

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. 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)。

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)。

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
2012-12	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

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

2013年11月-2014年10月の集積数は、NHAE (123例/年)、卵巣奇形腫合併脳炎 (21例/年)、痙攣重積型脳炎 (44例/年)、その他の急性脳炎 (67例/年)、局在関連性てんかん (116例/年) など、合計760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. 既往歴の検討

髄液GluN2B-NT2抗体が疾病対照 (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。既往歴では、アルコール依存あるいは大量飲酒が3名、橋本病が1名でみられた (西田)。

4. 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名は全例部分てんかんで、主たる精神症状は、興奮、衝動行為、行動異常、幻聴だった (西田)。

5. NHAE患者の前駆期自己免疫状況の検討

2014年度に、同意書をいただいている8名の脳炎患者さんの同意書等を日本赤十字社に送付し、献血11年後に廃棄される保管検体の利用をお願いした。今後、日赤から検体をいただければ、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

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を検討していきたい (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

イスラエルの統合失調症患者の1名で、抗NMDAR抗体を検出し、この患者ではNMDAR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)。

8. 健常者の年齢・性別NMDA型GluR抗体分布と推移

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。2014年度には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)等を測定した。今後データを検討する (高橋)。

8. 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

NMDA型GluR抗体陽性NHAE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NHAE-total CSFを加えた場合 (1.06 ± 0.15 , n=16) が、7DIVのNHAE-CSF-IgGを加えた場合 (0.97 ± 0.09 , n=14) (Mann Whitney test, p=0.0312) 及び10DIVのNHAE-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)。

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

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、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。

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

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。

10. NHALE患者にみられる先行症状期の髄液一般データの検討

NHALE群の髄液細胞数(平均±SD、 320.8 ± 372.8 counts/mm³)は、疾病対照群(20.8 ± 372.8 counts/mm³)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(120.6 ± 97.4 mg/dl)は、感染対照群(40.7 ± 21.5 mg/dl)、疾病対照群(20.9 ± 8.7 mg/dl)に比べて有意に高値であった($p<0.0001$)。NHALE群の髄液糖濃度(56.9 ± 21.0 mg/dl)は、感染対照群(59.5 ± 10.3 mg/dl)、疾病対照群(61.1 ± 6.8 mg/dl)

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(7.6 ± 2.6 mg/dl)は、疾病対照群(1.8 ± 1.3 mg/dl)に比べて有意に高値であった($p<0.0001$)。NHALE群の髄液albumin濃度(51.0 ± 34.3 mg/dl)は、疾病対照群(13.5 ± 6.8 mg/dl)に比べて有意に高値であった($p<0.0001$) (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、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の安定発現細胞株が得られなかった(森)。

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

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)。

14. 健康対照の非脳炎感染症時における一般・免疫マーカーの経時的変化

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)。

15. 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)。

16. 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)。

17. 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

	201011-2011	201111-2012	201211-20131	201311-20141
	10	10	0	0
非ヘルペス性急性辺縁系脳炎	136	141	148	123
卵巣奇形腫合併脳炎	20	14	18	21
痙攣重積型脳炎	44	37	38	44
脳幹脳炎	1	6	5	2
その他の急性脳炎	72	67	69	67
CNS ループス	6	11	8	23
橋本脳症	4	13	9	20
ADEM	7	7	4	6
再発性脳炎	19	29	37	34
亜急性脳炎	49	46	54	84
傍腫瘍性脳炎	7	2	8	5
ALS	10	7	0	0
CJD	17	7	6	2
精神疾患	26	29	51	39
Rasmussen 症候群	28	24	13	25
局在関連性てんかん	100	101	153	116
West 症候群	7	6	9	4
症候性全般てんかん	11	9	11	3
小脳炎	44	31	27	38
不随意運動	7	8	3	6
HPV ワクチン関連				45
その他	63	79	53	53
合計	678	674	724	760

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症例にアルコールなどの依存症（10%）、自己免疫性疾患（4%）の既往歴があり、前駆期症状の存在が示唆された（図3）。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が、今後の解析を待ちたい。

NHALE前駆期の可能性があるGluN2B-NT2抗体陽性精神疾患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と推測しているが、前駆期の精神症状も多彩である可能性がある。

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。

NMDA型GluR抗体をマウスにpassive transferすることで、行動変化、分子生化学的变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。

1. NHALE患者にみられる既往歴の検討

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、4%に自己免疫性疾患の既往がみられることが分かっている

（2012年度研究）。髄液GluN2B-NT2抗体高値を示した精神疾患患者では、アルコール依存あるいは大量飲酒が3名、橋本病が1名で既往歴としてみられ（2014年度研究）、NHALE患者とGluN2B-NT2抗体陽性精神疾患患者の既往歴に共通点がある。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。

2. 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あった。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であるものと推測している。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。

3. 統合失調症とNMDA型GluR

NHALE前駆期の可能性の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、NMDAR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、同様の抗NMDAR抗体が関与する症例でのD-セリンの効果をさらに検証する必要がある。この患者の抗体の作用機構を明らかにすることで、脳炎と統合失調症で観察される精神症状発症機構の理解、治療につながる可能性がある。

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歳の女性で症例数を増やし、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抗体のNMDA型GluRに対する作用の検討：in vitro

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、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年度、

cAMP-Responsive-Element-Binding proteinのリン酸化CREBを評価した。NHAE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。

2013-4年度にはNHAE患者髄液中のIgG分画に含まれるNMDA型GluR抗体が、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。

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症例があるのではないかと推測している。

6. NMDA型GluR抗体の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(図4)。

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*、*fa m53b*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。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。

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、NHAE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3)。

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、NHAE207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

(図3)。2013年度の傍腫瘍性NHAE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NHAEの先行症状期に至り、その後NHAE発病期に至るといふ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。

2014年度、非傍腫瘍性NHAE217例の中で先行症状期の髄液データがある17例について検討すると、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、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場合にはNHAEへの進展に注意することができる。

NHAE先行症状期に無菌性髄膜炎がある場合、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。CNSでリンパ球が細胞死を起こし、NMDA型GluR抗体産生にブースターがかかることで髄液IgG濃度が増加しているものと推測している。2013年度研究で末梢血のリンパ球や血小板が先行症状期に減少することも分かっており、末梢においてもNMDA型GluRの破砕-抗原提示が起こり、NMDA型GluR抗体産生にブースターがかかるものと思われる。NHAEの発病予防

