

表7. 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, GluR 2; 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

### 前駆期研究のまとめと今後の戦略

#### 1. NHALE患者にみられる既往歴

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る。また、髄液GluN2B-NT2抗体高値を示した精神疾患患者でも、アルコール依存あるいは大量飲酒が3名、橋本病が1名で既往歴としてみられ、共通点がある。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の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(図7)。

#### 2. 抗体と精神症状の検討

NHALE前駆期の可能性があるGluN2B-NT2抗体陽性精神疾患患者と、精神症状を伴う脳炎後てんかん患者の精神症状は多彩で、GluN2Bが発現している部位が中枢神経系の広範な場所であるために、GluN2B-NT2抗体による精神症状が多彩となると推測している。しかし、GluN1が発現するがGluN2Bの発現は少ないとされる小脳や脳幹の症状は顕著ではなかった。てんかん精神病患者の精神症状とNMDA型GluR抗体の推移を多数例でさらに検討し、NHALE前駆期の抗体値と症状の関係の理解につなげたい。

NHALE前駆期の可能性がある統合失調症の一部症例に、抗NMDAR抗体の存在が報告されるようになった。我々研究班の症例では、NMDA型GluRの機能を向上させるD-セリンの投与が有効であったことから、前駆期の治療に用いることができるかもしれない。同様の抗NMDAR抗体が関与する統合失調症症例でのD-セリンの効果を検証する必要がある。

#### 3. NHALE患者の前駆期自己免疫状況の検討

NHALE患者の発病前献血保存血の入手は保存義務の11年を待つ必要があり、免疫マーカーの解析はすぐにはできない。今後の集積と解析を待ちたい。この検体で測定ができれば、患者での直接的な前駆期の証明、前駆期から先行症状期、発病期へのプロセスが分かる可能性がある。

#### 4. 健常者の年齢・性別NMDA型GluR抗体分布

0-20歳の非炎症性の病因のてんかん症例と、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(図3)。NMDA型GluR抗体が著しく高い前駆期に該当する健常者が存在することを示唆する。今後、20-40歳の女性での検討を増やし、NMDA型GluR抗体が著しく高い群について、健康調査を行い前駆期症状の有無を検討したい。

#### 5. 患者髄液を用いたNMDA型GluR抗体的作用の検討: in vitro

我々は、培養ラット胎児神経細胞を用いたin vitro研究で、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。

CREBリン酸化のin vitro研究では、NHALE患者髄液IgGは、対照髄液IgG分画に比べてCREBリン酸化が低く、わずかにシナプスNMDA型GluRを内在化している可能性が示唆された。

Aktリン酸化のin vitro研究では、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。NMDA型GluR抗体によるシナプスNMDA型GluRの内在化は、シナプス結合蛋白にアンカーされているため、シナプス外NMDA型GluRの内在に比べて弱く、比較的早期に回復するのではないかと推測している。

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

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)が高率に認められ、反復投与でその頻度が増加した。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(図8)。また、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、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。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<sup>-</sup>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<sup>-</sup>イオンが増加し、GABAがGABA<sub>A</sub>受容体に作用するとCl<sup>-</sup>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。

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す、NHLE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。

NMDA型GluR抗体をマウスにpassive transferすることで、行動変化、分子生化学的変化をとらえる動物モデルを構築できた。現在行っているGluN2B-NT2抗体投与モデルでの行動解析を多方面からすすめ、前駆期病態をさらに詳しく検討する。今後はGluN1-NT抗体投与モデルマウスでも解析を行う。

## 先行症状期研究のまとめと今後の戦略

### 1. 先行症状期症状・検査の検討

先行症状期の臨床症状研究では、NHLE207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、頭痛といった局所感染症状を伴わない非特異的な症状が多い(54%)ことが分かった。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(図4)。よって、NHLEの成人患者さんの多くが、先行症状期に無菌性髄膜炎を有するのかもしれない。

