

初代培養神経細胞を用いた抗神経抗体の新規検出法の開発と自己免疫性脳炎の診断アルゴリズムの検討
研究分担者 原 誠 日本大学医学部 准教授

研究要旨

我々は脳炎患者髄液とラット脳凍結組織を用いた免疫組織化学による抗神経抗体検出法である tissue-based assay (TBA) の臨床応用により自己免疫性脳炎の早期診断法を確立してきた。我々は TBA の相補的な抗体検出法として、標的抗原の細胞レベルでの局在を評価できるラット海馬神経細胞の初代培養システムおよび患者髄液との免疫細胞化学による抗体検出法 (live-neuron assay) を確立した。本手法では TBA で検出感度の不十分な Glycine 受容体抗体の検出が可能であることが示唆され、TBA と相補的な網羅的神経抗体診断が可能であると考えられた。また異なる神経抗体検出法を組み合わせた抗体診断による自己免疫性脳炎の診断アルゴリズムを提唱した。

A. 研究目的

ラット海馬神経細胞の初代培養システムを用いた抗神経抗体の検出法を確立し、相補的な抗体診断システムによる自己免疫性脳炎の診断アルゴリズムを開発する。

B. 研究方法

胎生18日のWistarラットの海馬神経細胞の初代培養を確立する。方法はグリアとの共培養によるBanker変法を用いて、poly-L-lysine処理したカバーガラス上に細胞を培養し、成熟神経細胞（培養18-21日）と脳炎患者髄液との反応を免疫細胞化学法 (live-neuron assay) で確認する。

さらに、ラット脳凍結組織を用いた免疫組織化学による抗神経抗体検出法である tissue-based assay (TBA) と本手法を併用により、相補的な網羅的神経抗体診断が可能か検討し、自己免疫性脳炎の診断アルゴリズムについて検討する。

（倫理面への配慮）

本研究は日本大学附属板橋病院臨床研究審査会で承認を得ている（RK-200424-01）。

C. 研究結果

成熟した培養海馬生神経細胞 (live primary neurons) と脳炎患者髄液との蛍光免疫染色では、陽性例では細胞表面および神経突起に局在する抗原が検出された。脳炎患者からNMDA受容体抗体陽性6例、LGI1抗体陽性4例の抗神経抗体を新規に検出した。さらに、Glycine受容体抗体陽性1例はTBAでは検出されなかった一方、live-neuron assay で陽性を示した。また、TBAとlive-neuron assay とのコンビネーションによる網羅的神経抗体スクリーニングとcell-based assay (CBA) による特異抗原確定診断の結果について自己免疫性脳炎90例

を用いて比較検討した結果では、検査結果に乖離を認めなかった。

D. 考察

我々はTBAによる抗神経抗体の診断体制を確立し臨床応用してきたが、TBAの細胞レベルでの抗原局在については不明であった。本研究で確立したlive-neuron assayでは細胞内局在（シナプスおよび細胞表面の抗原クラスター）を明示することが可能であり、さらにGlycine受容体抗体などTBAで検出が困難な抗体種の相補的な検出が可能になる可能性がある。

自己免疫性脳炎患者に対しては髄液のTBAおよびlive-neuron assayの併用による抗体スクリーニングを施行し、陽性例対してCBAを施行する診断アルゴリズムが提唱される。さらに抗体スクリーニングとCBAの結果に乖離がみられなかったことから、スクリーニング陽性例ではCBAの結果を待たずに集中的な免疫療法を検討できる可能性がある。

E. 結論

TBAとlive-neuron assayを併用した抗体スクリーニング体制の確立により抗神経抗体の網羅的診断が可能になり、スクリーニング陽性例ではCBAの結果を待たずに集中的な免疫療法が検討できる可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Hara Makoto(Corresponding author), Nakajima H, Kamei S. Practical approach for the diagnosis of disorders associated with antibodies against neuronal surface proteins. N

Neurology and Clinical Neuroscience 2021;9:56-62.

2) Mattozzi S, Sabater L, Escudero D, Ariño H, Armangue T, Simabukuro M, Iizuka T, Hara Makoto, Saiz A, Sotgiu S, Dalmau J, Graus F. Hashimoto encephalopathy in the 21st century. Neurology 2020;94:217-224.

3) Yokota Y, Hara Makoto(Corresponding author), Akimoto T, Mizoguchi T, Goto YI, Nishino I, Kamei S, Nakajima H. Late-onset MELAS syndrome with mtDNA 14453G→A mutation masquerading as an acute encephalitis: a case report. BMC Neurology 2020;20:247.

2. 学会発表

1) Hara Makoto, Yokoto Yuki, Ninomiya Satoko, Kamei Satoshi, Nakajima Hidetomo. Analyses of immunolabeling patterns using a tissue-based assay can predict anti-NMDAR encephalitis. 第61回日本神経学会学術大会, 岡山, 2020.9

2) 原 誠. 脳炎患者に対するtissue-based assayを用いた迅速抗体診断体制の構築 (シンポジウム 27. 自己免疫性脳炎の最前線). 第61回日本神経学会学術大会, 岡山, 2020.9

3) 原 誠, 廣瀬 聡, 溝口 知孝, 横田 優樹, 秋本 高義, 二宮 智子, 石原 正樹, 森田 昭彦, 亀井 聡, 中嶋 秀人. 自己免疫性脳炎の早期診断・治療に対するtissue-based assayを用いた迅速抗体診断の有用性の検討. 第32回日本神経免疫学会学術集会, 金沢, 2020.10

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし