

201419078B(1/2)

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業

(障害者対策総合研究開発事業)

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

平成24年度～26年度 総合研究報告書

(1/2冊)

研究代表者 高橋幸利

平成27(2015)年 3月

目 次 (1/2冊)

I. 総合研究報告

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 高橋 幸利	1
(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) 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 総合研究報告書 (2008-2010)	25
(参照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 20130317	61
(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) 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 平成24年度 総括・分担研究報告書	98
(参照4) 厚生労働科学研究費補助金 (障害者対策総合研究事業) 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 平成25年度 総括・分担研究報告書	114
(参照5) 厚生労働科学研究費補助金 (障害者対策総合研究事業) 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 平成26年度 総括・分担研究報告書	131
抗NMDAR複合体抗体の測定とGluR基礎研究 森 寿	151
非ヘルペス性急性辺縁系脳炎患者および抗グルタミン酸受容体抗体陽性の 精神神経疾患患者の臨床的特徴の検討 西田 拓司	155
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	161

目 次 (2/2冊)

III. 研究成果の刊行物・別刷

I 総合研究報告

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

研究代表者 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】我々の先行研究で、成人の非ヘルペス性急性辺縁系脳炎（NHALE）は年間220人が罹患し、記憶障害が63.2%に残り、1万人程度が記憶障害などの後遺障害を患っていると推定している。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】非傍腫瘍性のNHALE患者の約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といった精神障害関連疾患の既往歴が見られ、NMDA型GluR抗体がNHALE発病前から存在し、前駆期症状として精神障害をもたらしている可能性がある。卵巣奇形腫のある傍腫瘍性NHALE患者では約4%に脳炎・髄膜炎の既往がみられ、NMDA型GluR抗体が以前から存在し、自己免疫介在性の髄膜炎・脳炎を繰り返している可能性がある。

【前駆期-健常者のNMDA型GluR抗体】0-20歳の非炎症性のもてんかん症例と、当院職員の血清を用いた健常者のGluN2B-NT2抗体等の検討で、NHALE好発年齢帯の20-40歳の女性にNMDA型GluR抗体が著しく高い群が認められた。

【前駆期-NMDA型GluR抗体陽性患者髄液in vitro研究】NMDA型GluR抗体陽性脳炎患者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。NHALE患者髄液中のIgG分画がAktリン酸化を抑制することを見出し、シナプスNMDA型GluRを内在化していると考えた。

【前駆期-合成NMDA型GluR抗体によるPassive transfer研究】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、挙尾反応（興奮性行動変化）が認められ、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。マイクロアレイ解析で、海馬*napa*、*sv2c*、*pam*、*fam53b*の発現低下が見られ、シナプス機能低下、GABA作動性抑制性シナプス伝達に障害をもたらす、興奮性行動につながる可能性があると考えている。

【先行症状期-症状・検査の検討】NHALE207例中78%に先行症状を認め、感染病原体が確定される症例は小児主体で11%と少なく、発熱、頭痛といった不明熱的な症状が多い。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。一般血液検査では、リンパ球、血小板の減少、IgA高値、CRPの比較的低値が特徴として見られ、早期診断に資する特徴の可能性はある。先行症状期の髄液一般データでは、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すること、無菌性髄膜炎に比べて髄液蛋白濃度は有意に高値で、髄液糖濃度は有意に低値であった。無菌性髄膜炎で蛋白高値、糖比較的低値の場合は、NHALEへの進展に注意する。先行症状期髄液albumin濃度が対照に比べて高く、末梢血albumin濃度は、対照より有意に低値で、血液脳関門の破綻によるものと推測している。NHALE発病予防には血液脳関門の保護も重要であると思われる。

【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NMDA型GluR抗体測定系を開発している。

【まとめ】3年間の研究で、NHALEの10%程度の症例に前駆期症状と推定できる精神障害関連疾患の既往歴があり、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り、NMDA型GluR抗体をマウスにpassive transferすると、マウスに興奮性の行動変化が観察された。これらのことから、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する症例があると推測した。先行症状期にはリンパ球減少等からNMDA型GluR抗体産生、血液脳関門破綻などが加わり、脳炎発病に至る可能性を推測した。

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。

研究分担者：

- 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。
- 平松宏実、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。
- 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。
- 今村淳、岐阜県総合医療センター小児科

- 保立麻美子、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。
- 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。
- 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。
- 高山留美子、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。
- 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。
- 木村暢佑、大津赤十字病院小児科。
- 美根潤、島根大学小児科。

A. 研究目的

1. 2011年度までの先行研究のまとめ

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

我々の先行研究で、成人発病のNHALEは年間20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

可能性を明らかにした。

免疫介在性脳炎であるNHAE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、我々は病態解明に取り組んでいる。

3. 2012年度からの研究仮説

先行研究では、NHAE 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例で何らかの中樞神経症状が始まっている可能性が示唆された。またNHAE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、NHAE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抗体が血清中に認められた症例が東北大学より報告されており（Nishiyama, et al., Neur

ol）、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と推測している。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（Miglio, 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樞神経症状が観察され、その後先行症状期を経てNHAE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NHAE発病リスク診断、NHAE発病抑止対策、早期治療を、今回の研究で可能にしたい。

