalitis Following Tocilizumab Therapy. *Intern Med*. 2014; 53(8): 879-882.
5. Mayumi Ueta, Yukitoshi Takahashi, et al., Independent strong association of HLA-A*02:06 and HLA-B*44:03 with cold medicine-related Stevens-Johnson syndrome with severe mucosal involvement, *Scientific Reports*, 2014 Apr 30;4: 4862. doi: 10.1038/srep04862.
6. Koji Fujita, Yukitoshi Takahashi, et al., Neuronal Antibodies in Creutzfeldt-Jakob Disease, *JAMA Neurology*, 2014; 71(4): 514. doi:10.1001/jamaneurol.2014.27.
7. Kazuyuki Inoue, Takahashi Yukitoshi, et al., Influence of Uridine Diphosphate Glucuronosyltransferase 2B7 -161C>T Polymorphism on the Concentration of

Valproic Acid in Pediatric Epilepsy Patients, *Therapeutic Drug Monitoring*, 2014; 36: 406-409.

8. Wen-Hung Chung, Yukitoshi Takahashi, et al., Genetic Variants Associated With Phenytoin-Related Severe Cutaneous Adverse Reactions, *JAMA*. 2014; 312(5): 525-534. doi:10.1001/jama.2014.7859.
9. Rumiko Takayama, Yukitoshi Takahashi, et al., Long-term course of Dravet syndrome: a study from an epilepsy center in Japan, *Epilepsia*, 2014; 55(6): 942-943.
10. Kengo Moriyama, Yukitoshi Takahashi, et al., Another case of respiratory syncytial virus-related limbic encephalitis, *Neuroradiology* 2014; 56(5): 435-436. DOI 10.1007/s00234-014-1350-2.
11. Kazuyuki Inoue, Yukitoshi Takahashi, et al., 4217C>A polymorphism in carbamoyl-phosphate synthase 1 gene may not associate with hyperammonemia development during valproic acid-based therapy, *Epilepsy Research*, 2014; 108(6): 1046-1051.
12. Sakakibara E, Takahashi Y, et al., Chronic periodic lateralised epileptic discharges and anti-N-methyl-D-aspartate receptor antibodies. *Epileptic Disord. Epileptic Disord*. 2014; 16(2): 218-222. doi: 10.1684/epd.2014.0655
13. Yoshiaki Yamamoto, Yukitoshi Takahashi, et al., Impact of cytochrome P450 inducers with or without inhibitors on the serum clobazam level in patients with antiepileptic polypharmacy, *European Journal of Clinical Pharmacology*, 2014; 70(10): 1203-1210.
14. Takeshi Kondo, Yukitoshi Takahashi, et al., Limbic encephalitis-associated relapsing polychondritis responded to infliximab and maintained its condition without recurrence after discontinuation -a case report and review of the literature, *Nagoya journal*, 2014; 76(3-4): 361-368.
15. Nobusuke Kimura, Yukitoshi Takahashi, et al., Developmental outcome after surgery in focal cortical dysplasia patients with early-onset epilepsy, *Epilepsy Research*, 2014; 108(10): 1845-1852.
16. Hayata Y, Takahashi Y. et al., Anti-glutamate epsilon 2 receptor antibody positive and anti-NMDA receptor antibody negative lobar encephalitis presenting as global aphasia and swallowing apraxia. *Case Rep Neurol*, 2014; 6: 291-296.
17. Kazushi Miya, Yukitoshi Takahashi,

- Hisashi Mori, Anti-NMDAR autoimmune encephalitis, *Brain & Development*, 2014; 36(8): 645-652.
18. Hiroyuki Fujita, Y. Takahashi, et al., The serum level of HMGB1 (high mobility group box 1 protein) is preferentially high in drug-induced hypersensitivity syndrome/drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms, *British Journal of Dermatology*, 2014 Dec;171(6):1585-1588. doi: 10.1111/bjd.13162. Epub 2014 Oct 27.
 19. Chiba Yuhei, Takahashi Yukitoshi, et al., Lymphopenia Helps Early Diagnosis of Systemic Lupus Erythematosus for Patients with Psychosis as an Initial Symptom, *Psychosomatics*, in press, 2013 Sep 23. doi:pil: S0033-3182(13)00136-9. 10.1016/j.psym. .
 20. Yoshiaki Yamamoto, Yukitoshi Takahashi, et al., Individualized phenytoin therapy for pediatric Japanese epilepsy patients based on CYP2C9 and CYP2C19 genotypes, *Therapeutic Drug Monitoring*, in press.
 21. Takahiro Furukawa, Yukitoshi Takahashi, et al., Increased proinflammatory cytokines in sera of patients with multifocal motor neuropathy, *J Neurol Sci*. 2014 Aug 4. pii: S0022-510X(14)00505-X. doi: 10.1016/j.jns.2014.07.059.
 22. Hiroshi Sakuma, Yukitoshi Takahashi, et al., Intrathecal overproduction of pro-inflammatory cytokines and chemokines in febrile infection related refractory status epilepticus, *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, in press.
 23. Yoshiaki Yamamoto, Yukitoshi Takahashi, et al., Influence of uridine diphosphate glucuronosyltransferase inducers and inhibitors on the plasma lamotrigine concentration in pediatric patients with refractory epilepsy, *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, in press.
 24. Masaki Yoshimura, Yukitoshi Takahashi, et al., An analysis of epileptic negative myoclonus by magnetoencephalography, *Epilepsy Research*, in press.
 25. Norimichi Higurashi, Yukitoshi Takahashi, et al., Immediate suppression of seizure clusters by corticosteroids in PCDH19 female epilepsy, *Seizure*, in press.
 26. Matsumoto R, Takahashi Y, et al., Possible induction of multiple seizure foci due to parietal tumour and anti-NMDAR antibody. *Epileptic Disord*. 2015 Feb 3, in press.
 27. Yoshiki Kawamura, Yukitoshi Takahashi, et al., Pathogenic role of human herpesvirus 6B infection in mesial temporal lobe epilepsy, *Journal of infectious disease*, in press.
 28. 高橋幸利、東本和紀、てんかん、編集、山崎麻美、坂本博昭、*小児脳神経外科学* (改訂2版)、金芳堂、p、印刷中。
 29. 高橋幸利、渡辺陽和、2脳炎-1総論、編集：兼本浩祐、他、「臨床てんかん学」、医学書院、p、印刷中。
 30. 高橋幸利、大星大観、2脳炎-2免疫介在性脳炎(小児)、編集：兼本浩祐、他、「臨床てんかん学」、医学書院、p、印刷中。
 31. 高橋幸利、西田拓司、山口解冬、自己免疫性脳炎、編集：辻省次、吉良潤一、*アクチュアル脳・神経疾患の臨床、免疫性神経疾患 病態と治療のすべて*、中山書店、印刷中。
 32. 高橋幸利、山口解冬、難治性てんかんの病態を探る-脳炎後てんかんと免疫、脳と発達、2014; 46: 195-201.
 33. 高橋幸利、他、てんかん-基礎・臨床研究の最新知識-III-10. 抗てんかん薬の副作用、*日本臨床*、2014: 72: 908-919.
 34. 神里尚美、高橋幸利、他、両手指の麻痺性拘縮を呈した抗 NMDA 型グルタミン酸受容体抗体陽性脳炎の一例、*沖縄県立南部医療センター・こども医療センター雑誌*、2014; 7: 13-17.
 35. 戸島麻耶、高橋幸利、他、急性無菌性髄膜脳炎の経過中に局所性皮質反射性ミオクローヌスを呈し抗グルタミン酸受容体抗体が検出された2例、*臨床神経学*、54: 543-549, 2014.
 36. 高橋幸利、他、抗てんかん薬の薬物動態・薬剤相互作用、*小児内科*、2014; 46: 1238-1241.
 37. 横山桃子、高橋幸利、他、水痘に続発して起こった非ヘルペス性辺縁系脳炎の4歳女児例、*小児科臨床*、2014; 67(9): 1481-1486.
 38. 高橋幸利、他、免疫介在性神経疾患、*小児感染免疫*、2014; 26: 403-414.
 39. 関谷芳明、高橋幸利、他、甲状腺クリーゼに抗 NMDA 受容体脳炎を併発した1例、*日本集中治療医学会雑誌*、2014; 21: 659-660.
 40. 許全利、高橋幸利、他、高齢男性に発症した抗 NMDA 受容体脳炎の症例、*老年精神医学雑誌*、2014; 25(10): 1153-1159.
 41. 真野ちひろ、高橋幸利、他、subclinical seizure が観察された非ヘルペス性急性辺縁系脳炎の1症例、*小児科臨床*、2014; 67: 2153-2158.
 42. 長濱明日香、高橋幸利、他、非ヘルペス性急性辺縁系脳炎の症状を呈した橋本脳症の1小児例、*小児科臨床* 2014; 67(11): 2145-2151.
 43. 高橋幸利、他、小児の慢性進行性持続性部分てんかん・非進行性持続性部分てんかん：Rasmussen 症候群を主体に、別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ、2014; 31: 41-46.