のためには、末梢およびCNSでリンパ球の細胞死を導く要因を検討する必要がある。抗原供給の観点から発病予防につながる治療がある。

NHALE群の髄液albumin濃度が高いのは、血液脳関門の破綻によるものと推測している。2013年度研究で、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。NHALE発病予防には血液脳関門の保護も重要である。

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NHALE急性期にはあり、NMDA型GluR抗体のみならず、複数の病態因子が先行症状期から発病期には関与すると思われる。病態をさらに検討し、脳炎の予後を改善したい。

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、髄液中のIgG分画以外の成分（granzyme Bなど）がアポトーシスを起こしていることが分かってきている（参照1、2）。GluN2B-NT2抗体のPassive transfer研究においても、抗体のみでは急性脳炎の症状は再現できていない。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5）。

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。

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非傍腫瘍性NHALE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る予定である。

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±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、GluN2B-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

NMDA型GluR抗体、デルタ型GluR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る。

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。

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。

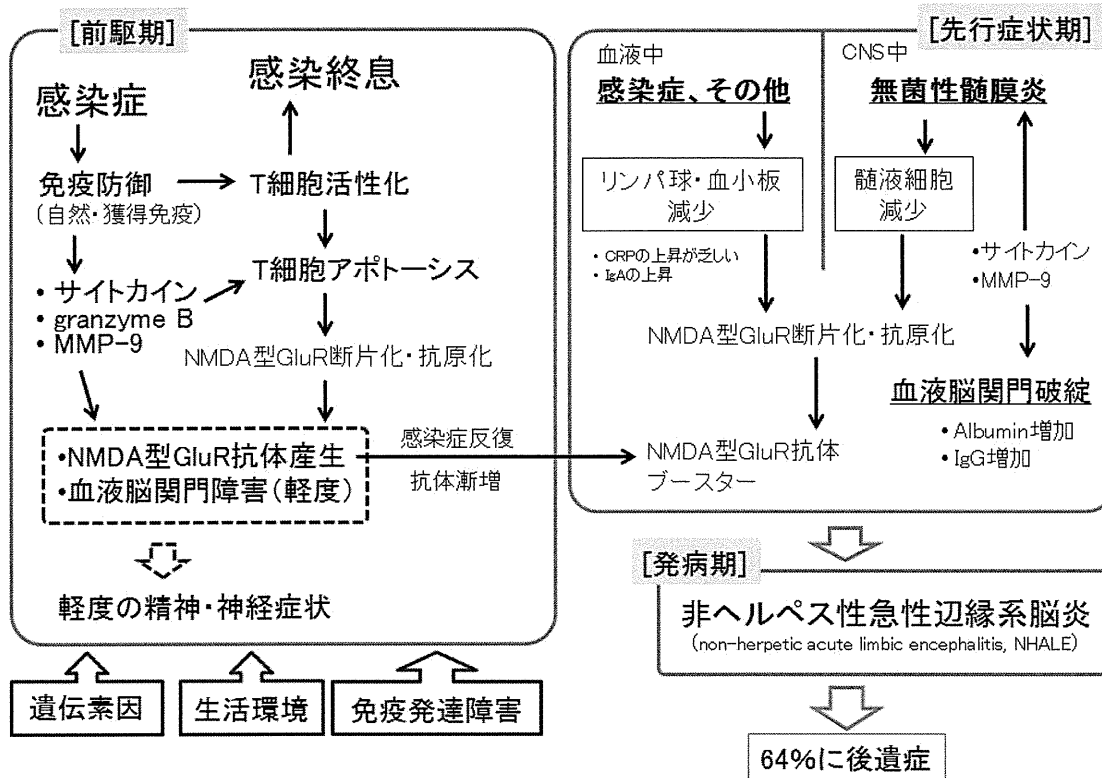


図3. NHALEの前駆期、先行症状期、発病期病態仮説

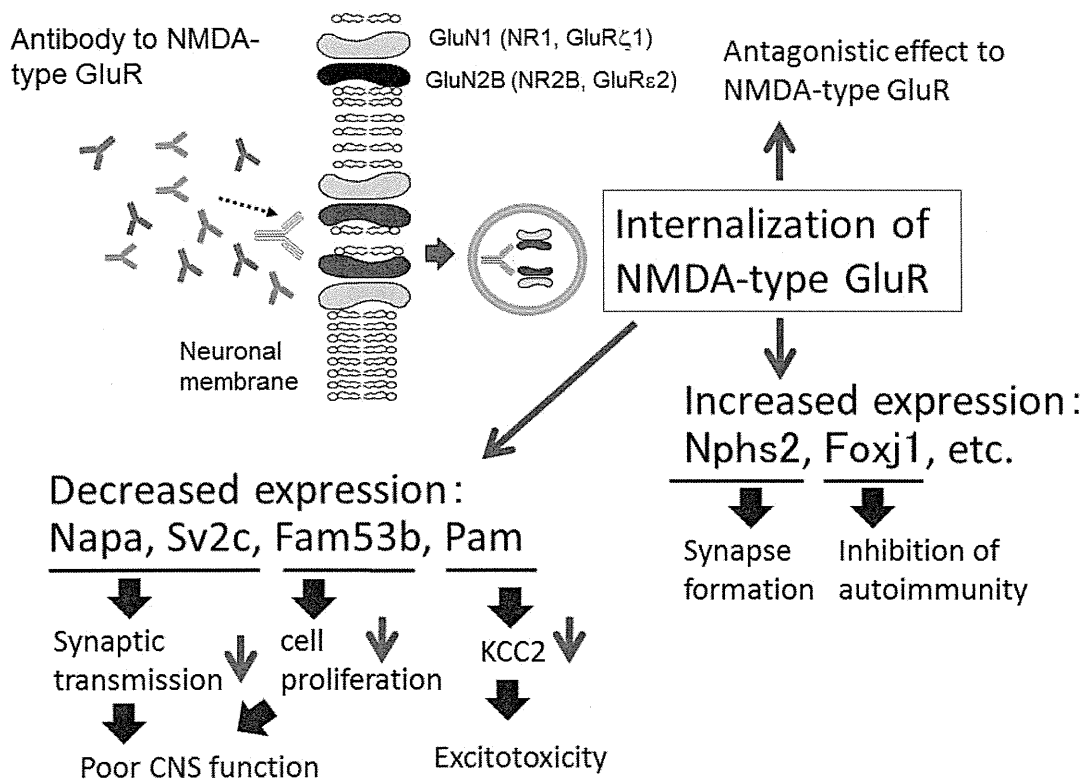


図4. NMDA型GluR抗体の病態機能仮説

E. 結論

前駆期に対する研究アプローチの中で、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する動物モデルにおいても、マウスに興奮性の行動変化が観察され、NMDA型GluR抗体高値の前駆期がNHALE発病前に存在するものと確信してきた。動物モデルと発病前献血保存血清を有機的に結びつけた前駆期病態研究を推進したい。

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、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、早期診断に繋がる可能性

があることが分かった。髄液検査でも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。リンパ球に発現する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、NHALE発症につながる可能性が推定される。NHALE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要因を検討する必要がある。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NHALE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

- 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

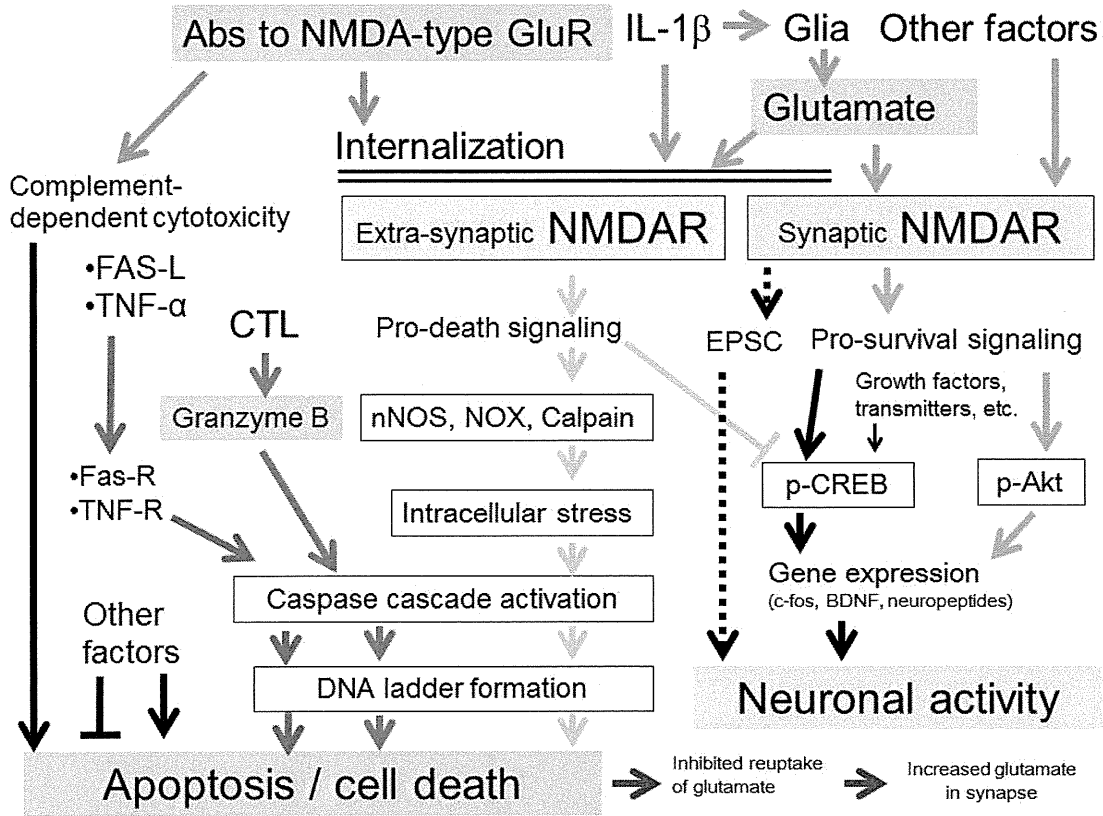


図5. NHALEにおける抗体、サイトカイン、granzyme Bなどの役割

抗NMDAR複合体抗体の測定とGluR基礎研究

研究分担者 森 寿¹

富山大学大学院医学薬学研究部分子神経科学講座 教授

研究要旨

変異型NMDA受容体安定発現細胞を用いて、急性脳炎・脳症患者および統合失調症患者血清中に存在する抗NMDA受容体自己抗体の定量解析を実施した。更に、より簡便で定量的な自己抗体スクリーニング系の開発を目指し、浮遊性培養細胞での変異型NMDA受容体、デルタ型グルタミン酸受容体の発現を試みた。

研究協力者：宮 一志²、田村 賢太郎³、（1 富山大学大学院医学薬学研究部分子神経科学講座、2 富山大学大学院医学薬学研究部小児科学講座・助教、3 富山大学大学院医学薬学研究部小児科学講座・医員）

A. 研究目的

急性辺縁系脳炎の病態に関わると考えられる抗NMDA受容体（NMDAR）自己抗体を、既に確立した接着性培養細胞アッセイ系を用いて定量解析する。また、病態機構解明のために、NMDARならびにデルタ型グルタミン酸受容体（GluR）発現浮遊性培養細胞株を樹立し、Flow Cytometryによる評価が可能なスクリーニング系を確立して、より定量性が高く簡便な自己抗体測定系を構築することを目的に研究を行った。

B. 研究方法

既に報告した、変異型NMDAR（GluR ϵ 2N/R-DsRed と GluR ζ 1N/R-EGFP）を安定的に発現するHEK293細胞株を用いた免疫細胞化学法ならびにOn-cell Western法にて、本邦の症例、大分大学と共同したアジア地域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、さらに、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。また、浮遊性293F細胞にNMDARならびにデルタ型GluRの遺伝子発現ベクターを導入して、Cell Sorting法を用いて細胞株樹立を試みた。

（倫理面への配慮）

本研究には遺伝子組換え実験が含まれるので、本学の組換えDNA実験安全委員会に研究申請を行い、第二種使用等拡散防止措置の確認を受けて構築した発現ベクターを用いて研究を実施した。

また、使用した患者血清は、本学倫理委員会ならびに、国立静岡てんかん・神経医療センター等における倫理委員会で承認を受けたものを使用した。

C. 研究結果

培養細胞株を用いた自己抗体測定系で、本邦のいくつかの症例で抗NMDAR自己抗体を検出した。また、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。一方、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。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では、約50%の細胞でデルタ型GluRを発現する安定発現細胞株を