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、早期診断に繋がる特徴である可能性がある(図5)。

先行症状期の髄液データの検討では、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、髄液蛋白濃度は無菌性髄膜炎に比べて有意に高値で、髄液糖濃度は無菌性髄膜炎に比べて有意に低

値であった。無菌性髄膜炎であっても蛋白がかなり高く、糖が比較的低い場合にはNHLEへの進展に注意する(図6)。

早期診断の流れとしては、①発熱、頭痛といった非特異的な不明熱の症例で、②末梢血でリンパ球、血小板の減少、IgA高値、CRPの比較的低値がある場合には、積極的に髄液検査、髄液NMDA型GluR抗体測定を行い、③無菌性髄膜炎で蛋白高値、糖比較的低値の場合は、NHLEへの進展を注意する。

### 2. 先行症状期の病態仮説

先行症状期における末梢血リンパ球・血小板の減少は、リンパ球・血小板からのNMDA型GluR放出を示唆し、抗原となってNMDA型GluR抗体のプロスターをもたらしている可能性が強い。無菌性髄膜炎がある場合には、CNSでリンパ球が細胞死を起こし、リンパ球に発現するNMDA型GluRの破碎-抗原提示が起こり、CNS内でもNMDA型GluR抗体産生にプロスターがかかるために辺縁系症状が出現し、NHLE発病につながる可能性が推定される。

NHLE群の先行症状期髄液albumin濃度が対照に比べて高いのは、血液脳関門の破綻によるものと推測している。末梢血albumin濃度は、対照より有意に低値で、発病日に向けて低下する傾向を認め、先行症状期から血液脳関門の破綻があり、albuminが血中から中枢神経系へシフトしていることを示唆している。また、血液脳関門の保護も重要で、これによりNHLEの発病予防が可能となる可能性がある(図9)。

## 発病期研究のまとめと今後の戦略

### 1. 患者髄液を用いた検討: in vitro

培養ラット胎児神経細胞にNMDA型GluR抗体陽性NHLE患者髄液あるいは患者髄液IgG分画を加え、in vitroでNMDA型GluR抗体の機能を検討している。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抗体以外の髄液中の因子が神経細胞死などの病態や、意識障害などの脳炎症状をもたらしていることが考えられる。

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

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、挙尾反応が高率に認められ、反復投与でその頻度が増加したが、明らかな意識障害は起こらなかった。このことからNMDA型GluR抗体以外の髄液中の因子が神経細胞死をもたらし、脳炎症状を表出していることが考えられる。

NHALEの髄液成分はNMDA型GluR抗体のみならず、補体、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(図9)。

## 3. NHALEの細胞傷害性T細胞の役割

NHALEでは、髄液granzyme B濃度が疾病対照に比べて有意に高く、髄液細胞数と関連したことから、CNS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。

髄液granzyme B濃度の高い群で髄液GluN2B-NT2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NMDA型GluR抗体が産生されている可能性が示唆された(図9)。

## 抗体検出系の研究

### 1. 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NMDA型GluR抗体などのより簡便で定量性の高い検出系を確立するために、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。また、ビーズ法による抗体測定系確立の検討を行っている。

### 2. Autoimmune Encephalitis Mosaic1キットの検討

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。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、感度が低いかもしれない。抗AMPA抗体は再発性脳炎の1例の髄液で土であったが、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、感度が低い可能性がある(表7)。

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。

### 3. GluN2B-NT2抗体 IgGサブクラスの検討

非傍腫瘍性NHALEでは、髄液GluN2B-NT2抗体はすべてのIgGサブクラスが増加し、遅れて上昇すると思われるIgG3、IgG1サブクラス抗体が誘導する補体介在性の神経障害がNPNHALEの重症度、予後を規定している可能性がある。今後、活性化補体の検討を進め、予後の改善、治療法選択に活かしたい。

