

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, 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。

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

を検討した。2013年度は非傍腫瘍性NHAE42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NPNHAE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（高橋）。

10. NHAE先行症状期における免疫マーカーの検討

NHAE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NHAE217例の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（GluN2B, GluN1, GluD2, LGI1, Caspr2, ADAM22, ADAM23, NMDA型GluR複合体）等を測定する（高橋）。

11. 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. NMDA型GluR抗体のシナプスNMDA型GluRに対する作用の検討

NHAE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NMDAR抗体陽性NHAE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分画の神経細胞への影響を評価した（高橋）。

13. NHAE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サブクラスを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（*Foxp3*, *CTLA-4*, *PDCD-1*, *T-bet*）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（*Foxp3*, *CTLA-4*, *PDCD-1*, *T-bet*）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. 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、NMDA型GluR(GluRε2N/R-DsRedとGluRζ1N/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)。

19. 統合失調症患者の血清を用いた抗NMDAR抗体の計測

イスラエル、ヘブライ大学との共同研究で、NMDAR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)。

20. NHALE急性期の抗体産生に関わるNMDA型GluR抗原の検討

NHALE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)。

(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. イオンチャネル型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
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・脳症の病態解明の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
2013-1	自己免疫介在神経疾患の免疫調節関連遺伝子の解析201304	2013年4月26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

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

2012年-2013年の集積数は、NHALE (148例/年)、卵巣奇形腫合併脳炎 (18例/年)、痙攣重積型脳炎 (38例/年)、その他の急性脳炎 (69例/年)、局在関連性てんかん (153例/年) など、合計724例/年であった (表4)。

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. NHALE患者にみられる既往歴の検討

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。(西田)。

4. NHALE患者の前駆期自己免疫状況の検討

2013年度は207例全例にアンケート調査を送付したが、前駆期の保存検体の存在は確認できなかった。

NHALE発病前に献血のある9症例より、献血保存検体を使用する同意を得た。しかし、日赤血液センターからは、保存血使用の公募研究は承認されず、保留となっている。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

対象患者23名の血清中、GluN2B-NT2抗体、GluN2B-CT抗体、GluN1-NT抗体、GluD2-NT抗体

のいずれかが対照血清と比較して平均+2SD以上の高値を示したのは3名 (13%) (高抗体価群) だった。高抗体価群 (3名) と正常抗体価群 (20名) の臨床特徴を比較すると、脳炎の既往は、高抗体価群は0名、正常抗体価群は4名だった。外傷、脳腫瘍、脳外科手術などの既往は、高抗体価群は0名、正常抗体価群は5名だった。てんかん精神病のタイプは、高抗体価群は発作間欠期精神病3名、正常抗体価群は発作間欠期精神病14名、発作後精神病6名だった。精神病発症から検査時までの期間は、高抗体価群は平均7か月 (6~9か月) に対し、正常抗体価群は平均7年 (1か月~24年) だった (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)。

7. 健常者の年齢・性別NMDA型GluR抗体分布と推移

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の血清を用いて、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。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抗体のPassive transfer-行動解析

開始後22日に脳を摘出し、病理組織学的検査を実施したところ、組織学的検討でウサギGluN2B-NT2抗体は全例、海馬に投与されていることが判明した。行動観察では、ウサギ

GluN2B-NT2抗体群で有意な変化が見いだされ、検討中である。病理組織学的検査ではHE染色の結果、投与部位、海馬領域及び脳室への炎症細胞浸潤が生理食塩液群とウサギGluN2B-NT2抗体群ではほぼ同程度に認められた。また、抗ウサギIgG抗体によるGluN2B-NT2免疫染色では、大脳辺縁系にウサギGluN2B-NT2抗体の集積は認められなかった。

9. NHALE患者にみられる先行症状期の一般マーカーの検討

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、発病前の日数とは明らかな関係は認めなかった。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。アルブミン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 (高橋)。