44. 高橋幸利、他、神経疾患と NMDA 型グルタミン酸受容体抗体、日本小児科学会誌、2014 ; 118 (12) : 1695-1707.
 45. 高橋幸利、他、新しい抗てんかん薬の適応と使い方、小児科診療、2015; 78: 207-214.
 46. 朱膳寺圭子、高橋幸利、他、前頭葉に病変が及んだ非ヘルペス性急性辺縁系脳炎の 1 例、東京女子医科大学雑誌、2014; 84(s1): 197-203.
 47. 保坂孝史、高橋幸利、他、先行感染後に opsoclonus-myoclonus syndrome を認め、髄液中の抗 GluR δ 2 抗体と GluR ϵ 2 抗体が陽性であった 1 例、運動障害、2014 ; 24(1):1-6.
 48. 出口健太郎、高橋幸利、他、卵巣奇形腫摘出術後に痙攣重積状態をきたした抗 NMDA 受容体脳炎の 1 例、ICU と CCU、2014;38(9): 648-651.
 49. 宮城哲哉、高橋幸利、他、失語発作を主症状とする成人型ラスマッセン症候群の一例、てんかん研究、2015 ; 32 : 556-563.
 50. 西口亮、高橋幸利、他、両側耳介軟骨炎に抗グルタミン酸受容体 (GluR ϵ 2) 抗体陽性の非ヘルペス性急性辺縁系脳炎を合併した 1 例、臨床神経学、印刷中.
 51. 高橋幸利、他、自己免疫性脳炎、Medical Practice、印刷中
 52. 上野弘恵、高橋幸利、他、めまいで発症し亜急性に四肢の筋力低下・歩行障害が進行した橋本脳症の 1 男児例、脳と発達、印刷中.
 53. 高橋幸利、他、増刊号：免疫性神経疾患-基礎・臨床研究の最新知見- Rasmussen 症候群（脳炎）、日本臨床、印刷中.
2. 学会発表
 1. 高橋幸利、難治てんかんの病態・治療 - 脳炎後てんかんとスパズム-、Shizuoka-Kumamoto collaboration meeting of epilepsy towards better community healthcare 第 1 回勉強会、2014 年 4 月 25 日、熊本.
 2. 高橋幸利、他、シンポジウム 3 脳炎後てんかんの病態・治療を探る、免疫病態、第 56 回日本小児神経学会、2014 年 5 月 29-31 日、浜松.
 3. 高橋幸利、薬事委員会主催セミナー、Rasmussen 症候群に対するタクロリムスの有効性、第 56 回日本小児神経学会、2014 年 5 月 29-31 日、浜松.
 4. Yukitoshi Takahashi, Pre-congress symposium: Update of Rasmussen syndrome: Immunopathogenesis, The 48th Congress of the Japan Epilepsy Society, Oct 1st-3rd 2014, Tokyo.
 5. 高橋幸利、他、シンポジウム 5 VGKC 複合体等に関連する免疫介在性亜急性脳炎とてんかん：VGKC 複合体抗体陽性例の NMDA 型 GluR 抗体の意義、第 48 回日本てんかん学会学術集会、2014 年 10 月 2-3 日、東京.
 6. 高橋幸利、NMDA 型 GluR 抗体の機能解明 in vitro & in vivo、第 44 回日本臨床神経生理学会学術大会 教育講演、2014 年 11 月 19-21 日、福岡.
 7. 高橋幸利、他、HPV ワクチン後に中枢神経症状が出現した症例のステロイドパルス治療、ワークショップ「Human Papillomavirus (HPV) ワクチン関連神経免疫異常症候群 (HANS: ハンス症候群)」、第 29 回日本臨床リウマチ学会、2014 年 11 月 30 日、福岡.
 8. 高橋幸利、脳炎と脳炎後てんかんの病態・治療、第 9 回日本てんかん学会中国・四国地方会、2015 年 2 月 7 日、徳島.
 9. 高橋幸利、NMDA 型 GluR 免疫と疾患、第 49 回慶應ニューロサイエンス研究会、2015 年 2 月 21 日、東京.
 10. 小池大輔、高橋幸利、他、早期の治療介入により良好な経過をたどったインフルエンザワクチン後非ヘルペス性辺縁系脳炎の 1 例、第 93 回山陰小児科学会、2014 年 4 月 6 日
 11. 村田強志、高橋幸利、他、特異な橋本変を呈した自己免疫関連性脳炎の一例、日本内科学会総会、2014 年 4 月 11-13 日、東京.
 12. 高橋幸利、他、NMDAR 抗体陽性非ヘルペス性急性辺縁系脳炎の早期診断：先行症状期血液検査値の検討、第 117 回日本小児科学会学術集会、2014 年 4 月 11-13 日、名古屋.
 13. 藤田貴子、高橋幸利、他、当院における突発性発疹症の神経合併症、第 117 回日本小児科学会学術集会、2014 年 4 月 11-13 日、名古屋.
 14. 河村吉紀、高橋幸利、他、内側側頭葉硬化症発症におけるヒトヘルペスウイルス 6B の役割、第 117 回日本小児科学会学術集会、2014 年 4 月 11-13 日、名古屋.
 15. 大久保真理子、高橋幸利、他、両側性の Epilepticus Partialis Continua を呈した 1 例、第 64 回多摩小児神経懇話会、2014 年 4 月 19 日、八王子.
 16. 山田舞乃、高橋幸利、他、当院での自己免疫性脳炎の経過 抗 NMDA 受容体脳炎は再発に注意が必要である、第 55 回日本神経学会学術大会、2014 年 5 月 22-24 日、福岡.
 17. 上野弘恵、高橋幸利、他、橋本脳症の 1 男児例-小児における橋本脳症の臨床像の検討-、第 56 回日本小児神経学会、2014 年 5 月 29-31 日、浜松.
 18. 鳥巢浩幸、高橋幸利、他、小児多発性硬化症における治療抵抗性の検討、第 56 回日本小児神経学会、2014 年 5 月 29-31 日、浜松.
 19. 中野祐子、高橋幸利、大脳皮質に局限した病変を示した自己免疫性辺縁系脳炎の 1 例、第 56 回日本小児神経学会、2014 年 5 月 29-31 日、浜松.
 20. 西倉紀子、高橋幸利、他、非ヘルペス性急性辺縁系脳炎 7 例の臨床的検討、第 56 回日本小児神経学会、2014 年 5 月 29-31 日、浜松.