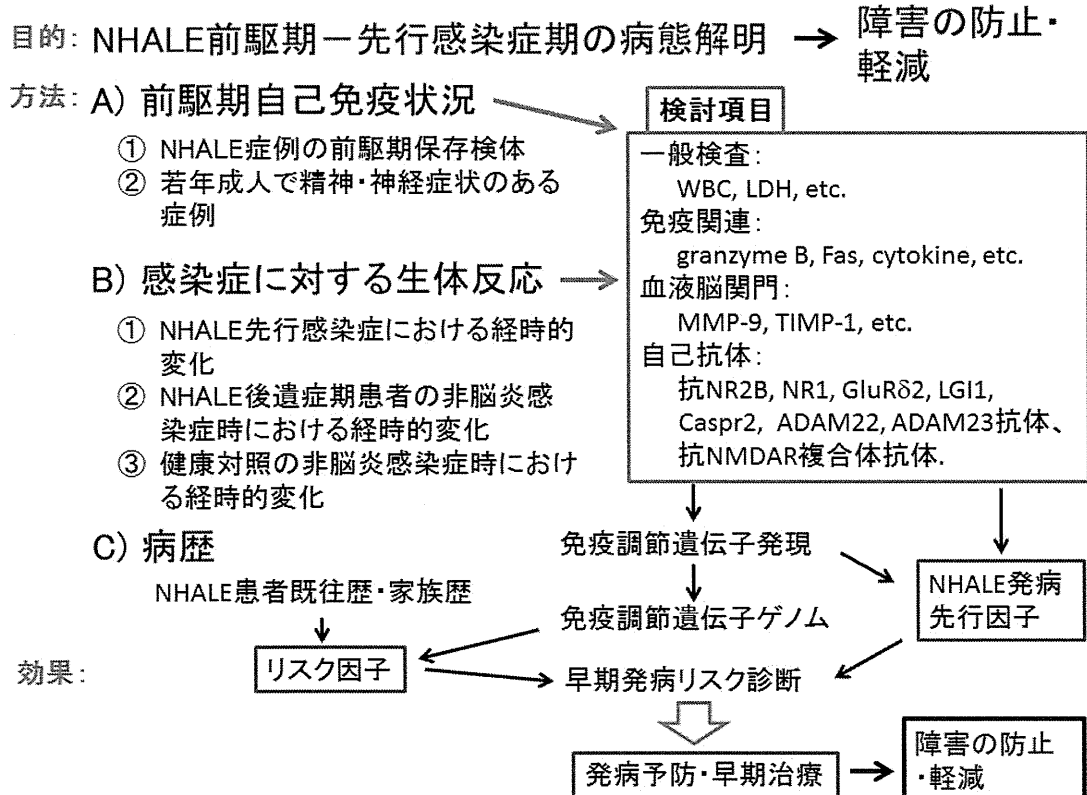


図1. 研究の目的、方法及び期待される効果（流れ図）

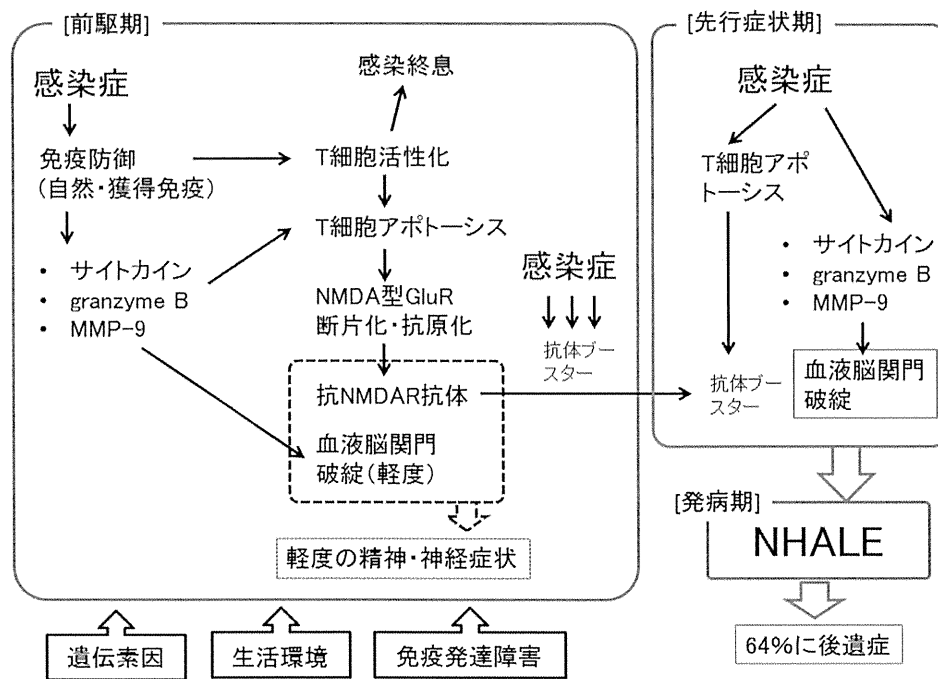


図2. 研究仮説

表1. イオンチャネル型GluRサブユニット等の命名法

	NC-IUPHAR subunit nomenclature	Previous nomenclatures	Human gene name
AMPA	GluA1	GLU _{A1} , GluR1, GluRA, GluR-A, GluR-K1, HBGR1	<i>GRIN1</i>
	GluA2	GLU _{A2} , GluR2, GluRB, GluR-B, GluR-K2, HBGR2	<i>GRIN2</i>
	GluA3	GLU _{A3} , GluR3, GluRC, GluR-C, GluR-K3	<i>GRIN3</i>
	GluA4	GLU _{A4} , GluR4, GluRD, GluR-D	<i>GRIN4</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 ϵ 1	<i>GRIN1</i>
	GluN2A	GLU _{N2A} , NMDA-R2A, NR2A, GluR ϵ 1	<i>GRIN2A</i>
	GluN2B	GLU _{N2B} , NMDA-R2B, NR2B, hNR3, GluR ϵ 2	<i>GRIN2B</i>
	GluN2C	GLU _{N2C} , NMDA-R2C, NR2C, GluR ϵ 3	<i>GRIN2C</i>
	GluN2D	GLU _{N2D} , NMDA-R2D, NR2D, GluR ϵ 4	<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.

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。NMDA型GluRの命名法はIUPHAR (Neuropharmacology, 2009; 56(1): 2-5) に従った(表1)。

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。明らかになった知見を追加し、アップデートを継続していく(高橋、森、西田)。

3. NHALE既往歴

NHALE患者の既往歴を調査し、脳炎発病以前の精神神経症状を明らかにすることで、NMDA型GluR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か?明らかにする。

2012年度はNHALE患者のうち非傍腫瘍性患者217名を対象として、既往歴について後方視的に検討した。

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検討した。

2014年度は髄液中のGluN2B-NT2抗体が疾病対照髄液の平均+2SD以上の高値を示した精神疾患患者8名について、NHALE症例と既往歴を比較した(西田)。

4. GluN2B-NT2抗体陽性患者の精神症状

髄液中のGluN2B-NT2抗体が対照髄液(非炎症性部分てんかん)の平均+2SD以上の高値を示した精神疾患患者8名と、精神症状を伴う脳炎後てんかん患者4名について、精神症状を比較検討した(西田)。

5. 精神病症状例のNMDA型GluR抗体の推移

