

## 抗 AQP4 抗体陽性 MS/NMO における抗原特異的 T 細胞性免疫応答

分担研究者 松尾秀徳<sup>1)</sup>

共同研究者 松屋合敏<sup>1)</sup>、近藤誉之<sup>1)</sup>、野村恭一<sup>2)</sup>

### 研究要旨

抗アクアポリン 4(AQP4)抗体陽性多発性硬化症(MS) (あるいは neuromyelitis optica) において抗原特異的 T 細胞性免疫応答の病態への関与について検討した。

対象者の末梢血単核球(PBMC)を 2 日間未刺激で培養後、AQP4 由来のオーバーラッピングペプチドの混合物で刺激すると、NMO 群、MS 群で健常群に比して有意に CD69 陽性 CD4 T 細胞の増加がみられ、CD4 T 細胞の活性化が示された。また AQP11-30、91-110 で刺激すると NMO 群では MS 群に比して有意に CD4 T 細胞の活性化が惹起された。これらの AQP4 由来抗原の複数回の刺激により、抗原特異的 T 細胞株が樹立できた。

MS 群では PLP95-116 により健常群に比して有意な CD69 陽性 CD4 T 細胞の増加がみられ、NMO 群とは T 細胞性免疫応答の標的抗原が異なることが示唆された。

### 研究目的

前回、我々は Flow cytometry を用いた CD4 T 細胞上の CD69 発現頻度の解析により、抗 AQP4 抗体陽性 MS の 1 症例において、1) 再発時に AQP4 特異的 T 細胞性免疫応答の亢進を認めること、2) 同症例における AQP4 の T 細胞エピトープの同定、3) 抗 AQP4 抗体陽性 MS では抗体と T 細胞が協調して病態と関与している可能性があることを報告した。

今回は、NMO、MS、健常人の各群について症例を増やし、同様に Flow cytometry を用いた解析を行い検討した。さらに、NMO 症例において抗原特異的な T 細胞の活性化の存在を裏付けるため、AQP4 由来抗原刺激による T 細胞株の樹立を試みた。

### 研究方法

対象：寛解期の NMO 患者 7 名 (前回報告の 1 例を含む)。いずれも抗 AQP4 抗体陽性。対照として、臨床的に視神経脊髄型でなく NMO と鑑別しうる寛解期の MS 患者 5 名。健常群として特記すべき基礎疾患のない 7 名。

方法(1)抗原刺激による CD4 T 細胞上の CD69 発現誘導の解析：PBMC を分離し、 $5 \times 10^6$ /well ずつ 96 穴平底プレートに播種し 2 日間未刺激で培養後、刺激ペプチドとして AQP4 由来のオーバーラッピングペプチド 32 種のうち可溶化できた 28 種 ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) と、その混合物(AQP-M、単一ペプチドとしては各  $2 \mu\text{g/ml}$ )、ミエリン抗原由来のペプチド 6 種(MOG13-28、MOG145-160、PLP95-116、PLP139-150、PLP185-209、MBP83-99、各  $10 \mu\text{g/ml}$ )のいずれかを添加し 4 時間培養した。これを抗 CD3-FITC、抗 CD69-PE、抗 CD4-PEcy5 で染色し、Flow cytometry にて CD4 T 細胞表面の CD69 の発現頻度を解析した。

1) 国立病院機構長崎神経医療センター神経内科・臨床研究部

2) 埼玉医科大学総合医療センター神経内科

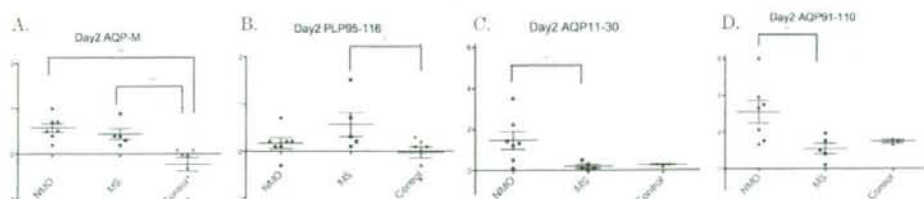


図. 抗原刺激後と未刺激状態でのT細胞上CD69発現頻度の変化  
(抗原刺激後のCD69発現頻度と未刺激でのCD69発現頻度の差)

方法(II)抗原特異的T細胞株の樹立：NMO群のうち1症例のPBMC  $1 \times 10^6$ /wellをAQP-M、AQP11-30、AQP91-110のいずれかで刺激し、8日ごとに同じ抗原と  $1 \times 10^6$ の non T細胞をAPCとして追加し、数回繰り返した後、さらに3日後IL-2を加えT細胞株の樹立を試みた。これらの細胞に a)同じ抗原と non T細胞、b)non T細胞のみ、のいずれかを加え培養後、Flow cytometryにてa/bのCD3細胞比をとり Stimulation index (SI)とした。SI >1.4で抗原特異性ありとした。

## 研究結果

(I) 未刺激状態と AQP-M で刺激した場合のCD4 T細胞上のCD69の発現頻度の差は、NMO群では  $0.57 \pm 0.10\%$ 増加していた。MS群では  $0.44 \pm 0.12\%$ 増加、健常群では  $0.23 \pm 0.15\%$ 減少し、NMO群-健常群間、MS群-健常群間で有意差を認めた(図A、 $p=0.0007$ )。PLP95-116を刺激ペプチドとすると(図B)、健常群で  $0.03 \pm 0.12\%$ 減少していたのに対して、MS群ではCD69発現頻度が  $0.56 \pm 0.26\%$ 増加していた( $p=0.0369$ )。NMO群では  $0.17 \pm 0.11\%$ の増加であった。

AQP4由来の単一ペプチドのうち、AQP11-30、AQP91-110で刺激した場合(図C、図D)、CD69発現頻度の増加はNMO群でそれぞれ  $1.46 \pm 0.42\%$ 、 $3.09 \pm 0.62\%$ 、MS群で  $0.20 \pm 0.09\%$ 、 $1.08 \pm 0.29\%$ 、健常群では  $0.27 \pm$