21. 森山剣光、高橋幸利、他、RS ウイルス感染関連 NMDA 受容体抗体陽性辺縁系脳炎の 1 例、第 56 回日本小児神経学会、2014 年 5 月 29-31 日、浜松。
22. 渡辺陽和、高橋幸利、他、Rasmussen 症候群のステロイドパルス療法の検討、第 56 回日本小児神経学会、2014 年 5 月 29-31 日、浜松。
23. 佐久間啓、高橋幸利、他、難治頻回部分発作重積型急性脳炎の髄液中におけるインターフェロン誘導性ケモカインの増加、第 56 回日本小児神経学会、2014 年 5 月 29-31 日、浜松。
24. 平澤絢香、高橋幸利、他、WISC-IV で処理速度低下を示した軽症抗 NMDA 受容体脳炎の一例、第 56 回日本小児神経学会、2014 年 5 月 29-31 日、浜松。
25. 山口解冬、高橋幸利、他、シンポジウム 3 脳炎後てんかんの病態・治療を探る、脳炎脳症後てんかんの慢性期におけるステロイドパルス治療の経験、第 56 回日本小児神経学会、2014 年 5 月 29-5 月 31 日、浜松。
26. 谷口祐子、高橋幸利、他、限局性の大脳皮質病変を示した自己免疫性辺縁系脳炎の 1 例、第 56 回日本小児神経学会、2014 年 5 月 29-5 月 31 日、浜松。
27. 藤井裕士、小林良行、石川暢恒、高橋幸利、グルタミン酸受容体 (GluR) 抗体が陽性であった Late onset Lennox-Gastaut 症候群の 14 歳女児例、第 56 回日本小児神経学会、2014 年 5 月 29-5 月 31 日、浜松。
28. 庄司圭祐、今高橋幸利、他、関節リウマチの免疫療法中に発症した抗グルタミン酸受容体抗体陽性の互急性白質脳症の一例、第 204 回日本内科学会近畿地方会、2014 年 6 月 14 日、大阪。
29. 杉本精一郎、高橋幸利、他、うつ症状を呈した辺縁系脳炎の一症例、第 206 回日本神経学会九州地方会、2014 年 6 月 28 日、宮崎。
30. 小野田統、高橋幸利、他、単純ヘルペス脳炎に続発した抗 NMDA 受容体脳炎の 1 例、第 139 回日本神経学会東海北陸地方会、平成 26 年 7 月 5 日、名古屋。
31. 元木崇裕、高橋幸利、他、免疫グロブリン治療が奏功した抗グルタミン酸受容体抗体陽性のてんかん性脳症の 1 例、第 8 回日本てんかん学会関東・甲信越地方会、2014 年 7 月 11 日、東京。
32. 浅田昌照、高橋幸利、他、抗 NMDA 受容体脳炎による意識障害を呈し診断に難渋した一例、第 15 回近畿精神神経学会、2014 年 7 月 26 日、大阪。
33. 高橋幸利、他、非ヘルペス性急性辺縁系脳炎の病態解明：NMDAR 型 GluR 抗体の passive transfer 研究、第 19 回日本神経感染症学会総会・第 26 回日本神経免疫学会、2014 年 9 月 4-6 日、金沢。
34. 高橋幸利、他、非ヘルペス性急性辺縁系脳炎の病態解明：正常対照の GluR 抗体と年齢、第 19 回日本神経感染症学会総会・第 26 回日本神経免疫学会、2014 年 9 月 4-6 日、金沢。
35. 高橋幸利、他、HPV ワクチン後に中枢神経症状が出現した症例の検討：髄液の自己免疫学的検討、第 19 回日本神経感染症学会総会・第 26 回日本神経免疫学会、2014 年 9 月 4-6 日、金沢。