10. NHALE先行症状期における免疫マーカーの検討

先行症状期の保存検体の収集は、後方視的、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)。

11. 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

浮遊性293F細胞株を用いた安定発現株の作製では、デルタ型GluRの安定発現細胞株を得た (森)。

12. NMDA型GluR抗体のシナプスNMDA型GluRに対する作用の検討

NHALE-total CSFを加えた場合のLDH濃度比 (検体/同時測定対照) は、10DIVにおいて7DIVより有意に高値であった (Mann Whitney test, $p = 0.0393$)。Total Akt濃度比 (検体/同時測定対照) は、有意差は見られなかった。

NHALE-total CSFを加えた場合の7DIVのp-Akt濃度比 (検体/同時測定対照) は、7DIVのNHALE-CSF-IgGを加えた場合 ($p = 0.0312$) 及び10DIVのNHALE-total CSFを加えた場合 ($p < 0.0001$) より有意に高値であった。

p-Akt/total Akt比は、7DIVのNHALE-total CSFを加えた場合が、7DIVのNHALE-CSF-IgG ($p = 0.0337$) 及び10DIVのNHALE-total CSF ($p < 0.0001$) より有意に高値であった (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 ($p < 0.01$)、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 ($p < 0.01$) と直線的回帰が認められ、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 (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 (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) 等を測定中である (高橋)。

16. 免疫調節遺伝子 (*Foxp3*, *CTLA-4*, *PDCD-1*, *T-bet*) 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 (*Foxp3*, *CTLA-4*, *PDCD-1*, *T-bet*) 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. 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自己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)。

19. 統合失調症患者の血清を用いた抗NMDAR抗体の計測

イスラエルの統合失調症患者では、1名で抗NMDAR抗体を検出した (森)。

20. 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)。

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	201211-201310
非ヘルペス性急性性辺縁系脳炎	136	141	148
卵巣奇形腫合併脳炎	20	14	18
痙攣重積型脳炎	44	37	38
脳幹脳炎	1	6	5
その他の急性脳炎	72	67	69
CNS ループス	6	11	8
橋本脳症	4	13	9
ADEM	7	7	4
再発性脳炎	19	29	37
亜急性脳炎	49	46	54
傍腫瘍性脳炎	7	2	8
ALS	10	7	0
CJD	17	7	6
精神疾患	26	29	51
Rasmussen 症候群	28	24	13
局在関連性てんかん	100	101	153
West 症候群	7	6	9
症候性全般てんかん	11	9	11
小脳炎	44	31	27
不随意運動	7	8	3
その他	63	79	53
合計	678	674	724

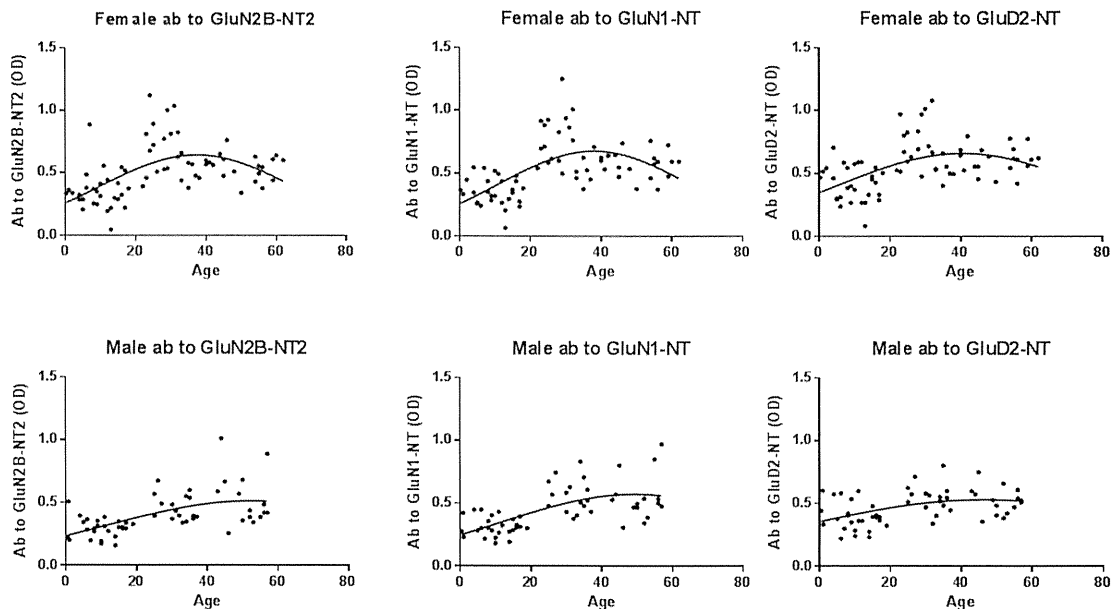


図3. 対照血清の年齢・性別GluR抗体値

D. 考察

前駆期研究のまとめと今後の戦略

前駆期に対するアプローチの中で、患者既往歴についての検討は順調に進んでいて、NHALEの10%程度の症例に、前駆期症状と推定できる既往歴があった。しかし、前駆期の保存血清の入手が困難で、その時期の免疫マーカーの解析はすぐにはできないことが判明した。そこで、方針を大きく変えることとし、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し、前駆期病態を検討することにし、現在進捗している。

2013年度研究で、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、その群の年齢・性がNHALEの好発年齢である若年女性に一致した。この高値群が前駆期症状を有しているかどうかを検討し、前駆期の研究につなげたい。

1. NHALE患者にみられる既往歴の検討

2012年度研究で、非傍腫瘍性の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、2013年度研究では傍腫瘍性NHALE患者の5%で精神障害関連の既往が見られ、4%

に脳炎・髄膜炎、3%にてんかんの既往がそれぞれみられた。傍腫瘍性NHALEも非傍腫瘍性NHALEでもNMDA型GluR抗体が発病以前から存在し、前駆期症状として精神障害を含む神経症状をもたらしている可能性がある。NMDA型GluR抗体はNMDA型GluRを内在化して拮抗作用を示すとされているが、NMDA型GluR拮抗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る。

傍腫瘍性NHALEの急性期の髄液NMDA型GluR抗体の値は、非傍腫瘍性NHALEより高値のことが多く、前駆期からNMDA型GluR抗体が高値のために、非傍腫瘍性NHALEに比べてより強い前駆期症状である髄膜炎やてんかんが起る可能性がある。

2. てんかん精神病患者の検討

てんかん精神病患者23名中3名が血清GluR抗体高値を示し、発作間欠期精神病の病像を示し、発病から検査までの期間が1年以上と短かった。てんかん精神病の一部で急性期から亜急性期

において、NMDA型GluR抗体がその病態に関与している可能性が考えられ、前駆期症状となる可能性がある。

3. 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て作成したポリクローナルIgG抗体（ウサギGluN2B-NT2抗体）を用い、マウスにpassive transferすることで、行動変化、分子生化学的变化をとらえる動物モデルを構築してきている。このモデルを用いて、NMDA型GluR抗体単独での作用を見ていく予定である。

田中らは、脳炎患者髄液そのものをマウスに投与し、致命的な結果を報告している（抗NMDA受容体脳炎患者髄液を用いた動物モデルの作成と病態の解析、田中恵子、他、日本神経免疫学会、2013年11月27-29日、下関）。一方、患者髄液IgG分画では変化がなかったとしている。我々のこれまでの研究では、患者髄液の中のIgG分画以外の成分が培養神経細胞にアポトーシスをもたらすこと（参照1）、髄液中のgranzyme Bが高値で、細胞傷害性T細胞が関与する症例があることが分かっている（参照2）。このようにNHALEの髄液は、NMDA型GluR抗体のみならず、異なる免疫病態を担う複雑な成分を含むと推定され、NMDA型GluR抗体のみの作用は、passive transferモデルで、量的な要素を含めて検討する必要があると考えている。

4. 健常者の年齢・性別NMDA型GluR抗体分布と推移

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の血清を用いた健常者のGluN2B-NT2抗体等の検討で、NHALE後発年齢帯の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ことは、NHALEの発病前にNMDA型GluR抗体が著しく高い前駆期が存在することを示唆すると考える。今後、20-40歳の女性で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。

先行症状期研究のまとめと今後の戦略

2012年度の先行症状期の臨床症状研究では、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14%と少なく、発熱、頭痛といった非特異的な症状が多いこと、脳炎症状出現前に髄液検査された18例中18例で無菌性髄膜炎の診断がされていたことが分かった。2013年度の傍腫瘍性NHALEの既往歴調査で4%に脳炎・髄膜炎があったことと合わせると、前駆期から髄膜炎を発症してNHALEの先行症状期に至り、その後NHALE発病期に至るという我々の仮説が支持される。

2013年度の先行症状期の一般臨床検査値の検討では、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、早期診断に繋がる可能性があることが分かった。発熱、頭痛といった非特異的な症状の症例で、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位には、積極的に髄液一般検査、髄液NMDA型GluR抗体測定を行い、早期診断につながる可能性がある。

一般検査で分かったリンパ球・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抗体のブースターをもたらしている可能性が強く、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。

発病期研究のまとめと今後の戦略

NMDA型GluR抗体陽性NHALE患者髄液による培養ラット胎児神経細胞への影響をin vitroでみる研究から、NHALEの髄液の中のIgG分画はシナプス外NMDA型GluR複合体の内在化を起しアポトーシスを抑制するが、シナプスNMDA型GluR複合体の内在化を起さないため、シナプス機能への影響が少ない可能性が示唆され、IgG分画は脳に対して強い傷害を起しにくいと、現段階では推測している。一方、IgG以外の髄液成分、例えばgranzyme Bなどはアポトーシスを誘導し、NHALEの中枢神経傷害をもたらしており、対策が必要である。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4）。

発病期のNMDA型GluR抗体ブースターのメカ

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。

1. NMDA型GluR抗体のシナプス外NMDA型GluRに対する作用の検討

NMDA型GluR抗体陽性NHALE患者髄液による培養ラット胎児神経細胞の10DIVでのアポトーシスへの影響の検討では、髄液全体ではアポトーシスの増加が、髄液IgG分画ではアポトーシスの抑制がみられた。このことからNHALE患者髄液IgGはシナプス外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。

2. NMDA型GluR抗体のシナプスNMDA型GluRに対する作用の検討

2012年度の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

cAMP-Responsive-Element-Binding protein (tCREB) 濃度およびリン酸化CREB (pCREB) 濃度の変化を見る研究で、NHALE髄液IgGは、培養上清のLDHを増加させず、CREBリン酸化を促進しており、シナプス結合蛋白にアンカーされたNMDA型GluR複合体の内在化を起さない可能性が示唆された（参照2）。

2013年度の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濃度の変化を見る研究で、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はなかった。NMDA型GluR抗体はシナプス外NMDA型GluR複合体の内在化を起すが、シナプスのNMDA型GluR複合体内在化が顕著でないために、Aktリン酸化に特異的な影響はないものと推測した。

CREBおよびAktの検討から、NMDA型GluR抗体はシナプス外NMDA型GluR複合体の内在化を起すが、シナプス結合蛋白にアンカーされたシナプスNMDA型GluR複合体の内在化は起さない（起こしても軽度）ことが推定され、そのために急性期の意識障害がせん妄程度と軽い

場合があるのではないかと、また、比較的早期に回復する症例があるのではないかと、推測している。

3. 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サブクラス抗体と関連すると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。

4. NMDA型GluR抗体以外の髄液成分のNHALEにおける役割

2012年度のNHALEのgranzyme Bの検討では、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（参照2）（図4）。

髄液granzyme B濃度の高い群で髄液NMDA型GluR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。このNMDA型GluR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、NMDA型GluR抗体を標的とした治療が、予後を改善している可能性がある。

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

2012年度に、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±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、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。