$0.03\%$ 、 $1.47 \pm 0.09\%$ であり、NMO群-MS群間で有意差がみられた( $p=0.0358$ 、 $p=0.0601$ )。他のAQP4由来単一ペプチドで刺激した場合はどの群でもCD69の有意な発現上昇はみられなかった。

(II)AQP11-30、AQP91-110およびAQP-Mで複数回刺激後、AQP-Mに特異的に反応(SI >1.4)したのは4/7well、AQP11-30で7/8well、AQP91-110で4/8wellであった。NMO症例においてAQP4抗原特異的T細胞株は高頻度に樹立できた。

## まとめ

抗AQP4抗体陽性MS患者ではAQP91-110、AQP11-30、あるいはその混合物によりT細胞性免疫応答の亢進を認めた。

MS患者ではPLP95-116に対するT細胞性免疫応答が健常人に比して有意に亢進しており、NMOとMSで異なる抗原を標的としてT細胞性免疫応答が起こっている可能性が示唆された。

## 健康危険情報

なし

## 知的財産の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし

## 経過中に抗 AQP4 抗体が陽転化した neuromyelitis optica

分担研究者 楠 進<sup>1)</sup>

共同研究者 ○宮本勝一<sup>1)</sup>

### 研究要旨

抗 aquaporin-4 抗体 (抗 AQP4 抗体) は病気の活動性や治療によって変動するため測定のタイミングが重要とされる。我々は、経過中に抗 AQP4 抗体陽性を確認した 5 症例を経験した。1 例目は視神経と脊髄の再発を繰り返している 34 歳女性。長大脊髄炎を発症した時に抗 AQP4 抗体陽転を確認した。2 例目は脊髄と視神経に再発を繰り返している 20 歳女性。当初、脊髄長大病変はなかったため IFN $\beta$  を導入したが、効果が得られず中止した。その後、抗 AQP4 抗体陽性が判明し PSL や免疫抑制薬を開始したが、再発が続くため血液浄化療法を併用した。3 例目は病初期に C-MS と考えた 38 歳女性。IFN $\beta$  を開始したが、重篤な再発を認めたため中止した。その後、脊髄病変が目立つ様になり抗 AQP4 抗体陽転を確認した。4 例目は AZP で再発予防していた 65 歳女性。副作用で中止したところ脊髄炎を再発し、抗 AQP4 抗体陽性を確認した。5 例目は視神経炎を繰り返す 20 歳女性。経過中抗 AQP4 抗体陽性を確認したため、PSL 内服を開始したが、効果不良のため血漿交換を併用した。抗 AQP4 抗体が経過中に陽転化した原因は不詳であるが、保存検体の劣化、治療薬の影響、測定感度、重症化に伴う抗体価上昇などが考えられた。抗 AQP4 抗体陰性であっても、病状が neuromyelitis optica (NMO) に類似する場合は NMO に準じた治療が必要である。IFN $\beta$  は液性因子を活性化させる可能性がある。

### 研究目的

NMO の診断には抗 AQP4 抗体の存在が重要である。抗 AQP4 抗体は病気の活動性や治療によって変動するため測定のタイミングが重要とされる。しかし、適切な時期に採取された検体であっても、臨床像は明らかに NMO でありながら抗 AQP4 抗体が陰性となる例は少なくない。我々は、当初抗 AQP4 抗体が陰性で、経過中に陽転化した 5 症例を報告する。

### 研究方法

近畿大学医学部神経内科にて、2003 年以降に MS/NMO と診断された症例の中で抗 AQP4 抗体陽性例を対象とした。検体は再発時治療

前の血清を用い、抗 AQP4 抗体は九州大学神経内科にて測定していただいた。

### (倫理面への配慮)

患者情報、および血液検体は匿名化し、個人が特定できないように配慮した。個人の情報が表にでることがないように細心の注意を払い、プライバシーの保護には十分に配慮した。

### 研究結果

これまで 16 例の抗 AQP4 抗体陽性例を経験しているが、そのうちの 5 例は当初陰性であり、経過中に陽転化している (表)。

1 例目は 34 歳女性。7 年来の病歴で視神経と脊髄の再発を繰り返している。経過中、胸髄に長大脊髄炎を来たして以来、抗 AQP4 抗体が陽転化した。PSL 内服にて安定している。

1) 近畿大学医学部神経内科

2 例目は主に脊髄と視神経の再発を認める 20 歳女性。当初、脊髄長大病変はなく、抗 AQP4 抗体陰性であったため IFN $\beta$  を導入したが効果不良のため中止した。その後抗 AQP4 抗体陽性を確認し、PSL や免疫抑制薬を開始するも再発が続くため、血液浄化療法を併用したところ、再発回数は著明に減少した。

3 例目は 38 歳女性。病初期は大脳病変が主体であったため C-MS として IFN $\beta$  を開始したが、重篤な再発を認めたため中止した。その後、脊髄病変が目立つようになったため保存血清を調べたところ抗 AQP4 抗体は陽転化していた。現在、PSL 内服が有効である。

4 例目は、10 年以上の経過で視神経炎と脊髄炎を繰り返す 65 歳女性。AZP 単独内服にて経過良好であったが、副作用のため中止したところ脊髄炎を再発した。再発時の血清で抗 AQP4 抗体が陽性であった。

5 例目は約 3 年の経過で視神経炎を繰り返す 20 歳女性。経過中に抗 AQP4 抗体陽性を確認したため PSL 内服を開始するも、効果不十分であったため血漿交換を併用したところ、再発回数が著明に減少した。

表

症例	年齢	性別	病変部位				IFN $\beta$ 治療	現治療
			脳	視神経	脊髄	LCL		
1	34	F	-	+	C,Th	+	未使用	PSL
2	20	F	+	+	C,Th	+	効果なし	PSL、CYP 血漿交換
3	38	F	+	(-)	Th	+	増悪	PSL
4	65	F	+	+	C,Th	+	未使用	AZP
5	20	F	+	+	C,Th	+	未使用	PSL、AZP 血漿交換