36. 武久康、高橋幸利、他、NMDA 受容体脳炎の治療とその効果に対する検討、第 19 回日本神経感染症学会総会・第 26 回日本神経免疫学会、2014 年 9 月 4-6 日、金沢。
37. 河村吉紀、高橋幸利、他、内側側頭葉硬化症発症におけるヒトヘルペスウイルス 6B の役割、第 19 回日本神経感染症学会総会、2014 年 9 月 4-6 日、金沢。
38. 先浜大、高橋幸利、他、伝染性単核球症に続発した自己免疫介在性脳炎の 1 例、日本内科学会 第 205 回近畿地方会、2014 年 9 月 20 日、大阪。
39. Yoshiki Kawamura, Yukitoshi Takahashi, 他、Pathogenic role of human herpes virus 6B in mesial temporal sclerosis, 第 48 回日本てんかん学会、2014 年 10 月 2-3 日、東京。
40. 福岡正隆、高橋幸利、他、左右大脳半球に再発性病変を呈し Rasmussen 脳炎が疑われた 1 例、第 48 回日本てんかん学会学術集会、2014 年 10 月 2-3 日、東京。
41. Kazumi Matsuda, Yukitoshi Takahashi, 他、Pre-congress symposium: Update of Rasmussen syndrome : Update of Rasmussen syndrome : Neuroimaging and histopathology of Rasmussen syndrome, The 48th Congress of the Japan Epilepsy Society, Oct 1st-3rd 2014, Tokyo.
42. 宇田川紀子、高橋幸利、他、非ヘルペス性急性辺縁系脳炎後に難治てんかんを残した 1 男児例、第 48 回日本てんかん学会学術集会、2014 年 10 月 2-3 日、東京。
43. 阿部圭市、高橋幸利、他、発作型、焦点、画像上の変化を認めた慢性肉芽腫性脳炎による難治性てんかんに対し側頭葉切除を行った一例、第 48 回日本てんかん学会学術集会、2014 年 10 月 2-3 日、東京。
44. 東本和紀、高橋幸利、他、髄液中リンパ球表面マーカーの検討：疾病対照の年齢経過、第 48 回日本てんかん学会学術集会、2014 年 10 月 2-3 日、東京。
45. 山本達也、高橋幸利、他、リツキシマブによる治療を行ったオブソクローヌス・ミオクローヌス症候群の 1 例、第 20 回日本小児神経学会東北地方会、2014 年 10 月 18 日、盛岡。
46. 池田光憲、高橋幸利、他、当センターで経験した非ヘルペス性急性辺縁系脳炎 (NHALE) 9 例の臨床的検討、日本救急医学会総会、2014 年 10 月 28 日。
47. 村上丈伸、高橋幸利、他、特異な橋病変を呈した抗 NMDA 受容体抗体陽性脳炎の一例、臨床神経生理学学会、2014 年 11 月 19-21 日、福岡。
48. 武久康、高橋幸利、他、NMDA 受容体脳炎における脳血流量 SPECT、第 26 回日本脳循環代