得た。一方、NMDARの安定発現細胞株は得られなかった。

D. 考察

アジア地域での原因不明脳炎では、抗NMDAR自己抗体がほとんど検出されなかったことから、解析前に患者の臨床情報を十分に吟味する必要が示唆された。一方、統合失調症の一部には抗NMDAR抗体が関与する可能性が示された。この症例では、NMDARの機能を向上させるD-セリンの投与が症状の軽減に有効であったことから、さらに症例を増やしてD-セリンの効果を検証する必要がある。また、この患者の抗体の作用を明らかにすることで、脳炎と統合失調症で観察される精神症状の病態機構の理解につながる可能性がある。また、デルタ型GluRの安定発現細胞株を用いて自己抗体を計測し、抗体の作用機構をあきらかにすることで、小脳が関わる運動障害の病態過程の診断と発症機構の解明に資すると考えられる。一方、NMDARについては、浮遊性293F細胞株を用いた安定発現株が得られなかったことから、この細胞株では、NMDARの発現による細胞生存率の低下か、Cell sorting 後の細胞増殖の低下の可能性が示唆され、今後更なる検討が必要と考えられる。

E. 結論

培養細胞による自己抗体定量測定系は、非ヘルペス性急性辺縁系脳炎、統合失調症、小脳性の運動障害の病態診断、病態の発症機構解明に資する。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tamura, K., Ikutani, M., Yoshida, T., Tanaka-Hayashi, A., Yanagibashi, T., Inoue, R., Nagai, Y., Adachi, Y., Miyawaki, T., Takatsu, K., Mori, H. Increased production of intestinal immunoglobulins in *Syntenin-1*-deficient mice. **Immunobiology** in press.
2. Heresco-Levy, U., Durrant, A. R., Ermilov, M., Javitt, D. C., Miya, K., Mori, H.

Clinical and electrophysiological effects of D-serine in a schizophrenic patient positive for anti N-methyl-D-aspartate receptor antibodies. **Biological Psychiatry** 77:e27-e29, 2015.

3. Yamamoto, S., Niida, S., Azuma, E., Yanagibashi, T., Muramatsu, M., Huang, T-T., Sagara, H., Higaki, S., Ikutani, M., Nagai, Y., Takatsu, K., Miyazaki, K., Hamashima, T., Mori, H., Matsuda, N., Ishii, Y., Sasahara, M. Inflammation-induced endothelial cell-derived extracellular vesicles modulate the cellular status of pericytes. **Sci. Rep.**, 5:8505, 2015.
4. Tanaka-Hayashi, A., Hayashi, S., Inoue, R., Ito, T., Konno, K., Yoshida, T., Watanabe, M., Yoshimura, T., Mori, H. Is D-aspartate produced by glutamic-oxaloacetic transaminase-1 like 1 (Got111), a putative aspartate racemase? **Amino Acids** 47: 79-86, 2015.
5. Kambara, K., Ohashi, W., Tomita, K., Takashina, M., Fujisaka, S., Hayashi, R., Mori, H., Tobe, K., Hattori, Y. *In vivo* depletion of CD206⁺ M2 macrophages exaggerates lung injury in endotoxemic mice. **Am. J. Pathol.** 185: 162-171, 2015.
6. Dikopoltsev, E., Foltyn, V. N., Zehl, M., Jensen, O. N., Mori, H., Radzishevsky, I., Wolosker, H. FBXO22 is required for optimal synthesis of the NMDA receptor co-agonist D-serine. **J. Biol. Chem.** 289: 33904-33915, 2014.
7. Mano, H., Ishimoto, T., Okada, T., Toyooka, N., Mori, H. Discovery of novel adenylyl cyclase inhibitor by cell-based screening. **Biol. Pharm. Bull.** 37:1689-1693, 2014.
8. Tabata-Imai, A., Inoue, R., Mori, H. Increased sensitivity to inflammatory pain induced by subcutaneous formalin injection in serine racemase knock-out mice. **PLOS ONE** 9:e105282, 2014.
9. Mori, H., Wada, R., Li, J., Ishimoto, T., Mizuguchi, M., Obita, T., Gouda, H., Hirono, S., Toyooka, N. In silico and pharmacological screenings identify novel serine racemase inhibitors. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 24:3732-5, 2014.
10. Tabata, T., Yamaguchi, Y., Hata, Y., Ichida, F., Mori, H. Modification of KCNH2-Encoded Cardiac Potassium Channels by KCNE1 Polymorphism - Reply - **Circ. J.** 78: 2331, 2014.
11. Kinoshita, K., Komatsu, T., Nishide, K., Hata, Y., Hisajima, N., Takahashi, H., Kimoto, K., Aonuma, K., Tsushima, E., Tabata, T., Yoshida, T., Mori, H., Nishida, K., Yamaguchi, Y., Ichida, F., Fukurotani, K., Inoue, H., Nishida, N. A590T mutation in KCNQ1 C-terminal helix D decreases I_{Ks} channel trafficking and function but not Yotiao interaction. **J. Mol. Cell. Cardiol.** 72: 273-280, 2014.