### 4. GluN2B-NT2抗体 (ELISA) の意義の考察

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。

## 自己免疫病態の研究

自己抗体などが産生されるメカニズムを明らかにするために免疫調節遺伝子(*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。またそれらの遺伝子発現量に影響する可能性のあるSNPを、両鎖ダイレクトシーケンスを行い、データ蓄積中である。

また、NMDA型GluR抗体を産生させる抗原量の変化を検討する目的で、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。

## 自己免疫介在性脳炎・脳症の診断スキームの作成

2013年3月、「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3)。今後さらに病態等の知見を加えていく予定である。

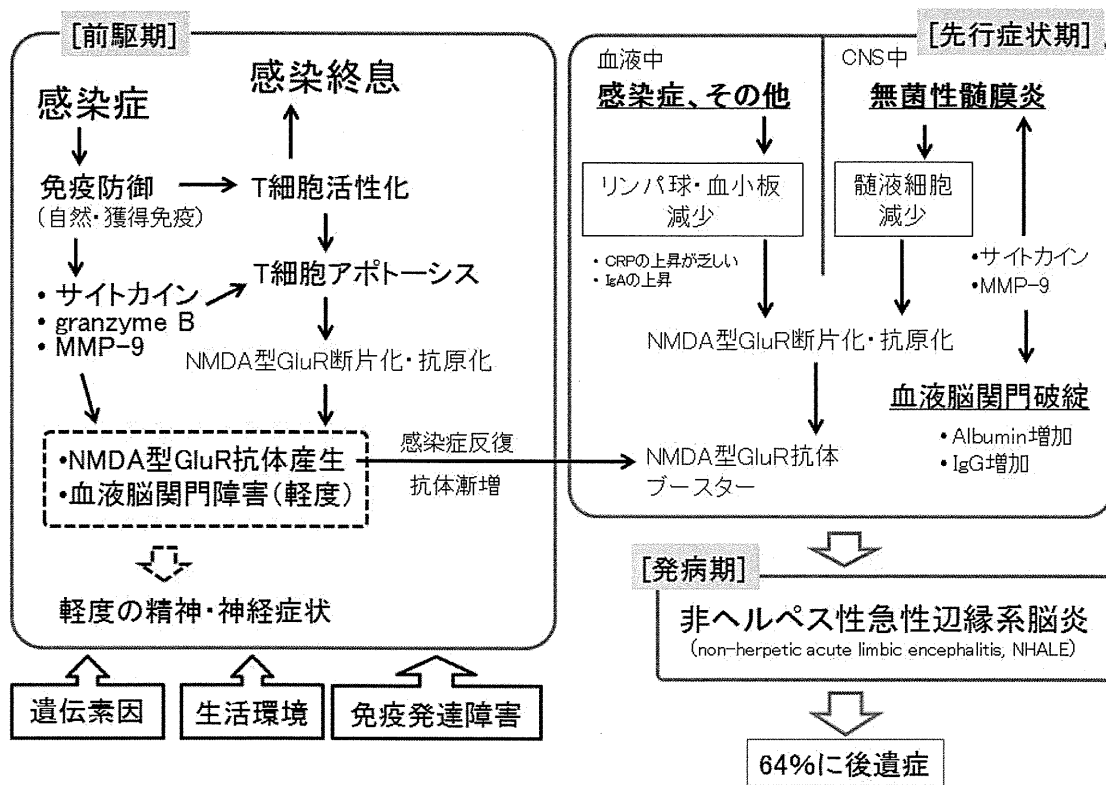


図7. 非ヘルペス性急性辺縁系脳炎の前駆期、先行症状期、発病期病態仮説

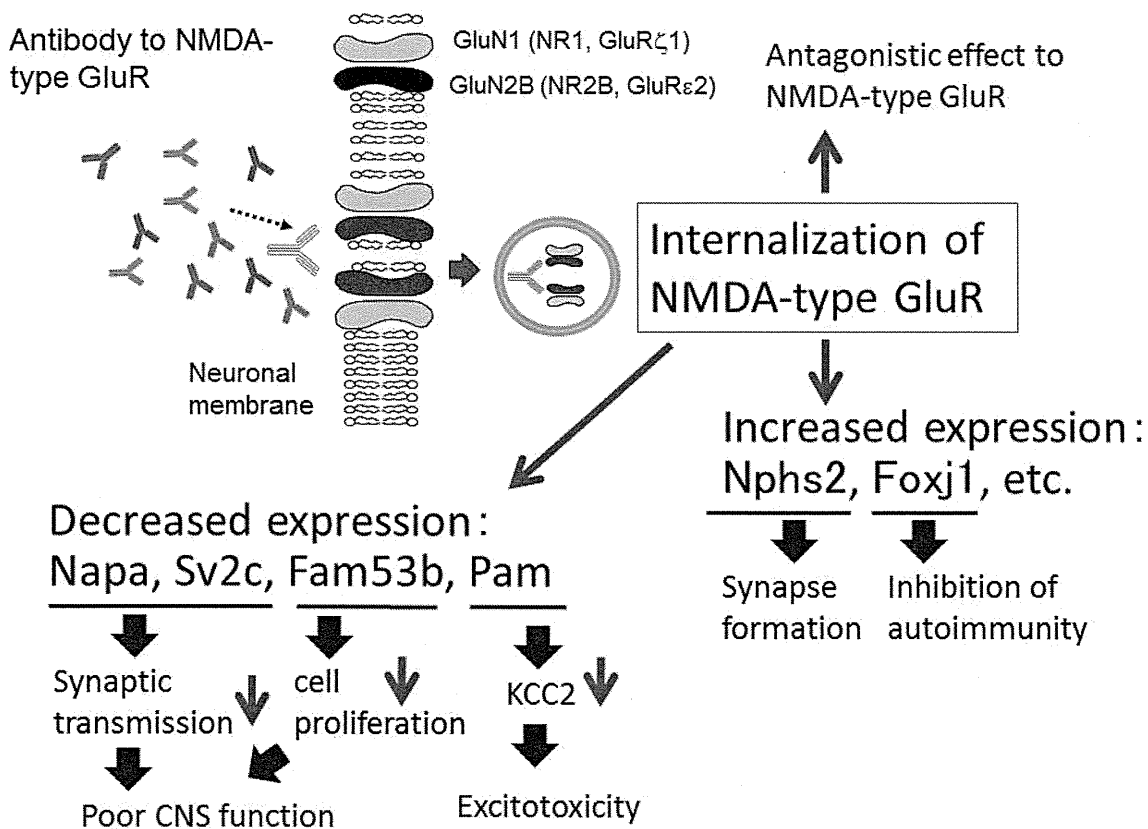


図8. NMDA型GluR抗体の病態機能仮説

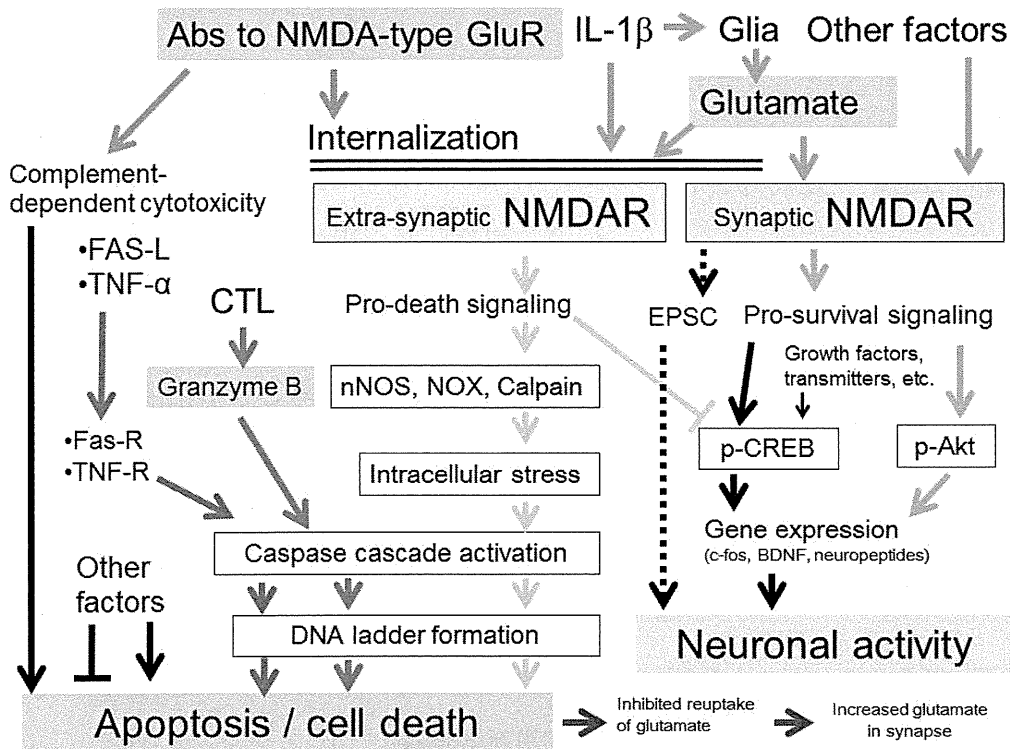


図9. 非ヘルペス性急性辺縁系脳炎における抗体、サイトカイン、granzyme Bなどの役割