2. 自己抗体測定系の改良

E. 結論

前駆期に対する研究アプローチの中で、NHLEの10%程度の症例に、前駆期症状と推定できる既往歴があり、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抗体高値の前駆期が存在するものと確信してきた。今後は、NMDA型GluR抗体をマウスにpassive transferする動物モデルを確立し、前駆期病態を免疫分子学的に検討したい。

先行症状期の研究では、発熱、頭痛といった非特異的な症状が多いこと、脳炎症状出現前に

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。

3. 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。

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、一般検査ではリンパ球・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、早期診断に繋がる可能性があることが分かった。リンパ球・血小板からのNMDA型GluR放出がNMDA型GluR抗体のブースターをもたらしている可能性が強く、今後は、NMDA型GluR抗体をマウスにpassive transferする動物モデルを確立し、前駆期から先行症状期への移行のメカニズムも明らかにしたい。

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

平成25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。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

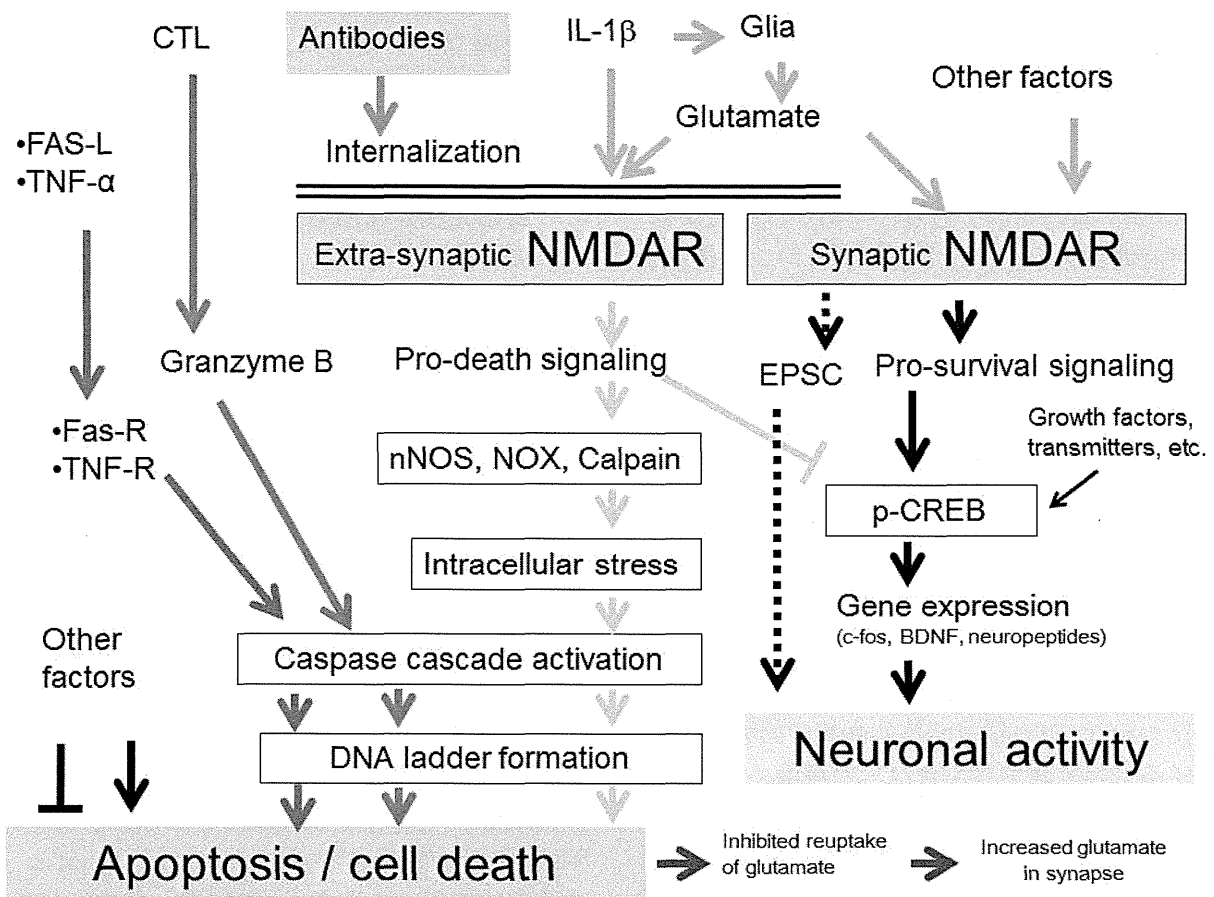


図4. NHALEの病態仮説

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（障害者対策総合研究開発事業））
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】NHALEの前駆期の可能性がある髄液GluN2B-NT2抗体高値の精神疾患患者8名の既往歴には、アルコール依存あるいは大量飲酒が3名、橋本病が1名にみられ、NHALE症例の既往歴と類似した依存症、自己免疫疾患が見られ、自己免疫素因-依存症-精神疾患-NHALE発症という経過がありうると考えた。

【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。症例数を増やして検討している。