12. Hata Y., Mori H., Tanaka A., Fujita Y., Shimomura T., Tabata T., Kinoshita K., Yamaguchi Y., Ichida F., Kominato Y., Ikeda N., Nishida, N. Identification and characterization of a novel genetic mutation with prolonged QT syndrome in an unexplained postoperative death. **Int. J. Legal Med.** 128: 105-115, 2014.
 13. Inoue, R., Yoshihisa, Y., Tojo, Y., Okamura, C., Yoshida, Y., Kishimoto, J., Luan, X., Watanabe, M., Mizuguchi, M., Nabeshima, Y., Hamase, K., Matsunaga, K., Shimizu, T., Mori, H. Localization of serine racemase and its role in the skin. **J. Invest. Dermatol.** 134: 1618-1626, 2014.
 14. Yamaguchi, Y., Nishide, K., Kato, M., Hata, Y., Mizumaki, K., Kinoshita, K., Nonobe, Y., Tabata, T., Sakamoto, T., Kataoka, N., Nakatani, Y., Ichida, F., Mori, H., Fukurotani, K., Inoue, H., Nishida, N. Glycine/serine polymorphism at position 38 influences KCNE1 subunit's modulatory actions on rapid and slow delayed rectifier K⁺ currents. **Circ. J.** 78: 610-618, 2014.
 15. Miya, K., Takahashi, Y., Mori, H. Anti-NMDAR autoimmune encephalitis. (Review) **Brain Dev-JPN.** 36: 645-652, 2014.
 16. Mori, D., Ranawaka, U., Yamada, K., Rajindrajith, S., Miya, K., Kumara, H., Perera, K., Matsumoto, T., Dassanayake, M., Mitui, M. T., Mori, H., Nishizono, A., Söderlund-Venermo, M., Ahmed, K. Human Bocavirus in Patients with Encephalitis, Sri Lanka, 2009–2010. **Emerg. Infect. Dis.** 19: 1859-1862, 2013.
 17. Horio, M. Mori, H., Hashimoto, K. Is D-Cycloserine a Prodrug for D-Serine in the Brain? **Biol. Psychiatry.** 73:e33-e34, 2013.
 18. Horio M, Ishima T, Fujita Y, Inoue R, Mori H., Hashimoto K. Decreased levels of free D-aspartic acid in the forebrain of serine racemase (Srr) knock-out mice. **Neurochem. Int.** 62: 843-847, 2013.
 19. Rosenberg D, Artoul S, Segal AC, Kolodney G, Radzishhevsky I, Dikopolitsev E, Foltyn VN, Inoue R, Mori H., Billard JM, Wolosker H. Neuronal D-serine and glycine release via the Asc-1 transporter regulates NMDA receptor-dependent synaptic activity. **J Neurosci.** 33:3533-44, 2013.
 20. LeMaistre, J. L., Lu, L., Anderson, H.D.I., Mori, H., Anderson, C.M. Astrocyte-induced cortical vasodilation is mediated by D-serine and endothelial nitric oxide synthase. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 110:3149-3154, 2013.
 21. Kinoshita, K., Yamaguchi, Y., Nishide, K., Kimoto, K., Nonobe, Y., Fujita, A., Asano, K., Tabata, T., Mori, H., Inoue, H., Hata, Y., Fukurotani, K. and Nishida, N. A novel missense mutation causing-a-go-go-related gene channel. **J. Cardiovasc. Electrophysiol.** 23: 1246-1253, 2012.
 22. Wolosker, H. and Mori, H. Serine racemase: an unconventional enzyme for an unconventional transmitter. **Amino Acids** 43:1895-1904, 2012 (Review).
 23. Harai, T., Inoue, R., Fujita, Y., Tanaka, A., Horio, M., Hashimoto, K., Hongou, K., Miyawaki, T., Mori, H. Decreased susceptibility to seizures induced by pentylentetrazole in serine racemase knockout mice. **Epilepsy Research** 102:180-187, 2012.
 24. Ishimoto, T., Mano, H., Ozawa, T., Mori H. Measuring CREB activation using bioluminescence probes that detect KID-KIX interaction in living cells. **Bioconjugate Chem.** 22:1136-44, 2012.
 25. Horio, M., Kohno, M., Fujita, Y., Ishima, T., Inoue, R., Mori, H., Hashimoto, K., Role of Serine Racemase in Behavioral Sensitization in Mice after Repeated Administration of Methamphetamine. **PLoS ONE** 7:e35494, 2012.
2. 学会発表
 1. 森寿. セリンラセマーゼと D-セリンの生体機能; 第 87 回日本薬理学会年会; 2014 Mar.19; 仙台.
 2. 和田亮吾, 李杰, 合田浩明, 広野修一, 水口峰之, 豊岡尚樹, 森寿. セリンラセマーゼ新規阻害剤の開発; 第 87 回日本薬理学会年会; 2014 Mar.19; 仙台.
 3. 草開祥平, 渡辺祐紀, 種市尋宙, 田中朋美, 田仲千秋, 宮一志, 森寿, 足立雄一. ステロイドパルス療法の反復が有効であった抗 NMDA 受容体抗体陽性辺縁系脳炎の 11 歳男児例; 第 56 回小児神経学会学術集会; 2014 May 29; 浜松.
 4. H Mori, A Tabata-Imai, R Inoue. Increased sensitivity to inflammatory pain induced by subcutaneous formalin injection in serine racemase KO mice; IDAR2014; 2014 Sep 4; 宇都宮.
 5. 石本哲也, 眞野寛生, 森寿. スプリットルシフェラーゼを用いたマウス脳内 CREB のリン酸化イメージング; 第 37 回日本神経科学大会; 2014 Sep 11; 横浜.
 6. 井上蘭, 田中-林亜由美, 森寿. ストレスによる恐怖記憶制御における扁桃体外側核グルコルチコイド受容体の役割; 第 37 回日本神経科学大会; 2014 Sep 11; 横浜.
 7. 笹原正清, Chung Thanh Dang, 石井陽子, 濱島丈, 山本誠士, 大川宣昭, 斎藤喜人, 濱ノ口馨, 森寿.PDGFR- α の不活化は OPC の分化、および間葉系幹細胞の動員と OPC への分化を誘導する; 第 37 回日本神経科学大会; 2014 Sep 11; 横浜.
 8. 塩田倫史, 笹原正清, 森寿, 福永浩司. 細胞内におけるドパミン D2L 受容体の新しい活性化機構; 第 37 回日本神経科学大会; 2014 Sep 11; 横浜.
 9. 福地守, 前畑陽祐, 和泉宏謙, 田中亜由