対象は、Structured Clinical Interview for DSM-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で、複数回血清・髄液中のNMDA型GluR抗体などを測定できた8名である。血清中あるいは髄液中のGluN2B-NT2抗体、GluN2B-CT抗体、GluN1-NT抗体、GluD2-NT抗体をELISAにより測定し、経時的変化を検討した。患者の抗体価が疾病対照の血清あるいは髄液と比較して平均+2SD以上を示す場合を高値とした(西田、高橋)。

イスラエル、ヘブライ大学との共同研究で、NMDA型GluR機能低下が示唆される統合失調症患者の血清を用いた抗NMDAR抗体の計測を実施した(森)。

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)。

6. NHALE患者の前駆期自己免疫状況の検討

NHALE発病前に献血の経験がある症例で、献血保存血清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。2014年度は患者同意書をもって、日本赤十字社に個別研究として献血11年後に廃棄される保管検体の利用をお願いした。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)。

7. 健常者の年齢・性別NMDA型GluR抗体分布

倫理委員会承認の方法で同意を得られた静岡てんかん・神経医療センター職員の血清を用いて、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関連を検討する(高橋)。

8. NMDA型GluR抗体陽性患者髄液の作用の検討 in vitro

NHALEの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GluN2B-NT2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、総Akt濃度およびリン酸化Akt (pAkt) 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)。

9. 合成NMDA型GluR抗体によるPassive transfer研究 in vivo

ウサギにヒトGluN2B-NT2ペプチドを用いて免疫し、ポリクローナルIgG抗体(ウサギ抗ヒトGluN2B-NT2抗体)を得た。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、マウス海馬に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 吸着分画(以下、正常ウサギ血清)も投与する群を作った。

次に、抗体をマウス海馬に投与開始22日後に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。発現遺伝子を生理食塩水投与群、正常ウサギ血清Protein A 分画投与群と比較した(高橋)。

10. NHALE患者先行症状期の症状検査値の検討

2012年度、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GluN2B-NT2抗体陽性非傍腫瘍性NHALE 217例の先行症状期の臨床症状、病原体検索結果を検討した。

2013年度、非傍腫瘍性NHALE42例を対象とし、一般臨床検査値の検討を行った。感染症対照は、てんかん患者で感染症状を呈した年齢・性をNHALEに合わせた42例、対照は年齢・性を合わせた感染のないてんかん小児と健康成人42例を用いた。

2014年度は、非傍腫瘍性NHALE217例の中で脳炎症状出現前の先行症状期の髄液データがある17例(NHALE群)、非炎症性のてんかん等で髄液検査を行った症例中NHALE群で年齢を可能な範囲でマッチさせた86例(疾病対照群)、無菌性髄膜炎で脳炎に移行しなかった症例中NHALE群と年齢を可能な範囲でマッチさせた78例(感染対照群)の3群について、髄液一般検査値を比較した。有意差検定はMann Whitney testを用いた(高橋)。

11. 浮遊系293F細胞を用いた抗体測定系開発

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NMDA型GluR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NMDA型GluR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)。

12. 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)。

13. NHALE患者髄液のGluN2B-NT2抗体 IgGサブクラスの検討

ELISA法でGluN2B-NT2抗体のIgGサブクラス

別の定量測定する系を確立し、髄液GluN2B-NT2抗体陽性の217例の非傍腫瘍性NHAEから、免疫治療前の髄液が十分保存されていた22例の髄液と、疾病対照17例の髄液を検討した(高橋)。

14. NHAE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

NHAE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(GluN2B、GluN1、GluD2、LGI1、Caspr2、ADAM22、ADAM23、NMDA型GluR複合体)等を測定する(高橋)。

15. 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(GluN2B、GluN1、GluD2、LGI1、Caspr2、ADAM22、ADAM23、NMDA型GluR複合体)等を測定する(高橋)。

16. 免疫調節遺伝子の発現検討

NHAE患者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*, *CTLA-4*; *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)。

17. 免疫調節遺伝子のSNP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)にてリファ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データと比較する(高橋)。

18. NHAE急性期の抗体産生に関わるNMDA型GluR抗原の検討

NHAE急性期のNMDA型GluR抗体産生の抗原刺激となるNMDA型GluR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(高橋)。

19. NHAEの細胞傷害性T細胞の役割の検討

剖検で明らかになっているNHAEの海馬ニューロンの減少の原因を明らかにするため、NHAE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)。

(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いるため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2)。

④動物実験は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方法で行った（承認番号2013-111）。

2012年度から2014年度の研究計画を示す（表3）。

表2. 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
2011-11	てんかんでみられる精神症状のグルタミン酸受容体自己免疫学的機序に関する研究	2011年12月16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
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
2012-5	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
2013-2	自己免疫介在性神経疾患に関する研究-対照症例について	2013年4月26日
2013-27	自己免疫介在性脳炎・脳症に関する多施設共同研究2013	2014年1月24日
2013-29	自己免疫介在性神経疾患に関する研究-対照調査研究について	2014年1月24日
2014-1	自己免疫性脳炎および難治性てんかんにおける自己抗原の同定、および自己抗体の作用機構の解明（201312改訂）	2014年4月8日
2014-2	自己免疫介在神経疾患の免疫調節関連遺伝子の解析201402	2014年4月8日

表3. 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枢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

表4. 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、GluR82、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、GluR82、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。

表 5. 2014 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 (2012-14 年度、高橋、森が担当)
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、保存義務期間終了、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 (2013-14 年度、高橋、森が担当)
2012年度、ウサギGluN2B-NT2抗体を作成し、2013年度マウスにpassive transferし、不安行動変化を見出した。このマウスの海馬組織のマイクロアレイ解析で遺伝子発現の変化を解析し、変化のあった遺伝子について、遺伝子発現解析システムQuantiGene Plex により定量する。
3. 正常対照の年齢・性別血清 GluN2B-NT2 抗体の自然経過と抗体高値対照例の検討 (2014 年度、高橋が担当)
2013年度に職員対照ボランティアの中に見出した若年女性成人の抗体高値例について、正常抗体例と臨床的、精神心理的、血液学的に差がないかを検討する。
4. 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 (2012-14 年度、西田、高橋が担当)
NHALE前駆期の可能性がある精神症状を持つ若年者、自閉症などで、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)
5. 免疫調節遺伝子のゲノム解析 (2012-14 年度、高橋が担当)
2013年度の48例に引き続き、Foxp3、CTLA-4、PDCD-1、T-betなどの免疫調節遺伝子のゲノム解析症例を増やす。(目標合計60例)

「先行症状期関連」

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 (2014 年度、高橋が担当)
無菌性髄膜炎からNHALE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検査データを比較する。
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 (2014 年度、高橋、森が担当)
Passive transferのGluN2B-NT2抗体量を2013年の量より増量し、前駆期から先行症状期への移行が可能か? 検討する。
8. 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 (2012-14 年度、高橋、森が担当)
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、GluR82、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20例)

「その他」

9. 免疫調節遺伝子 (Foxp3、CTLA-4、PDCD-1、T-bet) の発現解析 (2012-14 年度、高橋が担当)
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。
10. 抗神経抗体の測定法開発 (2012-14 年度、高橋、森が担当)
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。

C. 研究結果

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

2011年11月-2014年10月の集積症例数は、NHAE (412例/3年)、卵巣奇形腫合併脳炎 (52例/3年)、痙攣重積型脳炎 (119例/3年)、その他の急性脳炎 (203例/3年)、局在関連性てんかん (370例/3年) など、合計2158例/3年を集積、NMDA型GluR抗体などを測定した (表6)。

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

2013年3月に、NMDA型GluR構造とGluN2B (GluR ϵ 2) 抗体の項などに最近の知見を加え、ホームページの診断スキーム

(<http://www.shizuokamind.org/images/stories/pdf/06-1-2-15.pdf>) を更新した。2014年度は、スキームを見直すべく検討中である (高橋、森、西田)。

3. NHAEなどの既往歴

非傍腫瘍性NHAE患者217名では、精神障害関連既往症を21名 (10%) に、自己免疫性疾患関連を9名 (4%) に、婦人科関連を8名 (4%) に認めた。精神障害関連既往症の内訳は、うつなどの気分障害8名、アルコールや覚醒剤に対する依存症8名、発達障害5名だった。

卵巣奇形腫などの傍腫瘍性NHAE患者107名中、産婦人科関連既往症を9名 (8%) に、精神障害関連を5名 (5%) に、脳炎・髄膜炎を4名 (4%) に、てんかんと3名 (3%) に認めた。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。

髄液GluN2B-NT2抗体が高値の精神疾患患者8名の (抑うつ2名、幻覚妄想2名、躁1名、行動異常1名、不安1名、見当識障害1名) の既往歴では、アルコール依存あるいは大量飲酒を3名に、橋本病を1名に認めた (西田)。

4. 抗体陽性患者の精神症状の検討

髄液GluN2B-NT2抗体高値の精神疾患患者8名の主たる精神症状は、抑うつ2名、幻覚妄想2名、躁1名、行動異常1名、不安1名、見当識障害1名だった。精神症状を伴う脳炎後てんかん患者4名の主たる精神症状は、興奮、衝動行為、行動異常、幻聴と様々だった (西田)。

5. 精神病症状例のNMDA型GluR抗体の推移

精神病症状が確認できたてんかん患者8名中、血清あるいは髄液GluN2B-NT2抗体、GluN2B-CT抗体、GluN1-NT抗体、GluD2-NT抗体のいずれかが高値を示したのは3名だった。3名中1名では精神症状寛解後も血清中の抗体価は高値を示し、1名では精神症状寛解後は血清中の抗体価は高値を示さなくなり、1名では精神症状寛解後も髄液中の抗体価は高値を示したが低下した。NMDA型GluR抗体と精神症状の経時的関連は更なる検討を要すると考えられ、NHAE前駆期の精神症状と抗体価の関係の検討に結び付けたい (西田、高橋)。

イスラエルの統合失調症患者の1名で、抗NMDAR抗体を検出した。この患者ではNMDA型GluRの機能を向上させるD-セリン投与が症状の改善に有効であった (森)。

抗甲状腺抗体陽性で精神症状のあるNMDA型GluR抗体陽性6例と陰性6例を比較した。2群の臨床背景として、年齢、罹病期間、MMSEの値に違いはなかった。精神神経学的症状では、抗体陽性群で感情不安定 ($p=0.030$) が多く、幻覚 ($p=0.038$)、妄想 ($p=0.001$) が少なかった (千葉、高橋)。

6. NHAE患者の前駆期自己免疫状況の検討

今後、日赤から保存血清検体をいただければ、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)。

7. 健常者の年齢・性別NMDA型GluR抗体分布

2013年度には0-20歳の非炎症性の病因のてんかん症例と、静岡てんかん・神経医療センター職員 (74例) の血清を用いた健常者の自己抗体 (GluN2B、GluN1、GluD2) を検討した。女性では30-40歳にピークとなる回帰曲線分布が見られ、20-40歳には回帰曲線からかなり外れた高い値をとる群が存在した (図3)。男性では50-60歳にピークとなる回帰直線分布が見られ、GluN2B-NT2抗体とGluN1-NT抗体では40-60歳には回帰直線からかなり外れた高い値をとる群が存在した。

2014年度には静岡てんかん・神経医療センタ

一職員（179例）の血清を用いて、自己抗体を追加測定した。今後、自己抗体の値と一般臨床検査値との関連を検討する（高橋）。

8. NMDA型GluR抗体陽性患者髄液の作用の検討 in vitro

培養ラット胎児神経細胞のtCREB濃度比は、NHALE髄液を加えた系では疾病対照髄液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。

NMDA型GluR抗体陽性NHALE患者の髄液あるいは髄液IgG分画を培養神経細胞に加えたが、tAkt濃度には、変化は見られなかった。pAkt濃度は、7DIVのNHALE-total CSFを加えた場合 (1.06±0.15, n=16) が、7DIVのNHALE-CSF-IgGを加えた場合 (0.97±0.09, n=14) (Mann Whitney test, p=0.0312) 及び10DIVのNHALE-total CSFを加えた場合 (0.78±0.15, n=12) (Mann Whitney test, p<0.0001) より有意に高値であった。p-Akt/tAkt比は、7DIVのNHALE-total CSFを加えた場合 (1.06±0.15, n=16) が、7DIVのNHALE-CSF-IgGを加えた場合 (0.97±0.10, n=14) (Mann Whitney test, p=0.0337) 及び10DIVのNHALE-total CSFを加えた場合 (0.75±0.12, n=12) (Mann Whitney test, p<0.0001) より有意に高値であった（高橋）。

9. 合成NMDA型GluR抗体によるPassive transfer研究 in vivo

ヒトGluN2B-NT2ペプチドで免疫したウサギの血清にはGluN2B-NT2ペプチド反応する抗体が含まれることをELISAで確認、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（高橋）。

10. NHALE患者にみられる先行症状期の検討

NHALE207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（図4）。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）。

NHALE症例の末梢血RBC数は、感染症対照 (p<0.03)、対照 (p<0.05) に比べて有意に高値であったが、発病前の日数との明らかな関係は認めなかった（図5）。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。Albumin濃度は感染症対照と比べて有意差がなかったが、対照 (p=0.01) より有意に低値で、発病日に向けて低下する傾向を認めた。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。IgG (p<0.02)、IgM (p<0.01) は対照より有意に高値であったが、感染症対照とは有意差がなかった。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が、発病日との明らかな関係は認めなかった。

髄液一般検査では、NHALEの髄液細胞数は、疾病対照群に比べて有意に多く ($p < 0.0001$)、脳炎発病に向けて低下した ($p = 0.03$)。NHALE群の髄液蛋白濃度は、感染対照群、疾病対照群に比べて有意に高値であった ($p < 0.0001$) (図6)。

NHALE群の髄液糖濃度は、感染対照群、疾病対照群に比べて有意に低値であった

($p = 0.0006$, $p = 0.0230$)。髄液糖は発病年齢が高いほど高値をとる傾向を示した

($p = 0.0168$)。NHALE群の髄液IgG濃度は、疾病対照群に比べて有意に高値であった

($p < 0.0001$)。NHALE群の髄液albumin濃度は、疾病対照群に比べて有意に高値であった

11. 浮遊系293F細胞を用いた抗体測定系開発

浮遊性293F細胞株を用いた安定発現株の作製では、2013年度にデルタ型GluRの安定発現細胞株を得た。2014年度、Cell sorting法を繰り返したが、NMDA型GluRの安定発現細胞株は得られなかった(森)。

12. 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7)。

抗AMPA 1抗体はすべての髄液、血清検体で陰性であった。髄液抗AMPA 2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 2抗体はすべての検体で陰性であった。

髄液抗CASPR 2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LGI 1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、傍腫瘍症候群1/4例、精神症状例1/1例で±であった(高橋)。

13. NHALE患者髄液のGluN2B-NT2抗体 IgGサブクラスの検討

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有意に高値であった。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 ($p = 0.03$)、てんかん発作予後 ($p = 0.01$)、認知機能予後 ($p = 0.04$) と直線の回帰が認められ、相関関係が認められた。IgG3サブクラスは、Barthel score ($p < 0.01$)、てんかん発作予後 ($p < 0.01$)、認知機能予後 ($p < 0.01$)、運動機能予後 ($p < 0.01$) と直線の回帰が認められ、相関した(高橋)。

14. 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

血液脳関門攻撃因子 (MMP-9)、サイトカイン、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)等を測定中である(高橋)。

15. 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

疾病対照として、てんかん患者の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、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)等を測定中である(高橋)。

16. 免疫調節遺伝子の発現検討

NHALE患者の免疫調節遺伝子 (*forkhead box P3*, *Foxp3*; *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*, *CTLA-4*; *programmed cell death-1*, *PDCD-1*; *T-bet*) の発現を検討している(高橋)。

17. 免疫調節遺伝子のSNP検討

NHALE患者の免疫調節遺伝子 (*forkhead box P3*, *Foxp3*; *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*, *CTLA-4*; *programmed cell death-1*, *PDCD-1*;

T-bet) の両鎖ダイレクトシーケンスを行い、検体を蓄積中である（高橋）。

18. NHALE急性期の抗体産生に関わるNMDA型GluR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）。

19. NHALEの細胞傷害性T細胞の役割

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、GluN2B-NT2抗体、GluN2B-CT抗体、GluN1-NT抗体、GluN1-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）。

表 6. 多施設共同研究の症例収集状況 病態分類別症例数

	201111-201210	201211-201310	201311-201410	201111-201410 合計
非ヘルペス性急性辺縁系脳炎	141	148	123	412
卵巣奇形腫合併脳炎	14	18	21	53
痙攣重積型脳炎	37	38	44	119
脳幹脳炎	6	5	2	13
その他の急性脳炎	67	69	67	203
CNSループス	11	8	23	42
橋本脳症	13	9	20	42
ADEM	7	4	6	17
再発性脳炎	29	37	34	100
亜急性脳炎	46	54	84	184
傍腫瘍性脳炎	2	8	5	15
ALS	7	0	0	7
CJD	7	6	2	15
精神疾患	29	51	39	119
Rasmussen症候群	24	13	25	62
局在関連性てんかん	101	153	116	370
West症候群	6	9	4	19
症候性全般てんかん	9	11	3	23
小脳炎	31	27	38	96
不随意運動	8	3	6	17
HPVワクチン関連			45	45
その他	79	53	53	185
合計	674	724	760	2158