- 謝学会、2014年11月21-22日、岡山。
49. 布施ひと美、高橋幸利、他、抗てんかん薬により認知機能が改善した抗NMDA受容体抗体陽性の側頭葉てんかん、第27回日本総合病院精神医学会、2014年11月28日、つくば。
 50. 眞山英徳、高橋幸利、NMDA型GluR抗体が検出された髄膜脳炎発症の混合性結合組織病の1例、神経学会関東地方会、2014年11月29日、東京。
 51. 井上沙織、高橋幸利、他、抗NR2抗体陽性辺縁系脳炎に対するシクロフォスファミド大量静注療法が有効であったがループス腎炎が再燃した小児期発症SLEの一例、日本リウマチ学会関東支部学術集会、2014年12月14日、横浜。
 52. 伊藤弘道、高橋幸利、他、VNSにより発作頻度、認知行動面に改善が認められたAERRPSの1例、第9回日本てんかん学会中国・四国地方会、2015年2月7日、徳島。
 53. 関口由利子、高橋幸利、他、抗NMDA型グルタミン酸受容体抗体陽性であった、非ヘルペス性急性脳炎の1女児例、第32回日本小児科学会神奈川県地方会、2015年2月21日、横浜。
 54. 永迫友規、高橋幸利、他、口唇のけいれんで始まり、失調性構音障害、失読失書・失