- 美, 井上蘭, 森寿, 田淵明子, 津田正明. PACAP による BDNF 遺伝子発現誘導-生物発光イメージングを利用した解析; 2014 Sep 12; 横浜.
10. 田中-林亜由美, 井上蘭, 吉田知之, 林修平, 伊藤智和, 吉村徹, 森寿. Got111 ノックアウトマウスの解析; 第 87 回日本生化学会; 2014 Oct 18; 京都.
 11. T Ishimoto, H Mano, H Mori. In vivo imaging of CREB phosphorylation using a novel transgenic mouse line expressing bioluminescence probes; Society For Neuroscience; 2014 Nov 15; Washington DC.
 12. 吉田知之, 城島知子, 山崎真弥, 阿部学, 山形敦史, 深井周也, 森寿, 崎村建司, 岩倉洋一郎, 三品昌美. インターロイキン-1 受容体ファミリータンパク質による中枢シナプス形成の調節; 第 37 回日本分子生物学会年会 ワークショップ; 2014 Nov 26; 横浜.
 13. Mori D, Ranawaka U, Yamada K, Rajindrajith S, Miya K, Matsumoto T, Mitui MT, Mori H, Nishizono A, Söderlund-Venermo M, Ahmed K. Bocavirus encephalitis in Sri Lankan children and adults: The 28th International Congress of Chemotherapy and Infection; 2013 Jun 5-8, Yokohama
 14. 宮一志, 田中朋美, 宮脇利男, 高橋幸利, 森寿. 培養細胞を用いた NMDA 型グルタミン酸受容体に対する自己抗体測定の検討; 第 55 回日本小児神経学会学術集会; 2013 May 31; 大分.
 15. 田端彩子, 森寿, 井上蘭. セリンラセマーゼノックアウトマウスでの炎症性疼痛感受性の上昇; Neuro2013; 2013 Jun 21; 京都
 16. 堀尾菜央, 石間環, 藤田有子, 井上蘭, 森寿, 橋本謙二. セリンラセマーゼ遺伝子欠損マウス脳における D-アスパラギン酸濃度の低下; 第 9 回 D-アミノ酸研究会学術講演会; 2013 Sep 5; 大阪.
 17. 井上蘭, 吉久陽子, 東條洋介, 岡村智恵子, 吉田雄三, 岸本治朗, Luan Xinghua, 渡辺雅彦, 水口峰之, 鍋島裕子, 浜瀬健司, 松永憲治, 清水忠道, 森寿. 皮膚におけるセリンラセマーゼの発現および機能解析; 第 9 回 D-アミノ酸研究会学術講演会; 2013 Sep 5; 大阪.
 18. 宮一志, 原井朋美, 宮脇利男, 森寿「発熱を契機に行動異常が増悪し、抗 NMDA 受容体抗体が陽性であった広汎性発達障がいの一例」第 54 回 日本小児神経学会 2012 年 5 月 17-19 日、札幌
3. 書籍の刊行
 1. 井上蘭, 森寿. Clinical Neuroscience. Vol.31; 中外医学社; 2013. 海馬における D-セリンの役割: p1409-10.
 2. Mori, H. and Izumi, H. Bioluminescence imaging of Arc expression detects activity-dependent and plastic changes in the visual cortex of adult mice. J. M. Harris et al., Ed. "Visual Cortex: Anatomy, Function and Injuries" pp165-184. 2012 Nova Science Publishers, Inc.
 - 1.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得、出願
 - 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

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））
（総合）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

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

研究分担者 西田 拓司

独立行政法人国立病院機構 静岡てんかん・神経医療センター精神科医長

研究要旨

【非ヘルペス性急性辺縁系脳炎患者の既往症の検討】

非ヘルペス性急性辺縁系脳炎（以下NHALE）患者には、脳炎発病以前より精神障害の既往がみられることがある。抗グルタミン酸受容体抗体が脳炎発病以前からNHALE患者の中枢神経系機能に何らかの影響を及ぼしている可能性を示唆する所見を得るために、NHALE患者324名（傍腫瘍性辺縁系脳炎患者107名、非傍腫瘍性辺縁系脳炎患者217名）の既往歴について後方視的に資料を検討した。傍腫瘍性辺縁系脳炎患者107名では、産婦人科関連既往症が9名（8%）、精神障害関連が5名（5%）（うち、気分障害3名、不安障害1名、摂食障害1名）、脳炎・髄膜炎が4名（4%）、てんかんが3名（3%）でみられた。非傍腫瘍性辺縁系脳炎患者217名では、精神障害関連既往症が21名（10%）（うち、気分障害8名、アルコールあるいは薬物依存症8名、発達障害5名）、自己免疫性疾患関連が9名（4%）、婦人科関連が8名（4%）でみられた。NHALE患者に精神・神経障害の既往が多くみられることから、抗グルタミン酸受容体抗体がNHALE発病以前から既に精神症状の発現に対して何らかの影響を及ぼしている可能性があると考えられる。

【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特徴の検討】

統合失調症、てんかん精神病などの精神疾患患者の一部で抗グルタミン酸受容体抗体が陽性を示すことが報告されている。抗グルタミン酸受容体抗体が精神神経患者の精神症状発現に何らかの影響を及ぼしている可能性を示唆する所見を得るために、抗グルタミン酸受容体抗体陽性の精神疾患患者8名および精神症状を伴う脳炎後てんかん患者4名の臨床的特徴について後方視的に資料を検討した。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。既往歴はアルコール依存症あるいは大量飲酒が3名、橋本病が1名でみられた。精神症状を伴う脳炎後てんかん患者4名は全例部分てんかんで、主たる精神症状は興奮、衝動行為、行動異常、幻聴だった。抗グルタミン酸受容体抗体陽性の精神疾患患者および精神症状を伴う脳炎後てんかん患者とNHALE患者の臨床的特徴との類似点が見出されたことから、抗グルタミン酸受容体抗体がこれらの患者の精神症状発現に何らかの影響を及ぼしている可能性があると考えられる。

【てんかん精神病患者の抗グルタミン酸受容体抗体の関連の検討】

てんかんには幻覚、妄想などの精神病症状、うつ症状、不安症状などさまざまな精神症状が出現するが、その発現機序は不明である。てんかんでみられる精神症状にグルタミン酸受容体自己免疫学的機序が関与する可能性を示唆する所見を得るために、てんかん精神病患者で抗グルタミン酸受容体抗体の陽性率および経時的変化を検討した。てんかん精神病患者23名のうち血清中あるいは髄液中の抗グルタミン酸受容体抗体の抗体価が高値を示したのは3名（13%）だった。これら

の3名は発病から検査時までの期間が平均7か月（6か月～9か月）と比較的短かった。複数回血清あるいは髄液中の抗グルタミン酸受容体抗体を測定した3名のうち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。てんかん精神病患者の一部で抗グルタミン酸抗体の抗体価が高値を示すことがあることから、てんかん精神病の病態にグルタミン酸受容体自己免疫学的が関与している可能性が考えられた。てんかん精神病の精神症状と抗グルタミン酸受容体抗体の継時的関連は更なる検討を要する。