## E. 結論

前駆期に対する研究アプローチの中で、①NHAE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、②20-40歳の女性正常対照の中に血清NMDA型GluR抗体 (GluN2B-NT2抗体) が著しく高値の群が見つかり、③NMDA型GluR抗体をpassive transferするマウスモデルにおいて、興奮性の行動変化が観察され、④NHAE患者髄液IgG分画が、in vitroでAktリン酸化を抑制、シナプス機能を抑制することを見出した。以上からNMDA型GluR抗体が存在し軽度の精神神経症状を表出する前駆期が、NHAE発病前に存在するものと確信してきた。

先行症状期の研究では、①発熱、頭痛といった不明熱的な症状が先行症状として多いこと、②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、③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、早期診断に繋がる特徴である可能性があること

が分かった。④髄液検査では、無菌性髄膜炎に比べて髄液蛋白が有意に高く、糖は有意に低値であり、脳炎移行の早期診断に繋がる特徴である可能性があることが分かった。

先行症状期中枢神経系でのリンパ球細胞死によりリンパ球発現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、NHAE発症につながる可能性が推定される。NHAE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因子を確定する必要がある。また、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NHAE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

- 2013年10月9日、NMDAR抗体IgGサブクラス測定法の開発、発明者：高橋幸利、西村成子⇒特願2013-211813、出願：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団.
- 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.
- フェノキシ-(N-置換カルバモイルメチル)-アセトアミド誘導体およびそれを有効成分とするセリンラセマーゼ阻害剤 森寿、豊岡尚樹、水口峰之他 特願2012-015233.
- N-(置換)-2-(置換スルファモイルアミノ)-アセトアミド誘導体およびそれを有効成分とするセリンラセマーゼ阻害剤 森寿、豊岡尚樹、水口峰之他 特願2012-037977.
- N-[ (アシル) ヒドラジノカルボチオニル]-アセトアミド誘導体およびそれを有効成分とするセリンラセマーゼ阻害剤 森寿、豊岡尚樹、水口峰之他 特願2012-049955.
- ベンゼンスルホニルアミド誘導体およびそれを有効成分とするセリンラセマーゼ阻害剤 森寿、豊岡尚樹、水口峰之他 特願2012-135591.

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## 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 $\epsilon$ 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】イムノブロット法より感度が高く簡便なELISAによるGluR $\epsilon$ 2（NR2B）、GluR $\zeta$ 1（NR1）、GluR $\delta$ 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 $\epsilon$ 2N/RとGluR $\zeta$ 1N/R-EGFPを一過的に共発現させたHEK293細胞（ $\epsilon$ 2+ $\zeta$ 1）と、GluR $\zeta$ 1N/R-EGFPを単独で発現させた細胞（ $\zeta$ 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 $\epsilon$ 2抗体（イムノブロット法IgG）の陽性率は33.7%、髄液中抗GluR $\epsilon$ 2抗体（イムノブロット法IgM）の陽性率は27.5%、抗GluR $\epsilon$ 2-NT2抗体の陽性率は77.5%、抗GluR $\epsilon$ 2-CT抗体の陽性率は83.3%、抗GluR $\zeta$ 1-NT抗体の陽性率は56.9%、抗GluR $\zeta$ 1-CT抗体の陽性率は71.4%、抗GluR $\delta$ 2-NT抗体の陽性率は70.8%、抗GluR $\delta$ 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 $\epsilon$ 2抗体（イムノブロット法）の陽性率は39.6%、抗GluR $\epsilon$ 2-NT2抗体の陽性率は81.3%、抗GluR $\epsilon$ 2-CT抗体の陽性率は68.2%、抗GluR $\zeta$ 1-NT抗体の陽性率は71.4%、抗GluR $\zeta$ 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 $\epsilon$ 2（NR2B）抗体、抗GluR $\zeta$ 1（NR1）抗体、抗GluR $\delta$ 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 $\epsilon$ 2抗体及び抗GluR $\zeta$ 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NHLE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NHLE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。

【NHLEの血液脳関門病態】非傍腫瘍性NHLE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。

【NHLEの中樞神経病理】非傍腫瘍性NHLE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。

【NHLE予後】成人非傍腫瘍性NHLE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。

【NHLE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NHLE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GluRε2抗体】成人NHALEでは、血清抗GluRε2(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GluRε2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GluRε2抗体陽性NHALEの74.5%は15-34歳が占め、抗GluRε2抗体は主として若年成人の脳炎に関与していた。抗GluRε2抗体陽性NHALEの初発神経症状は、精神症状が主体で、抗GluRε2抗体陰性NHALEに比べてけいれんが有意に少なかった。抗GluRε2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GluR2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、炎症の原因はウイ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<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>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GluR2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。

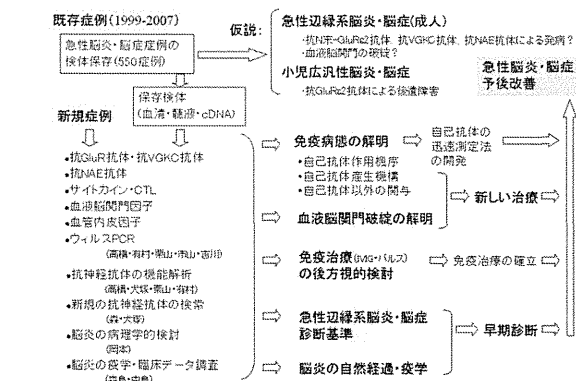


図1. 研究戦略

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GluRe2・GluRδ2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-GluRe2抗体の迅速測定法の確立：現在イムノプロットで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GluRe2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GluR $\epsilon$ 2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
  - 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 複合体の内在化 (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 $\gamma$ 、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
ウイルス検出	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

【イムノプロット】全長GluR $\epsilon$ 2・GluR $\delta$ 2分子を抗原とする抗GluR $\epsilon$ 2抗体・抗GluR $\delta$ 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 $\epsilon$ 2・GluR $\delta$ 2の全長蛋白を抗原としてイムノプロット法で行い、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 $\epsilon$ 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 $\zeta$ 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 $\zeta$ 1-NT抗体、抗GluR $\zeta$ 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 $\delta$ 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 $\delta$ 2-NT抗体、抗GluR $\delta$ 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 $\zeta$ 1(NR1)およびGluR $\epsilon$ 1(NR2A)、GluR $\epsilon$ 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 $\mu$ 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 $\zeta$ 1抗体および抗GluR $\epsilon$ 1抗体、抗GluR $\epsilon$ 2抗体を用いて確認した(図4、表5)(田中)。