【前駆期-患者髄液IgG分画 in vitro研究】NMDA型GluR抗体を含む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を内在化してしていると考えた。

【前駆期-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、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、挙尾反応が高率に認められ、興奮性の行動変化起こった。マイクロアレイ解析で脳の*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し、興奮性行動につながる可能性が示唆された。

【先行症状期-一般髄液検査値研究】先行症状期の髄液データがあるNHALE17例では、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した。NHALE先行症状期には、感染対照群である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。無菌性髄膜炎であっても蛋白がかなり高く糖が低い特徴があれば、NHALEへの移行に注意する。

【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】NHALEの10%程度の症例に、前駆期症状と推定できる依存症などの既往歴があり、20-40歳の女性正常対照の中に血清NMDA型GluR抗体が著しく高値の群が見つかり、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できる。先行症状期の無菌性髄膜炎では、NHALEに移行しない症例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。

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。
- 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。
- 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。
- 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., 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したい。

目的: NHALE前駆期—先行感染症期の病態解明 → 障害の防止・軽減

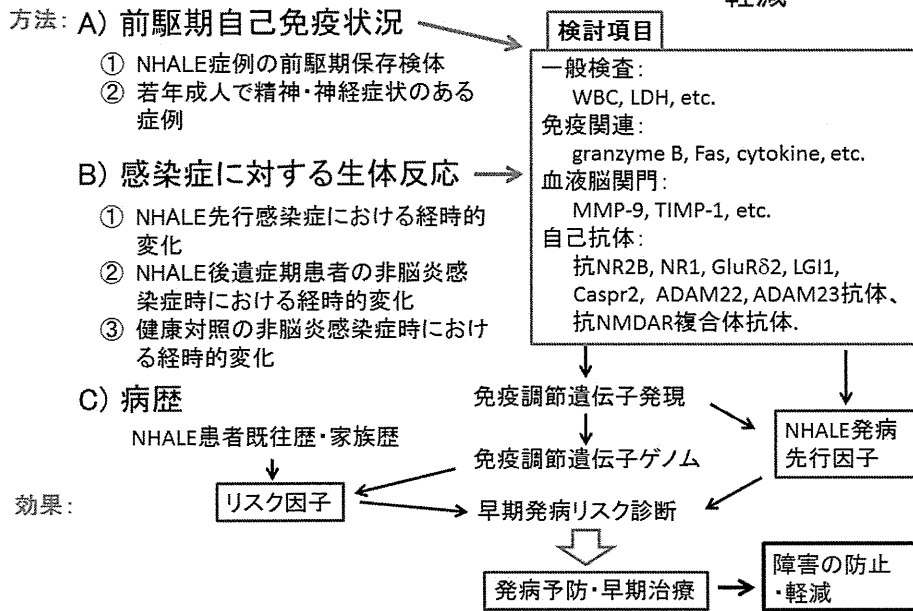


図1. 研究の目的、方法及び期待される効果 (流れ図)