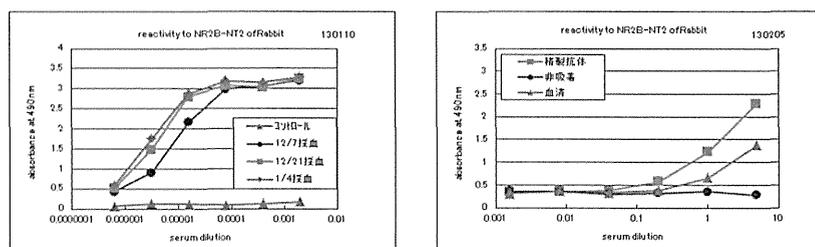
名辞を呈した抗グルタミン酸受容体抗体陽性脳炎、第212回神経学会地方会、2015年3月14日、東京。

3. 書籍の刊行
該当なし。

H. 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

A. ウサギ血清のGluN2B-NT2抗体(ELISA) B. Protein A精製分画のGluN2B-NT2抗体(ELISA)



C. Protein A精製分画のNMDAR抗体(Cell-based assay)

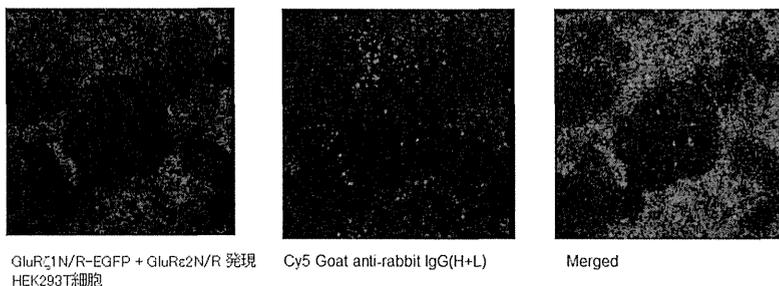
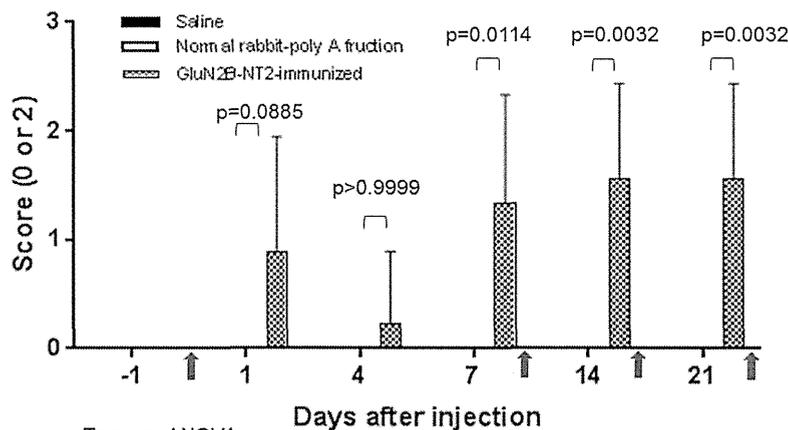


図1. ウサギ抗ヒトGluN2B-NT2抗体の特徴.

ELISAによるGluN2B-NT2抗体測定は以下の方法で行った。固相化 (0.5 μ g/well GluNR2B-NT2 peptide)、ブロッキング (0.5% Gelatin/PBS-T)、一次抗体 (Protein A精製抗体)、二次抗体 (5000倍希釈 HRP標識抗ウサギIgG(H+L))、発色 (0.5mg/mL OPD)、反応停止 (2N硫酸)、吸光度測定 (490nm)



Two-way ANOVA

Source of Variation	% of total variation	P value	Significant?
Interaction	15.74	< 0.0001	Yes
Row Factor (Days after injection)	7.385	0.0006	Yes
Column Factor (Injected materials)	35.01	< 0.0001	Yes

図2. Irwin法による挙尾反応観察.

Saline、生理食塩水投与群、normal rabbit-poly A fraction、正常ウサギ血清をpoly A精製した分画を投与した群、GluN2B-NT2-immunized、GluN2B-NT2ペプチドで免疫したウサギ血清をpoly A精製した分画を投与した群。挙尾反応が見られた場合がscore 2、見られない場合がscore 0となる。赤矢印は投与時期を示す。グラフ内の p 値はウサギ抗ヒトGluN2B-NT2抗体投与群と正常ウサギ血清Protein A 分画投与群の比較 (Mann Whitney test)。