NMDA受容体は、GluR $\epsilon$ 2+GluR $\zeta$ 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 $\epsilon$ 2N/R、GluR $\zeta$ 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 $\zeta$ 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 $\zeta$ 1(NR1)抗体の測定を検討した(森)。

**【on cell Western法】**通常NMDA受容体は、GluR $\epsilon$ (GluR $\epsilon$ 2、NR2)とGluR $\zeta$ 1(GluR $\zeta$ 1、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Ca<sup>2+</sup>透過性の低い変異体(GluR $\epsilon$ 2N/R、GluR $\zeta$ 1N/R-EGFP)発現ベクターを構築し、HEK293細胞に導入した。またGluR $\zeta$ 1N/R-EGFPを単独で細胞に導入した。また、GluR $\epsilon$ 2N/R-DsRedとGluR $\zeta$ 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℃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 $\mu$ 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、 $\chi^2$ 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 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 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- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )、tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、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 $\alpha$ 、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- $\gamma$ 、MCP-1(MCAF)、MIP-1a、MIP-1b、PDGF-bb、Rantes、TNF- $\alpha$ 、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<sup>125</sup>I-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 $\alpha$ -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  $\alpha$ -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  $\mu$  lからDNAを抽出(QIAamp Blood kit, QIAGEN)し、最終的に50  $\mu$  lのelution bufferに溶解し、そのうち10  $\mu$  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 $\zeta$ 1 (NR1)+GluR $\epsilon$ 1(NR2A)]に対する抗体

② [GluR $\zeta$ 1 (NR1)+GluR $\epsilon$ 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 $\epsilon$ 2 (NR2B)抗体