PSL: prednisolone, AZY: azathioprine,

CYP: cyclophosphamide

## 考察

抗 AQP4 抗体が経過中に陽転化した原因は不詳であるが、保存検体については検体の劣化、治療薬の影響、測定感度の問題、重症化に伴う抗体価上昇などが考えられる。また IFN $\beta$  が液性因子を活性化させるという報告もあり、IFN $\beta$  が抗 AQP4 抗体産生を促進する可能性がある。

## 結論

抗 AQP4 抗体陰性であっても、臨床症状や治療反応性が NMO に類似する場合は NMO に準じた治療が必要である。

## 謝辞

抗 AQP4 抗体を測定していただいた、九州大学神経内科・松下拓也先生、磯部紀子先生に深謝いたします。

## 文献

Miyamoto et al. Upregulation of water channel aquaporin-4 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurol Sci* 2009;276:103-7.

## 健康危険情報

なし

## 知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし

# 視神経炎病変を伴わない limited form of neuromyelitis optica の

## 臨床病理学的特徴

研究分担者 西澤正豊<sup>1)</sup>

共同研究者 柳川香織<sup>1)</sup>、河内泉<sup>1)</sup>、横関明子<sup>1)</sup>、豊島靖子<sup>2)</sup>、柿田明美<sup>2)</sup>、高橋均<sup>2)</sup>

### 研究要旨

NMO-IgG・抗アクアポリン4 (AQP4) 抗体の発見により、本抗体陽性例から脊髄炎または視神経炎の一方のみを呈する早期型 NMO、すなわち「limited form of NMO」の存在が提唱されはじめている。本研究では、視神経病変を伴わず、脊髄炎のみを呈する limited form of NMO の一群を抗 AQP4 抗体陽性例から解析し、definite NMO との臨床病理学的相違を検討した。両群とも女性優位であり、年間再発率、抗 AQP4 抗体陽性頻度、脊髄 MRI での病巣パターン、病理所見において同一の特徴を示し、早期、晩期という時間軸に関係なく、homogeneous な免疫病態が全経過を通じ、出現していることが示唆された。一方で治療反応性に関して、definite NMO は limited form of NMO に比較して機能回復が不良であり、1) 同一脊髄高位での病巣重複数増加、2) 髄液 IL-6、IL-1 $\beta$  高値から推測される炎症量の増大に伴い、definite NMO で治療反応性不良が惹起されている可能性が考えられた。以上から、NMO の長期予後改善において、limited phase での早期診断と再発予防治療が重要であることが示唆された。

### 研究目的

2004 年、Lennon らのグループにより発見された NMO-IgG・抗アクアポリン4 (AQP4) 抗体は、neuromyelitis optica (NMO) の特異的診断を可能にした。結果、抗 AQP4 抗体陽性例から、脊髄炎、視神経炎の一方のみを伴う limited form of NMO の存在、すなわち NMO 早期型が提唱され、NMO 診断基準を満たす definite NMO とともに、NMO spectrum として考えられるようになった。本研究では、limited form of NMO のひとつである「視神経病変を伴わず脊髄炎のみを呈する NMO」を、抗 AQP4 抗体陽性例から解析し、definite NMO との臨床病理免疫学的相違を検討することを目的とする。

### 研究方法

1980 年から 2008 年の間に入院加療を要した NMO 診断基準を満たす definite NMO 群 (D 群) 9 例、および視神経病変を伴わず、脊髄炎のみを呈する limited form of NMO (L 群) 8 例における臨床像、剖検および生検標本に

おける病理像、髄液サイトカイン、血清抗 AQP4 抗体価の比較解析を行った。

### 研究結果

D 群では 9 例中 8 例が女性、L 群では全例女性であった。罹病期間は D 群の  $18.9 \pm 12.1$  年に比べ L 群では  $4.8 \pm 4.5$  年と短かった。平均発作回数は D 群の  $8.9 \pm 5.5$  回と比べ L 群では  $2.1 \pm 1.3$  回と少ないが、年間再発率で見ると有意な差を認めなかった (D 群 =  $0.6 \pm 0.3$ 、L 群 =  $0.5 \pm 0.3$ )。発作ごとの治療反応性を EDSS 変化値で見ると、D 群では  $1.2 \pm 1.4$  であるのに対し、L 群では  $3.2 \pm 2.4$  であり、L 群で良好な治療反応性を確認した。これを retrospective に D 群で脊髄炎のみの期間と、脊髄炎と視神経炎がともに見られる期間に分けて解析すると、前者では  $2.9 \pm 1.8$ 、後者では  $0.9 \pm 1.2$  であり、D 群の脊髄炎のみの期間では、L 群と同様に治療反応性が良好であった。抗 AQP4 抗体については、D 群では 9 例中 8 例が、L 群では全例が抗 AQP4 抗体陽性であり、D 群で抗体値が高い傾向にあった。髄液

1) 新潟大学脳研究所神経内科学分野

2) 新潟大学脳研究所神経病理学分野

所見についてはミエリン塩基性蛋白上昇率、細胞数の増多には差を認めず、サイトカインでは再発時に IL-1 $\beta$ 、IL-6 が L 群に比べて D 群で高値であった。MRI 画像所見では両群とも共通した特徴をもち、3 椎体以上にわたる長椎体病変を認め、中心灰白質を主体としたアルファベット H 型病変、造影効果を伴った偏在した周辺白質病変を認めた。両群間で脊髄病巣の長さには違いを認めないが (D 群 =  $4.7 \pm 2.6$ 、L 群 =  $3.9 \pm 2.3$ )、特に D 群で同じ脊髄高位での発作が繰り返して生じていた (9 例中 7 例)。病理学的検索では、D 群の脱髄病巣の全病巣および L 群の生検病巣のいずれにおいても AQP4 の発現消失と血管周囲に免疫グロブリン沈着を伴う同一の特徴を持つ脱髄病巣であった。

#### 考察

今回の結果から、まず L 群は、D 群に比べ、罹病期間が短く、発作回数が少ないことから、L 群は D 群の早期型であると考えられた。髄液所見や MRI での病変分布、病理学的所見の特徴が同一であり、両群は同一の免疫学的機序で病変が形成されていることが推測された。一方、L 群での治療反応性は、D 群に比較して良好であり、2 群間での治療反応性は明らかに異なっていた。更に D 群を retrospective に解析した時の脊髄炎のみの期間も、同様に治療反応性は良好であり、発症早期の limited

phase では良好な治療反応性を示すものと考えられた。同一脊髄高位での病巣重複数増加、髄液 IL-6、IL-1 $\beta$  高値から推測される炎症量の増大に伴い、治療反応性不良が惹起されている可能性が考えられた。

#### 結論

女性優位、年間再発率、抗 AQP4 抗体陽性頻度、脊髄 MRI、病理所見において、D 群、L 群ともに同一の特徴を示し、早期、晚期という時間軸に関係なく、homogeneous な免疫病態が全経過を通じ、出現していることが示唆された。また、L 群では D 群に比べて罹病期間が短く、発作回数が少ないことから、L 群は NMO の早期病巣を見ていると考えられる。一般に、NMO は重症型が多いとされてきたが、L 群での治療反応性は良好で、これは D 群の脊髄炎のみの期間においても同様であり、limited phase での早期診断と再発予防治療が重要であることが示唆された。

#### 健康危険情報

なし

#### 知的財産権の出願・登録状況

特許取得:なし

実用新案登録:なし

## 視神経脊髄炎の特異な免疫病態～アストロサイトパチー

研究分担者 糸山泰人<sup>1)</sup>

共同研究者 三須建郎<sup>1) 2)</sup>・高野里菜<sup>1)</sup>・高橋利幸<sup>1)</sup>・西山修平<sup>1)</sup>・中島一郎<sup>1)</sup>・藤原一男<sup>1) 2)</sup>

### 研究要旨

近年、視神経脊髄炎 (NMO) の患者血清には中枢神経系の微小血管や軟膜に特異的に反応する NMO-IgG が見出され、その標的抗原がアストロサイトの足突起に発現するアクアポリン 4 (AQP4) であることが報告された。in vitro の検討で、AQP4 抗体によりアストロサイト障害が起こることが報告されたが、in vivo の検討では AQP4 抗体の passive transfer の報告が昨年欧州 MS 学会で発表された以外は未だになく、臨床・病理学的にアストロサイト障害の有無を検討することが重要である。本研究では、病理学的に GFAP および AQP4 の脱落を特徴とする特異な免疫病態について検討し、さらには急性期 NMO、MS、対象群における髄液中のグリア線維酸性蛋白 (GFAP) および S100B を検討し、NMO では他群と比較して極めて高く、症状や病変の長さとは強く相関することを報告した。臨床的に、アストロサイト障害の検討は有益であると思われる。

### 研究目的

我々は、NMO 病巣の免疫組織学的検討により、AQP4 の欠落とともグリア線維酸性蛋白 (GFAP) の欠落を伴うが髄鞘蛋白 (MBP) の染色性は保たれることから、NMO は脱髄を主体とする MS とは基本的に異なる疾患であると考えているが、アストロサイト障害の臨床的意義については未だに不明な点ばかりである。本研究では、臨床・病理学的に NMO におけるアストロサイト障害について検討し、今後の NMO と MS の特異な免疫病態を明らかにするとともに、その臨床的意義について検討することを目的とする。

### 研究方法

(病理)NMO 12 例、MS 6 例、正常対象 8 例の剖検標本を用い、HE、KB 染色を施行した。病変を急性炎症期、急性脱髄期、慢性活動期、慢性非活動期に分類し、また AQP4、ミエリン塩基性蛋白 (MBP)、グリア線維細胞酸性蛋白 (GFAP) の発現を免疫組織学的に検討した。

(髄液バイオマーカー)

NMO10 例、MS10 例、対象群 11 例における急性期の髄液により、髄液中 GFAP、S100B を測定し、急性期の障害度 EDSS、脊髄病変長など各臨床パラメーターとの関連を解析した。

(倫理面への配慮)

東北大学倫理委員会の指針に基づき研究を行った。

### 研究結果

1) 東北大学神経内科

2) 東北大学多発性硬化症治療学

急性炎症期には脊髄中心部を含む広範な AQP4 発現の低下が認められ GFAP も低下が認められた。一方、特に急性期の AQP4 および GFAP の発現低下部位において、MBP 陽性の髄鞘が比較的保たれる傾向が認められた。脱落する領域は、急性期 NMO 病変においては AQP4 > GFAP > MBP の順で見られる傾向がある。AQP4 陰性の壊死性病変中心部では GFAP 陽性のアストロサイトは認められないが、病変周囲では多くの GFAP 陽性のアストロサイトが観察されたが、その多くは変性所見が認められた。特に境界域において細胞体の肥大と変形が著明で、足突起の不整と断裂を認めた。病変中心部には Rosenthal 線維像も確認された。MS の脱髄巣では変性像は殆ど認められず比較的均一な線維性グリオシスで覆われ、NMO とは明らかに異なっていた。

髄液中 GFAP は、NMO ( $7,666.0 \pm 15,266.5$  ng/ml)、MS ( $0.7 \pm 1.5$ )、ADEM ( $0.4 \pm 0.2$ )、正常対象 ( $0.6 \pm 0.3$ ) と、圧倒的に NMO で有意に高値であり、NMO における髄液 GFAP 濃度は、再発時 EDSS、脊髄病変長と強い相関が明らかとなった ( $r > 0.8$ )。S100B も同様の傾向が認められた。

#### 考察

NMO では病巣部位でアストロサイトに発現する AQP4 および GFAP の免疫染色性が欠落し、MS では発現が亢進していることから、NMO と MS の病態は異なることが示唆される。また、MBP は比較的保存され、また病変周囲では