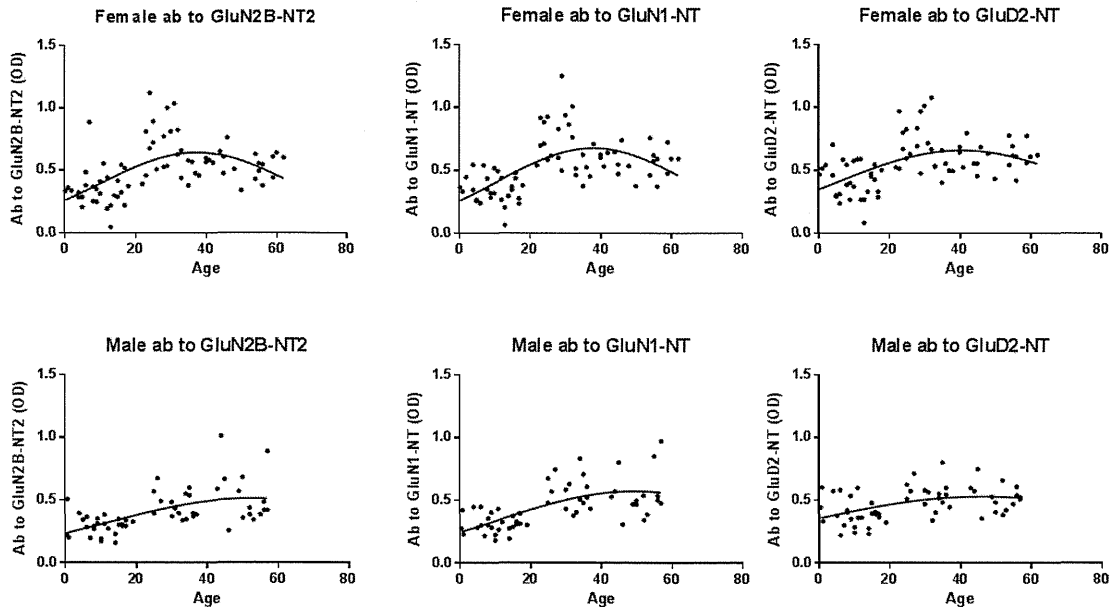


図 3. 対照血清の年齢・性別 GluR 抗体値

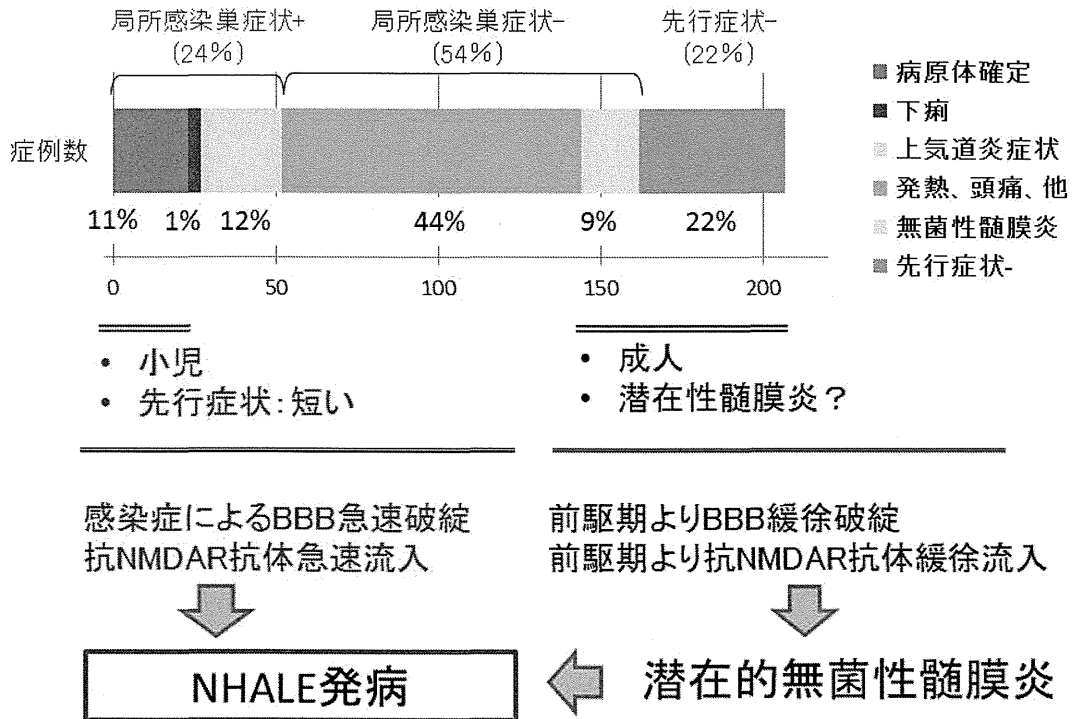


図 4. 非ヘルペス性急性辺縁系脳炎の先行症状期の臨床症状