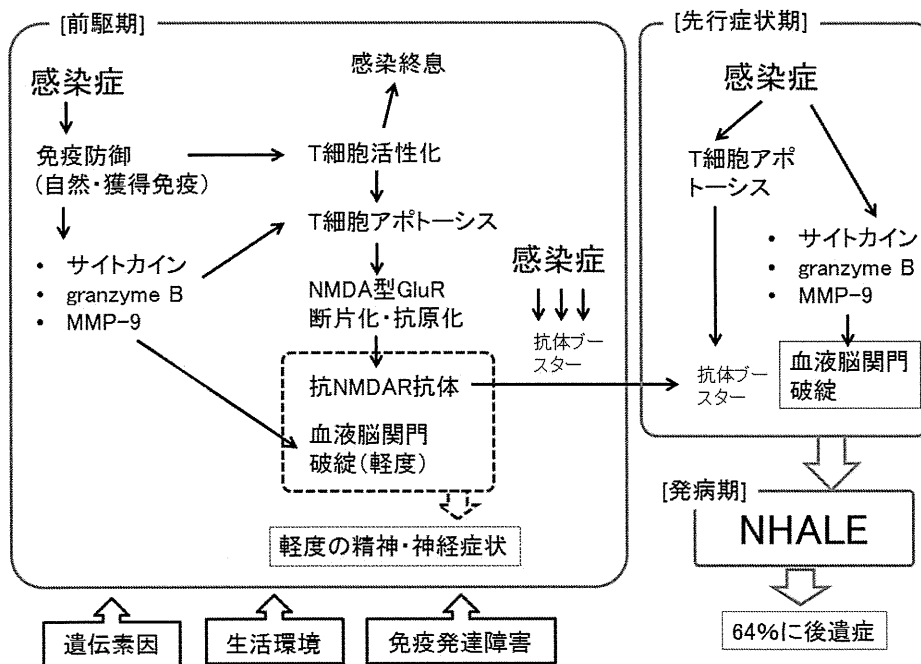


図2. 研究仮説

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、上気道炎などの中枢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評価した。NMDA型GluR抗体陽性NHALE髄液は、髄液IgG分画より強くCREBリン酸化を促進した。対照髄液もCREBリン酸化を促進したことから、正常髄液成分の中にCREBリン酸化を促進する成分が含まれると推定した。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。

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と考えた。

5. 2013年度研究結果（参照3）

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。

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。

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。

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。

6. 2014年度研究目標

先行症状期などの病態解析を行うことにした。

2014年度は表1に示す研究を計画し、前駆期、

表 1. 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年度に、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。

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4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既往歴の検討

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名の既往歴について、NHALE症例と既往歴を比較した(西田)。

4. 精神症状の検討

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. 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したが、やはり検体保存は確認できなかった。

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が、採択されなかった。今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する。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)。

6. 精神病症状を有する症例のNMDA型GluR抗体の推移

対象は、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で、複数回血清あるいは髄液中のGluN2B-NT2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-C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)。

7. 統合失調症患者の血清を用いた抗NMDAR抗体の検討

イスラエル、ヘブライ大学との共同研究で、NMDAR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)。

8. 健常者の年齢・性別NMDA型GluR抗体分布と推移

2013年度に続いて、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(179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)。

9. NMDA型GluR抗体のシナプスNMDA型GluRに対する作用の検討: Akt 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分画の神

経細胞への影響を評価した（高橋）。

10. NMDA型GluR抗体のPassive transfer-行動解析 in vivo

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）。

11. NMDA型GluR抗体のPassive transfer-マイクロアレイ解析

前述の抗体をマウス海馬に投与、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、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。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。

12. NHALE患者にみられる先行症状期の髄液一般データの検討

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）、非炎症性のもんかん等で髄液検査を行った症例中NHALE群と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）。

13. 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）。

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

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（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（*Foxp3*, *CTLA-4*, *PDCD-1*, *T-bet*）の発現検討

NHALE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）。