AQP4 の脱落がより広がっており、AQP4 がより早期に障害されることが示唆される。これらからも、AQP4 に対する自己免疫現象によってアストロサイトの障害が生じて、脱髄に先行する特異な免疫病態が関与していると推察される。

その GFAP の脱落が臨床的にどう関わるかは現時点では不明であるが、今回の髄液の検討から GFAP の脱落の程度は極めて著しく MS や ADEM を凌駕しており、脱髄とは異なること、強く臨床症状と関連する事が示唆された。NMO は、臨床的には治療抵抗性の高度後遺症を残す例もあれば、回復される例もあり一概に重症とは言えない多様性を有するの事実である。臨床的にアストロサイト障害に起因して中枢神経系に浮腫・脱髄・壊死などの一連の病態を生じる特異な疾患であり、今後 *in vivo* での検討や臨床的なアストロサイト障害の意義がさらに解明される事が望まれる。

#### 結論

NMO は、アストロサイト障害に起因する特異な免疫病態を有する疾患である。

#### 健康危険情報

なし

#### 知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし



## 多発性硬化症とNeuromyelitis optica日本人患者における寛解期での無症候性脳MRI造影病変の頻度

研究分担者 田中正美<sup>1)</sup>

共同研究者 田原将行<sup>1)</sup>、大野美樹<sup>1)</sup>、村元恵美子<sup>1)</sup>、梅村敦史<sup>1)</sup>、皆川栄子<sup>1)</sup>、富田 聡<sup>1)</sup>、荒木保清<sup>1)</sup>、高坂雅之<sup>1)</sup>、中野 仁<sup>1)</sup>、松井 大<sup>1)</sup>、小西哲郎<sup>1)</sup>、田中恵子<sup>2)</sup>

### 研究要旨

多発性硬化症(MS)の疾患活動性の指標として、脳MRIでの造影病変(Gd<sup>+</sup>病変)の位置づけは確立しており、臨床試験の指標としても取り上げられるようになってきた。日常的に施行されている脳MRIの撮影法で、どの程度に無症候性造影病変が見出されるのか判っていない。そこで、臨床試験の対象となりうるような条件の患者を選択し、後方視的に検討した。その結果、Gd<sup>+</sup>病変を示した患者の割合は、MSで9/23例(39.1%)、NMOで3/19例(15.8%)であった。1スキャン当たり新規Gd<sup>+</sup>病変数は、MSで0.35、NMOで0.38であった。欧米白人のMS患者でのGd<sup>+</sup>病変頻度に比し、日本人患者では著明に低かった。これは撮影法の違いだけでは説明できないと考えられた。一方、日本人NMO患者では予想以上にGd<sup>+</sup>病変の頻度が高かった。

### 研究目的

多発性硬化症(MS)の疾患活動性の指標として、脳MRIでの造影病変(Gd<sup>+</sup>病変)の位置づけは確立しており、臨床試験の指標としても取り上げられるようになってきた。国内で治験を行う場合でも、国際的に統一した基準で評価することが多くなると思われる。

日常的には欧米の臨床試験での白人MS患者での(Gd<sup>+</sup>病変)陽性率より低いと思われるが、正確な頻度は国内では報告がない。今後の臨床試験の上でも重要と考えられるので、検討を行った。

### 研究方法

2007年4月から2008年9月まで、当院を受診したMS患者および

<sup>1)</sup> NHO宇多野病院MSセンター

<sup>2)</sup> 金沢医科大学神経内科

Neuromyelitis optica (NMO)患者で、30日以内にステロイドパルスの投与を受けていない患者を対象に、撮影前12ヶ月以内に1回以上、この条件を満たさない場合は24ヶ月以内に2回以上の再発が認められた患者で、前後の研究期間の治療内容が変更のない時期の脳MRI所見について、後方視的検討を行った。脳MRIは1.5Tシーメンスを用い、5 mm厚で10%ギャップで23枚スライスでT1を撮像した。

#### 倫理面への配慮

研究への協力を文書で説明し同意を得た。発表に当たっては個人が特定できないように配慮した。

#### 研究結果

19から74歳までの42例を対象とした。MS患者は23例、うち男性5例、NMOは19例、うち男性は4例であった。MRIで3椎体以上連続する脊髄中央部の病変を有する患者は17例、抗AQP4抗体陽性例は12/17例で、両者とも陽性だったのは9例であった。罹病期間はMSで5ヶ月から24年(平均±標準偏差:4年11ヶ月±5年11ヶ月)、NMOで8ヶ月から16年(5年5ヶ月±4年10ヶ月)であった。期間中、無治療だったのはそれぞれ17例、11例で、IFN $\beta$ 治療を継続していたのは6例、8例であった。Gd<sup>+</sup>病変を示した患者の

割合は、MSで9/23例(39.1%)、NMOで3/19例(15.8%)であった。1スキャン当たり新規Gd<sup>+</sup>病変数は、MSで0.35、NMOは0.38であった。

#### 考察

類似の条件で施行された欧米のMSでの臨床試験と比較して、日本人の特性の有無について検討した。

欧米での臨床研究のように、たとえ3 mmギャップレスで撮影したとしても、日本人での造影病変数は少ないと思われる。

#### 結論

欧米白人のMS患者でのGd<sup>+</sup>病変頻度に比し、日本人患者では低かった。一方、日本人NMO患者では予想以上にGd<sup>+</sup>病変の頻度が高かった。

#### 健康危険情報

なし

#### 知的財産権の出願・登録状況

特許取得 : なし

実用新案登録 : なし

## 多発性硬化症と Neuromyelitis optica での Optic coherence tomography について(第 2 報)

研究分担者 田中正美<sup>1)</sup>

共同研究者 小西哲郎<sup>1)</sup>、森下志帆<sup>2)</sup>、田村 寛<sup>2)</sup>、田中恵子<sup>3)</sup>

NHO 宇多野病院 MS センター 同院眼科 金沢医科大学神経内科

### 研究要旨

光干渉断層計(Optical coherence tomography: OCT)は視神経炎の軸索変性の指標として急速にヨーロッパを中心に利用が拡大している。本邦では昨年の本班会議で初めて多発性硬化症(MS)への応用を紹介したが、今年度は日本人正常値の報告と、視神経脊髄炎(NMO)で部位による変性の違いの有無について検討した。その結果、部位による違いはないと考えられ、MSでの temporal pallor の説明は OCT ではできないと考えられた。

### 研究目的

光干渉断層計(Optical coherence tomography: OCT)は近赤外線領域に属する波長光源を用い、低干渉ビームによる干渉現象の違いを信号化することで眼底の断層面を画像化する解析装置である。OCTは主に眼科領域では緑内障の診断に利用されることが多いが、2007年夏以降、欧州を中心に多発性硬化症(MS)の知見が急速に蓄積されつつある。本邦では、昨年度の本会議で、初めて筆者らがOCTを紹介したが(神経内科 68: 411-412, 2008)、日本人の正常値さ

え未だに設定されていない。

古典型MS(MS)だけでなく、最近、抗アクアポリン4抗体など視神経脊髄炎(neuromyelitis optica: NMO)の研究が盛んであるが、視神経炎の軸索変性の解析を目的にOCTを導入した。NMOは圧倒的に女性に多いことから、まず健康な日本人女性を対象に検討を行なって日本人女性の正常値を設定し、その上でMS/NMO患者への応用について検討したので、その有用性について報告する。

<sup>1)</sup> NHO宇多野病院MSセンター

<sup>2)</sup> 同院眼科

<sup>3)</sup> 金沢医科大学神経内科

### 研究方法

22から59歳の緑内障などの眼科疾患のない当院に勤務する女性職員を健康

人対象とし、年齢別の検討を行った。22から29歳の11名、30歳から39歳までの10名、40から49歳までの11名、50から59歳までの6名、合計38名である。疾患対象としては、McDonaldの診断基準を満足するMS29例、Wingerchukの診断基準を満足するNMO26例である。脊髄MRIで連続する3椎体以上の脊髄中央部の病変が認められたのは21例、抗アクアポリン4抗体陽性患者は16例であった。11例で両者が陽性であった。

TOPCON社製の3D OCT-1000を用い、乳頭および黄斑周囲のretinal nerve fiber layer (RNFL)の厚さを定量的に測定した。TOPCON社製の機械では乳頭と黄斑を中心としたそれぞれの眼底写真が8ヶ所のセクターに分かれており、左右の眼を撮影して、一人当たり32個のRNFLの厚さの数値を得た。

### 倫理面への配慮

研究への協力を文書で説明し同意を得た。発表に当たっては個人が特定できないように配慮した。

### 研究結果

健康人の部位別5%値を表1に示す。また、部位別の最小、最大値、中央値などと、年齢との相関を求めた回帰直線と $p$ 値を求めたが、ほとんどの部位で年齢との関係は加齢により薄くなってゆく傾向はあるものの相関は認められなかつ

た。女性MS患者19例、NMO16例について、健康人の部位別5%値よりいずれかのセクターで減少している患者は、左(L)右(R)の乳頭(d)、黄斑(m)部位で、MSは19例中17、15、13、10例、NMOは16例中15、14、16、12例と差異はなく、RNFLが薄くなっているセクターでも両者で差異はなかった。また、正常でも水平方向が薄いのが、両者とも特に垂直方向よりも水平方向、特に側頭部側(t)が鼻側(n)より薄いということもなかった。

### 結論

RNFLの日本人女性の年齢別正常値を出した。加齢により薄くなる傾向は認められなかった。女性MS/NMO患者について検討したが、両者に特に差異は認められず、視神経の軸索変性に差はなかった。ただし、NMOに多い失明患者の多くや臥床患者の全ては検索できず、重症患者が検査できなかったためかもしれない。RNFLの部位別変性にも特に両者で差異は認められず、特定の部位が特に障害されやすいという現象も認められなかった。

### 健康危険情報

なし

### 知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし

## IL-25 は脳毛細血管内皮細胞に限局して発現し、 血液脳関門の維持を制御している

分担研究者 錫村 明生<sup>1)</sup>

共同研究者 藪部 佳史<sup>1)</sup>、竹内 英之<sup>1)</sup>、水野 哲也<sup>1)</sup>、神田 隆<sup>2)</sup>、  
佐野 泰照<sup>2)</sup>

### 研究要旨

本研究では、多発性硬化症 (MS) 及びその動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の脳微細血管内皮細胞における IL-25 の発現を調節する条件及びその機能を明らかにすることを目的として研究を行った。その結果、MS 及び EAE の炎症部位において IL-25 の発現は減少していた。また、脳微細血管内皮細胞株を用いた実験から、腫瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$ ) などのような炎症性サイトカインが IL-25 の発現を抑制することが明らかとなった。さらに、IL-25 は血液脳関門の構成要素である tight junction タンパクの発現を誘導し、血液脳関門の透過性を抑制した。これらの結果から、IL-25 は血液脳関門の機能の維持または保護に働いており、脳微細血管内皮細胞による IL-25 の発現誘導が新たな治療標的となる可能性が見出された。

### 研究目的

IL-25 は IL-17 ファミリーに属するサイトカインで、肺胞マクロファージ、マスト細胞、好酸球などのようなアレルギー反応に関わる細胞により産生される。IL-17A や IL-17F のような他の IL-17 ファミリーサイトカインと違い、IL-25 はナイーブ T 細胞に作用して、Th2 細胞への分化を誘導する。我々は、以前に、IL-25 が通常状態で脳微細血管内皮細胞により産生されることを見出した。しかし、血液脳関門 (BBB) の破綻が発症に不可欠であると考えられる多発性硬化症 (MS) やその動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎

(EAE) における IL-25 の発現調節については不明である。したがって、本研究では、MS 及び EAE の脳微細血管内皮細胞における IL-25 の発現を調節する条件及びその機能を明らかにすることを目的とする。

### 研究方法

本研究では、C57BL/6J マウスを使用した。EAE は MOG<sub>35-55</sub> 及び百日咳毒素を用いて発症させ、感作後 0、12、18、25 日目に脊髄の凍結切片を作成し、von Willebrand factor (vWF) 及び IL-25 に対する抗体を用いて免疫染色を行った。MS 患者 (46 歳、女性) における免疫染色については LSAB 法により行われた。  
*in vitro* における IL-25 の発現解析についてはリアルタイム RT-PCR 法により行った。また、

1) 名古屋大学環境医学研究所神経免疫分野

2) 山口大学大学院医学系研究科神経内科学

脳微小血管内皮細胞のバリア機能を評価するために Evan's blue albumin 及び CD4 陽性 T 細胞を用いた透過性実験を行った。さらに、tight junction protein (occludin, JAM, claudin-5) の発現を解析するために Western blotting を行った。

(倫理面への配慮) 全ての動物実験は名古屋大学動物実験委員会の指針に則って行われた。

## 研究結果

MOG 感作後、0 日目、12 日目 (発症前) において脳微小血管内皮細胞は十分に IL-25 を発現していたが、18 日後 (発症のピーク期)、25 日後 (寛解期) においてはその発現は著しく減少した。MS 患者においても、無傷な部分と比較して、活発に炎症反応が起こっている部位における脳微小血管内皮細胞では、IL-25 の発現が有意に減少した。また、脳微小血管内皮細胞株を用いて IL-25 の発現について検討したところ、TNF- $\alpha$ 、IL-17、IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 は IL-25 の発現を減少させた。また、透過性実験において、IL-25 は TNF- $\alpha$ により誘導されたバリア機能の低下を有意に抑制した。さらに、IL-25 は occludin, JAM, claudin-5 の発現を誘導し、また、TNF- $\alpha$ により抑制されたこれら 3 つのタンパク質の発現を回復させた。

## 考察

本研究から、IL-25 は脳血管内皮細胞において通常状態で発現しており、BBB のバリア機能を維持または保護することが明らかとなっ

た。IL-25 ノックアウトマウスに EAE を起こすと死亡することが報告されており<sup>1)</sup>、この原因として BBB のバリア機能の破綻が考えられる。また、本研究から、IL-25 の投与が新規の MS の治療法として考えられるが、IL-25 は Th2 反応を誘導し、アレルギー性の炎症反応を起こすことが報告されているので、脳微小血管内皮細胞における IL-25 レセプターの発現を上昇させるか又は局所において IL-25 を誘導する条件を探索するなど異なったアプローチが必要であると考えられる。

## 結論

IL-25 は脳微小血管内皮細胞において限局して発現し、tight junction タンパクの発現誘導を介して血液脳関門を維持又は保護する。

## 文献

- 1) Kleinschek *et al.*, IL-25 regulates Th17 function in autoimmune inflammation, *J. Exp. Med.* 204: 161-170 2007.

## 健康危険情報

なし

## 知的財産権の出願・登録状況

特許取得：特願 2008-185304

グルチルレチン酸誘導体及びその作用

実用新案登録：なし

血液脳関門のバリア機能を増強させる薬物の同定およびそのメカニズムの検討

研究分担者 神田 隆<sup>1)</sup>

共同研究者 佐野泰照<sup>1)</sup>、前田敏彦<sup>1)</sup>、安部真彰<sup>1)</sup>、清水文崇<sup>1)</sup>、  
柏村陽子<sup>1)</sup>

### 研究要旨

【目的】多発性硬化症 (MS) では血液脳関門 (BBB) の破綻がその病態の重要なプロセスであると考えられている。破綻した BBB を修復する、あるいは BBB の破綻を阻止することが可能となれば、MS の新たな治療法となりうると考えられる。【方法】温度感受性 SV40 ラージ T 抗原を用いて作成したヒト *in vitro* BBB モデルを用い、IFN- $\beta$ 1b が BBB のバリア機能を高める作用があるかどうかを検討した。Tight junction 構成蛋白である claudin-5, occludin, ZO-1, ZO-2 の distribution や mRNA レベルでの発現量の変化についても検討した。【結果】IFN- $\beta$ 1b を 2000IU/mL の濃度で作用させた群では対照に比し電気抵抗が上昇する傾向にあったものの有意差は認めなかった。Tight junction 蛋白の免疫染色での染色性も IFN- $\beta$ 1b 群と対照群で明らかな差異は認められなかったものの 10000IU/mL の濃度下で、ZO-1 の mRNA レベルが有意に増加した。【結論】IFN- $\beta$ 1b は BBB の ZO-1 発現を増加させることにより、バリア機能に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

### 研究目的

多発性硬化症 (MS) では血液脳関門 (BBB) の破綻がその病態の重要なプロセスであると考えられている。BBB の破綻により炎症性細胞やサイトカインなどの炎症誘発因子が脳内へ侵入・流入し、新たな脱髄巣が形成される。破綻した BBB を修復する、あるいは BBB の破綻を阻止することが可能となれば、MS の新たな治療法となりうると考えられる。ハイドロコルチゾンやデキサメタゾンなどの副腎皮質ステロイド薬やインターフェロン  $\beta$  (IFN- $\beta$ ) が BBB の機能を改善させる作用があること *in vitro* BBB モデルを用いた解析により示され

ている。最近われわれは温度感受性 SV40 ラージ T 抗原遺伝子を導入したヒト由来 *in vitro* BBB モデルの樹立に成功し、H19 年度の本学会議にてその詳細を報告した。本細胞株を用いて、BBB 機能を高める、あるいは破綻した BBB 機能を修復する作用のある薬物を複数同定し、その分子生物学的なメカニズムを明らかにすることが本研究の目的である。MS の治療薬として定着しつつある IFN- $\beta$  に関しては *in vitro* の実験系で IFN- $\beta$ 1a が BBB のバリア機能を増強させるという報告は複数あるものの、IFN- $\beta$ 1b に関する *in vitro* BBB モデルを用いた系での解析は報告されていない。本研究の一つ目の候補薬剤として IFN- $\beta$ 1b が BBB バリア機能に与える影響を検討した。