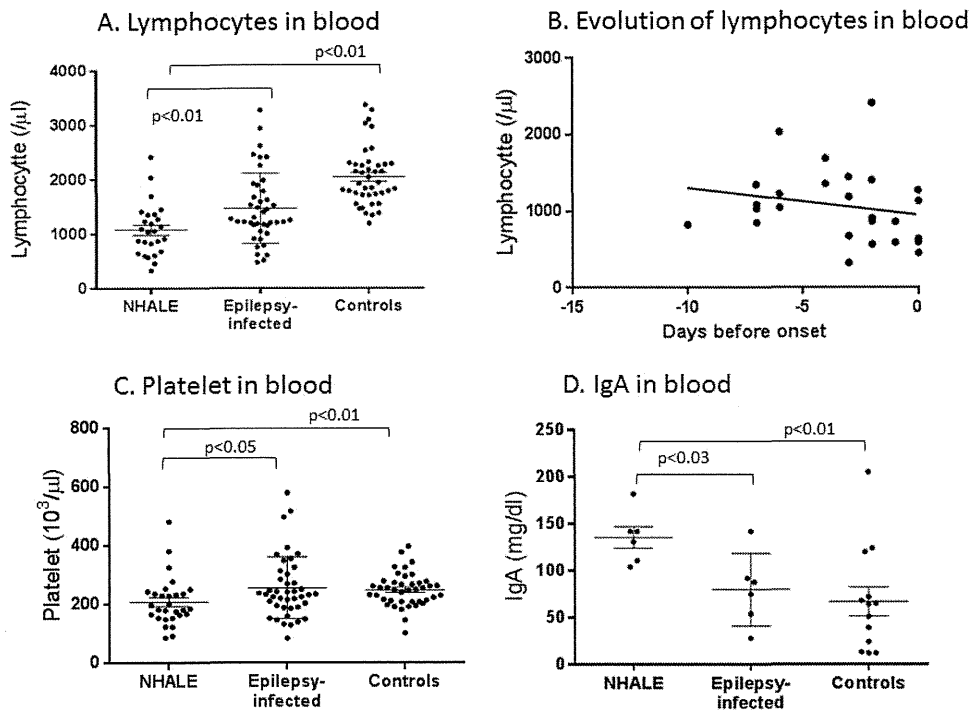


図 5. 非ヘルペス性急性辺縁系脳炎の先行症状期の血液リンパ球、血小板、IgA

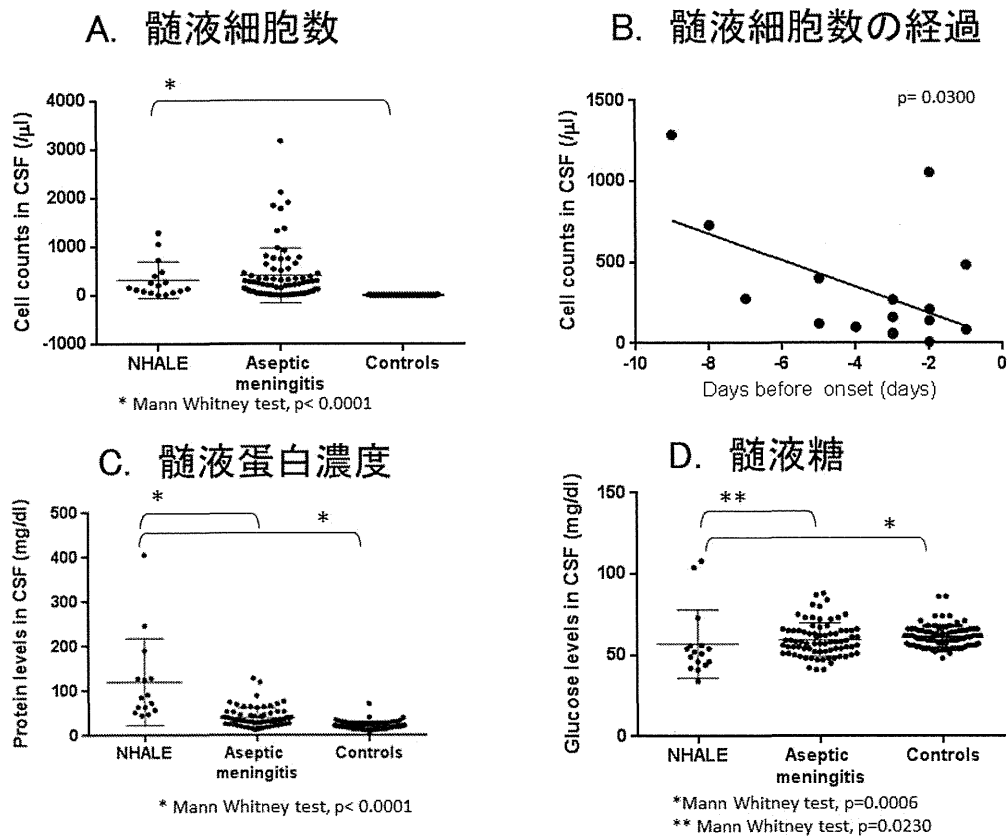


図 6. 非ヘルペス性急性辺縁系脳炎先行症状期の髄液細胞数、蛋白濃度、糖濃度。