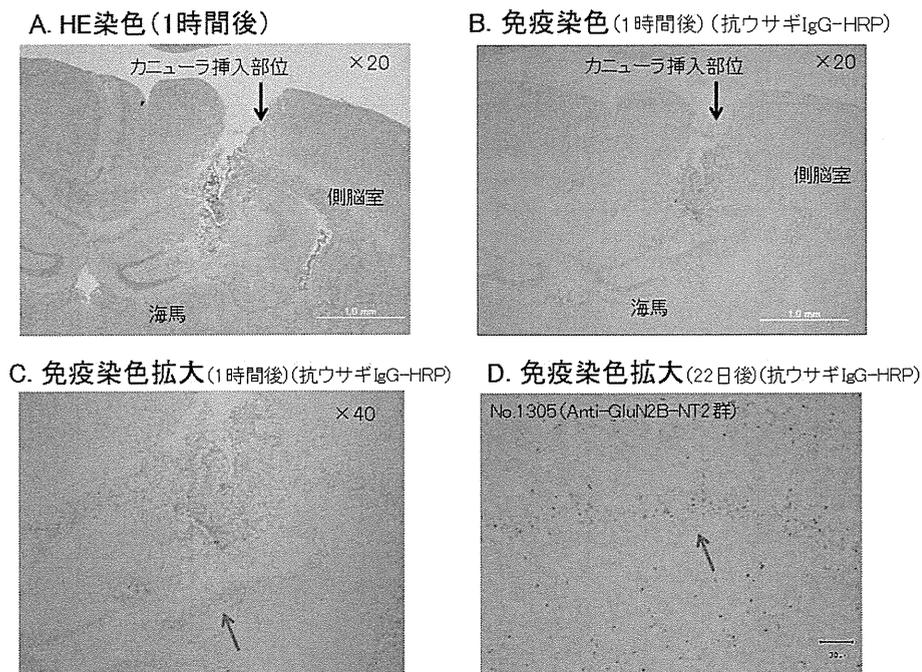


図3. 脳組織所見.

A-Cは投与後1時間の組織所見、Dは投与開始後22日の剖検時の組織所見、Cの矢印はウサギIgG陽性細胞、Dの赤矢印はウサギIgG陰性海馬細胞。

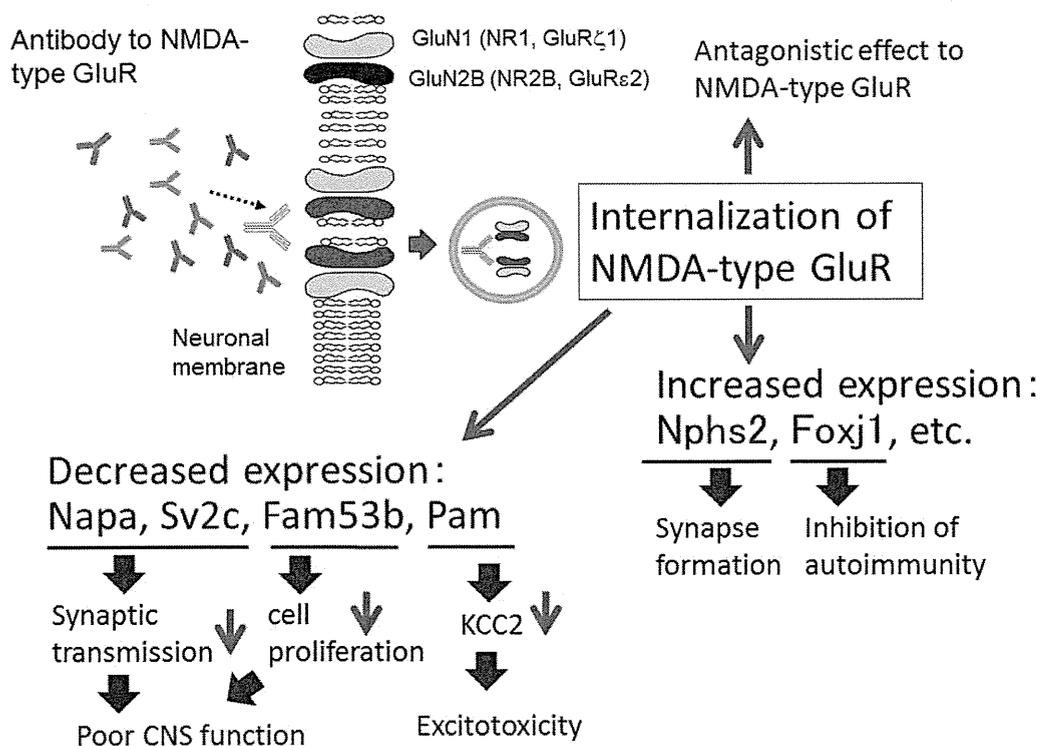


図4. NMDA型GluR抗体の作用仮説