・サブユニットのドメインに対する抗体

④抗GluR $\zeta$ 1 (NR1)-NT抗体

⑤抗GluR $\zeta$ 1 (NR1)-CT抗体

⑥抗GluR $\epsilon$ 2 (NR2B)-NT2抗体

⑦抗GluR $\epsilon$ 2 (NR2B)-M3-4抗体

⑧抗GluR $\epsilon$ 2 (NR2B)-CT1抗体

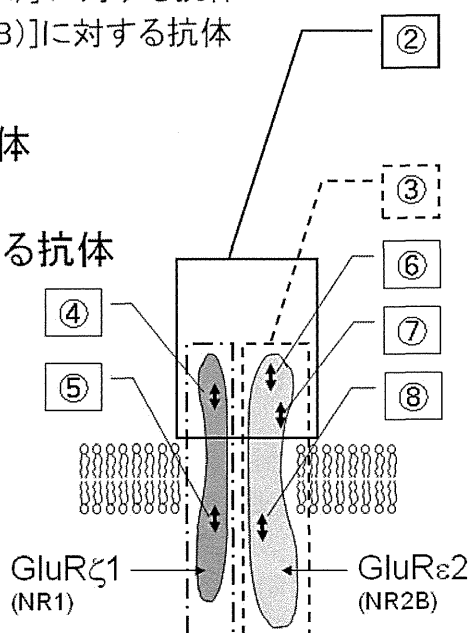


図2. NMDA型GluR サブユニット、複合体に対する抗体の分類

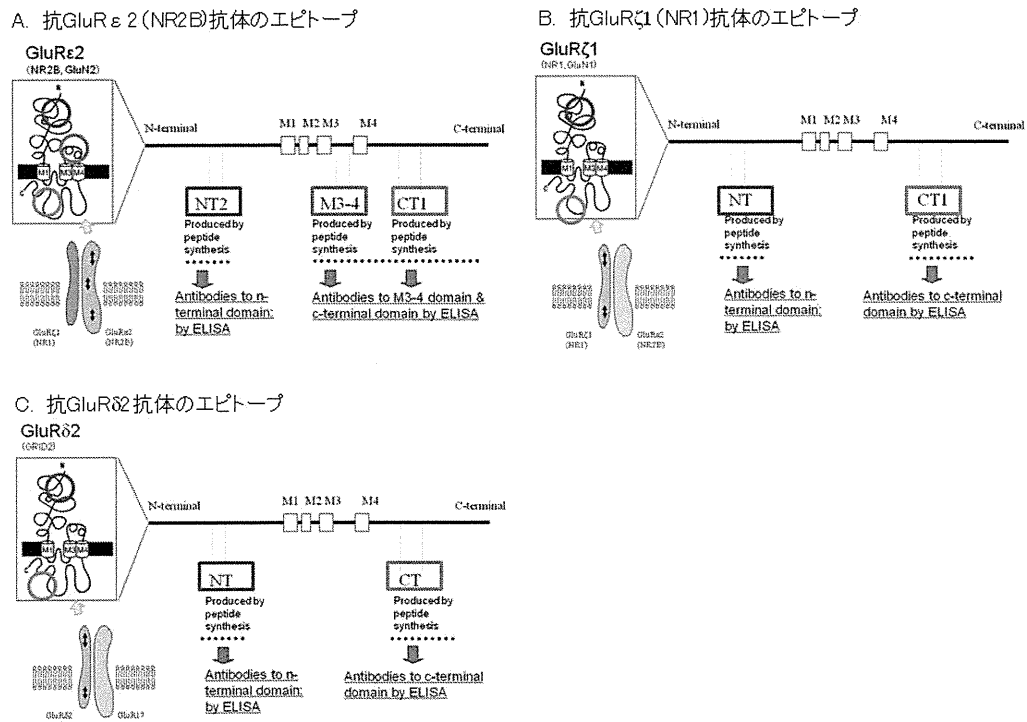


図3. 抗GluR抗体測定のための抗原エピトープ

Detection of autoantibodies to NMDAR subunits complex

Dalmau J, et al., Ann Neurol, 2007; 61: 25-36.

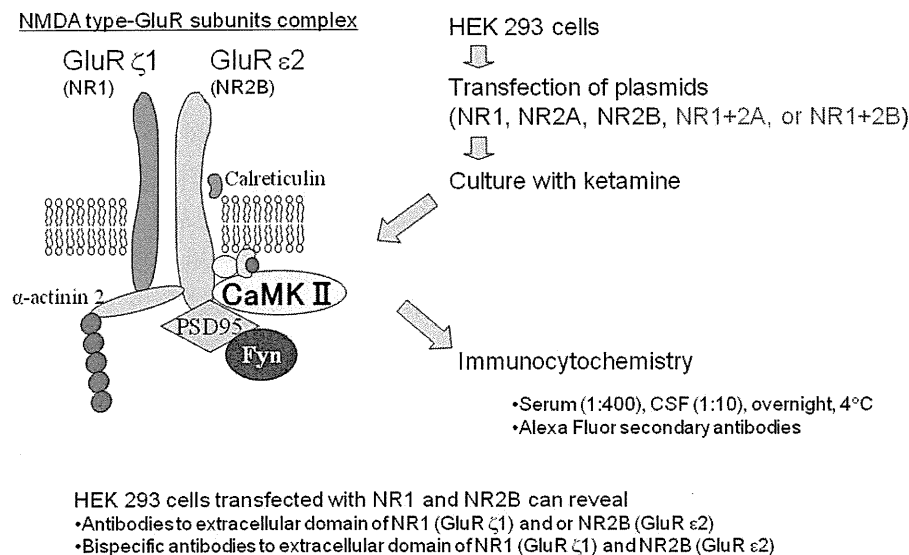


図4. 免疫染色によるNMDA型GluR複合体に対する抗体測定法 (Dalmau法)