A. 研究目的

【非ヘルペス性急性辺縁系脳炎患者の既往症の検討】

非ヘルペス性急性辺縁系脳炎（以下NHAE）は、発病時にうつ、幻覚、妄想、滅裂な言動、行動異常などの精神症状が出現することが多く、これらの精神症状の発現機序に抗グルタミン酸受容体抗体が関与していることが考えられている。またNHAE患者には、脳炎発病以前より何らかの精神障害の既往がみられることがある。このことは、NHAE発病前から既に、抗グルタミン酸受容体抗体がグルタミン酸系機能に影響を及ぼし、その結果精神症状を示している可能性を示唆する。そこで、抗グルタミン酸受容体抗体が脳炎発病以前からNHAE患者の中枢神経系機能に何らかの影響を及ぼしている可能性を示唆する所見を得るためにNHAE患者の既往歴を調査した。

【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特徴の検討】

統合失調症、てんかん精神病などの精神疾患患者の一部で抗グルタミン酸受容体抗体が陽性を示すことが報告されている。これまで、NHAE患者と抗グルタミン酸受容体抗体陽性を示す精神疾患患者の臨床特徴の違いは明らかにされていない。そこで、抗グルタミン酸受容体抗体がこれらの患者の精神症状発現に何らかの影響を及ぼしている可能性を示唆する所見を得るために、抗グルタミン酸受容体抗体陽性の精神疾患患者およ

び精神症状を伴う脳炎後てんかん患者の臨床的特徴を検討した。

【てんかん精神病と抗グルタミン酸受容体抗体の関連の検討】

てんかんには幻覚、妄想などの精神病症状、うつ症状、不安症状などさまざまな精神症状が出現するが、その発現機序は不明である。そこで、てんかんでみられる精神症状にグルタミン酸受容体自己免疫学的機序が関与する可能性を示唆する所見を得るために、てんかん精神病患者で抗グルタミン酸受容体抗体の陽性率および経時的変化を検討した。

B. 研究方法

【非ヘルペス性急性辺縁系脳炎患者の既往症の検討】

NHAE患者324名（傍腫瘍性辺縁系脳炎患者107名、非傍腫瘍性辺縁系脳炎患者217名）の既往歴について後方視的に資料を検討した。

【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特徴の検討】

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名の既往歴と精神症状について後方視的に資料を検討した。

【てんかん精神病と抗グルタミン酸受容体抗体の関連の検討】

Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders (SCID-I) にて、調査時の精神病症状あるいは過去の精神病症状の既往が確認できたてんかん患者23名の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E

LISAにより測定した(高橋, 2013)。複数回血清あるいは髄液中の抗グルタミン酸受容体抗体を測定できたのは8名だった。患者の抗体価が対照(てんかん、あるいは不随意運動をもつ患者)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。

(倫理面への配慮)

本研究は、文書にて同意を得た患者、あるいは既に文書にて同意を得ている患者にて行った。院内の倫理申請で承認を得ている。

C. 研究結果

【非ヘルペス性急性辺縁系脳炎患者の既往症の検討】

傍腫瘍性辺縁系脳炎患者107名のうち、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。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。非傍腫瘍性辺縁系脳炎患者217名のうち、精神障害関連既往症が21名(10%)で、自己免疫性疾患関連が9名(4%)で、婦人科関連が8名(4%)でみられた。精神障害関連既往症の内訳は、気分障害8名、アルコールあるいは薬物依存症8名、発達障害5名だった。

【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特徴の検討】

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。既往歴は、アルコール依存症あるいは大量飲酒が3名、橋本病が1名でみられた。精神症状を伴う脳炎後てんかん患者4名は全例部分てんかんで、主たる精神症状は、興奮、衝動行為、行動異常、幻聴だった。

【てんかん精神病と抗グルタミン酸受容体抗体の関連の検討】

対象患者23名のうち血清中あるいは髄液中、抗グルタミン酸受容体抗体の抗体価が高値を示したのは3名(13%) (高抗体価群)だ

った。高抗体価群3名と残りの20名(正常抗体価群)の臨床特徴を比較すると、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か月~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。高抗体価群の女性1名では骨盤MRIを施行したが卵巣病変はみられなかった。複数回血清あるいは髄液中の抗グルタミン酸受容体抗体を測定した8名のうち、抗体価が高値を示したのは3名だった。3名のうち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。

D. 考察

【非ヘルペス性急性辺縁系脳炎患者の既往症の検討】

NHALEは、発病時にうつ、幻覚、妄想、滅裂な言動、行動異常などの精神症状が出現することが多く、うつ病や統合失調症などの内因性精神疾患と鑑別が困難なことがある。一方、Dalmauらの提唱する抗NMDA型グルタミン酸受容体自己抗体陽性脳炎でも、100例中77例で不安、焦燥、奇異な行動、妄想、幻視、幻聴などの精神症状を呈した。また、3週間の経過のうちに88例が意識障害を呈し、緊張病様状態に進展した。NHALEと抗NMDA型グルタミン酸受容体自己抗体陽性脳炎は共通の病態基盤がある可能性が考えられている。NMDA型グルタミン酸受容体に対して阻害作用をもつケタミン、フェンサイクリジンなどは統合失調症の陽性症状、陰性症状、認知機能障害と類似した症状を惹起することが知られておりグルタミン酸系機能と精神症状の関連が示唆されている。NHALEでは、末梢で生産されたNMDA型グルタミン酸受容体に対する抗体が血液脳関門障害により中枢神経系へ移行するものと考えられている。中枢神経系へ移行した抗体は、NMDA型グルタミン酸受容体をシナプス表面から細胞内に内在化

し、その結果グルタミン酸系機能の低下をもたらすことで、辺縁系症状としての種々の精神症状が顕在化することが想定されている。

本研究の結果では、脳炎発病以前に、傍腫瘍性辺縁系脳炎患者107名のうち12名（11%）で精神・神経障害の既往、非傍腫瘍性辺縁系脳炎患者217名のうち21名（10%）で精神障害の既往がみられた。特に、うつなどの気分障害、アルコールや覚醒剤に対する依存症が多くみられた。気分障害および依存症はいずれも辺縁系の機能障害との関連が示唆されている。NHLE発病以前からみられるこれらの精神障害の既往から、抗グルタミン酸受容体抗体が脳炎発病以前から既にNHLE患者の中枢神経系に何らかの影響を及ぼしている可能性があると考えられる。傍腫瘍性辺縁系脳炎患者では精神障害関連は5%と非傍腫瘍性辺縁系脳炎患者の10%と比べると少なかったが、非傍腫瘍性辺縁系脳炎患者ではみられなかった脳炎・髄膜炎、およびてんかんの既往がそれぞれ4名（4%）と3名（3%）でみられた。これは、傍腫瘍性辺縁系脳炎患者では非傍腫瘍性辺縁系脳炎患者より重度の神経障害の既往を生じやすい免疫学的機序の存在が示唆される。

いずれにしてもNHLE発病以前からみられるこれらの精神・神経障害の既往に、抗グルタミン酸受容体抗体が何らかの影響を及ぼしている可能性があると考えられる。

【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特徴の検討】

抗グルタミン酸受容体抗体陽性の精神疾患患者および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あった。抗グルタミン酸受容体抗体陽性の精神疾患患者でアルコール関連の既往、自己免疫疾患の既往がみられた。すでに述べたように、傍腫瘍性辺縁系脳炎患者107名のうち12名（11%）で精神・神経障害の既往がみられ、非傍腫瘍性辺縁系脳炎患者217名のうち21名（10%）で精神障害の既往がみられた。特にアルコールを含めた依存症が8名でみられた。抗グルタミン

酸受容体抗体陽性の精神疾患患者とNHLE患者の間の臨床特徴に共通点がみられ、何らかの共通する機序がある可能性が考えられる。

【てんかん精神病と抗グルタミン酸受容体抗体の関連の検討】

これまでの報告では、若年女性の原因不明の初発てんかんにおいて、19名中5名でNMDA型グルタミン酸受容体に対する自己抗体がみられ、うち4名は精神症状を呈した（Niehusmann P, 2009）。一方、統合失調症、統合失調感情障害患者51名中4名でNMDA型グルタミン酸受容体に対する自己抗体がみられたが、うち2名はてんかん発作を呈した（Tsuetsuki K, 2012）。

本研究の結果では、てんかん精神病患者23名中3名（13%）で、血清中あるいは髄液中の抗グルタミン酸受容体抗体（GluN2B-NT2抗体、GluN2B-CT抗体、GluN1-NT抗体、GluD2-NT抗体）のいずれかが、対照血清あるいは髄液抗体価の平均+2SD以上の高値を示した。抗体価の高かった患者は発病から検査までの期間が1年以内と短かった。てんかん精神病の一部で急性期から亜急性期において、抗グルタミン酸受容体抗体がその病態に関与している可能性が考えられた。また、複数回血清中あるいは髄液中の抗グルタミン酸受容体抗体を測定し、対照血清あるいは髄液抗体価の平均+2SD以上の高値を示した3名で、うち1名は精神症状寛解後も血清中の抗体価は高値を示し、1名は精神症状寛解後に血清中の抗体価は高値を示さなくなり、1名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。抗グルタミン酸受容体抗体と精神症状の経時的関連は更なる検討を要する。

E. 結論

【非ヘルペス性急性辺縁系脳炎患者の既往症の検討】

NHLE患者に精神・神経障害の既往が多く

みられることから、抗グルタミン酸受容体抗体がNHALE発病以前から既に精神症状の発現に対して何らかの影響を及ぼしている可能性があると考え。

【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特徴の検討】

抗グルタミン酸受容体抗体陽性の精神疾患患者および精神症状を伴う脳炎後てんかん患者とNHALE患者の臨床的特徴との類似点が見出されたことから、抗グルタミン酸受容体抗体がこれらの患者の精神症状発現に何らかの影響を及ぼしている可能性があると考え。

【てんかん精神病患者の抗グルタミン酸受容体抗体の関連の検討】

てんかん精神病患者の一部で抗グルタミン酸抗体の抗体価が高値を示すことから、てんかん精神病の病態にグルタミン酸受容体自己免疫学的が関与している可能性が考えられた。てんかん精神病の精神症状と抗グルタミン酸受容体抗体の継時的関連は更なる検討を要する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sakakibara E, Nishida T, Sugishita K, Jinde S, Inoue Y, Kasai K. Acute psychosis during the postictal period in a patient with idiopathic generalized epilepsy: postictal psychosis or aggravation of schizophrenia? A case report and review of the literature. *Epilepsy Behav* 24: 373-376, 2012.

2. 学会発表

1. 西田拓司. てんかん外科治療前後の側頭葉てんかん患者の精神医学的側面に関する前方視的研究(第一報); 第48回日本てんかん学会; 2014 Oct2; 東京.

2. 西田拓司. てんかん学習プログラムMOSES; 第56回日本小児神経学会; 2014 May31; 浜松.
3. 西田拓司. てんかんの診断・治療はどのように行われるのか; 第26回日本総合病院精神医学会; 2013 Nov30; 京都.
4. 西田拓司. 患者教育: 患者学習プログラムの実践, 特別企画セッション「てんかん医療と教育: 人材育成と啓発のための提言」; 第47回日本てんかん学会; 2013 Oct12; 北九州.
5. Nishida T. EEG studies in epilepsy-related psychiatric disorders; 11th World Congress of Biological Psychiatry; 2013 Jun23; Kyoto.
6. 西田拓司. てんかんの診断; 第109回日本精神神経学会; 2013 May24; 福岡.
7. 西田拓司. 法的問題検討委員会報告: 事例検討とアンケートからみた現行制度の問題点, ワークショップ1「てんかんと運転」; 第46回日本てんかん学会; 2012 Oct11; 東京.
8. 西田拓司. てんかん診療の現状と課題, シンポジウム48「てんかん診療の最前線」; 第108回日本精神神経学会; 2012 May26; 札幌.

3. 書籍の刊行

1. 西田拓司. てんかん. ガイドライン外来診療2014. 日経メディカル開発. 東京: 539-541, 2014.
2. 西田拓司. 分類: 進化する概念. 井上有史監訳. てんかん症候群: 乳幼児・小児・青年期のてんかん学, 第5版. 中山書店, 東京: 2-12, 2014.
3. 西田拓司. 遺伝規定性の焦点てんかん. 井上有史監訳. てんかん症候群: 乳幼児・小児・青年期のてんかん学, 第5