1) 山口大学大学院医学系研究科神経内科学

## 研究方法

解析対象として我々が樹立したヒト BBB 由来微小血管内皮細胞株の単層培養系を用いた。IFN- $\beta$ 1b を 2000IU/mL の濃度で 30 時間作用させ、電気抵抗 (TEER) および  $^{14}$ C イヌリンの透過性を測定した。培養液 (DMEM, 10%ウシ血清) のみで 30h インキュベートした群を対照群とした。また tight junction 構成蛋白の変化を調べる目的で免疫染色を施行した。加えて、IFN- $\beta$ 1b を 1000IU/mL, 10000IU/mL の濃度にて 30h 反応させた細胞株から total RNA を抽出し、tight junction 構成分子の発現が mRNA レベルで変化するかどうかを real time PCR にて解析した。

### (倫理面への配慮)

細胞株の樹立に際し、山口大学医学部倫理委員会による承認を得た後、組織提供者および家族に対し十分な説明の後、同意を得た上で組織を採取した。細胞株として樹立後も、サンプルの匿名化に配慮し、プライバシーの保護に万全を尽くした。

## 研究結果

IFN- $\beta$ 1b を反応させた群では対象群に比し、電気抵抗値は上昇する傾向にあったが、対照群に比し有意差は認められなかった。 $^{14}$ C-イヌリンの透過性でも IFN- $\beta$ 1b 群で透過性は減少したが統計学的有意差は認められなかった。免疫染色では claudin-5, occludin, ZO-1, ZO-2 の distribution や染色性は両群間で明らかな相違は認めなかった。IFN- $\beta$ 1b を 1000IU/mL の濃度で反応させた群は対照群に比し claudin-5,

occludin, ZO-1 の mRNA レベルは対照群に比し有意差は認めなかったものの、10000IU/mL で作用させた群では ZO-1 の発現量が対照群に比し有意に増加した。

## 考察

Kraus ら (Ann Neurol 2004;56:192-205) はウシ脳微小血管内皮初代培養細胞に IFN- $\beta$ 1a を 1000IU/mL の濃度で作用させたところ、イヌリンの透過性の減少とともに ZO-1 の内皮細胞間の cell-cell boundary での発現が増強することを免疫染色にて明らかにしている。今回の我々の検討では IFN- $\beta$ 1b は 2000IU/mL という濃度ではバリア機能を高めるという傍証は得られなかったが 10000IU/mL という濃度では ZO-1 の mRNA の発現が増加したため、高濃度では BBB のバリア機能を高める可能性がある。濃度設定や反応時間を変えたさらなる検討が必要である。また、1a, 1b を問わず IFN- $\beta$  の BBB のバリア機能を高める key molecule は ZO-1 である可能性が示唆され興味深い。

【結論】IFN- $\beta$ 1b は BBB 構成血管内皮細胞における ZO-1 の発現を増加させることでバリア機能に影響を及ぼしている可能性がある。

## 健康危険情報

なし

## 知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし



Blood-spinal cord barrier を構成するラット内皮細胞株の確立と  
NMO 患者由来血清の blood-spinal cord barrier に及ぼす影響についての検討

研究分担者 神田 隆<sup>1)</sup>

共同研究者 前田敏彦<sup>1)</sup>, 佐野泰照<sup>1)</sup>, 安部真彰<sup>1)</sup>,  
清水文崇<sup>1)</sup>, 柏村陽子<sup>1)</sup>, 寺崎哲也<sup>2)</sup>

### 研究要旨

視神経脊髄炎 Neuromyelitis optica (NMO) の主要病変部位である脊髄における微小血管系の病態に着目し、有用な解析ツールとなる脊髄微小血管内皮細胞の純培養株 (SCMEC) を樹立した。SCMEC は occludin, claudin-5, claudin-1 などの主要な tight junction 構成分子を発現し、p-glycoprotein も豊富に認められた。アストロサイト株との共培養により、occludin, claudin-5, p-glycoprotein の遺伝子・蛋白レベルでの発現増加を認め、SCMEC のバリア機能が強化された。NMO 患者の血清が、SCMEC のバリア機能やバリア構成分子に及ぼす影響について検討をしたところ、NMO 患者血清中に、内皮細胞の claudin-5 遺伝子発現を低下させ、バリア機能を低下させ得る何らかの液性因子の存在が示唆され、NMO 病変部の血液脊髄関門における初期病態の一角を担っている可能性が考えられた。

### 研究目的

視神経脊髄炎 Neuromyelitis optica (NMO) は視神経と脊髄が選択的に障害される中枢神経系炎症性疾患である。近年、NMO の患者血清中に、aquaporin 4(AQP4)を標的抗原とする IgG 型自己抗体が存在することが報告されて以降、本抗体によるアストロサイト障害を介した病態への直接的な関与が想定されている。しかし、抗 AQP4 抗体が血管側からどのようにバリアを超えて中枢神経側へと移行し、どのようなメカニズムでアストロサイトを障害し、疾患の発症に関わるのかは不明である。

今回われわれは、バリアを構成する微小血管系に着目し、NMO の主要病変部位である脊髄から、微小血管内皮細胞の純培養株を始めて樹立し、さらにアストロサイトとの共培養系を確立しバリア機能に及ぼすアストロサイトの影響について検討した。また、通常型 MS 患者や NMO 患者の血清が、内皮細胞に直接的に作用しバリア機能に影響し得るかについて in vitro 培養系での検討を行った。

### 研究方法

1) 5 週齢雄ラットより脊髄微小血管由来内皮細胞 (spinal cord microvascular endothelial cells: SCMEC) の一次培養を行ったのち、温度感受性 SV40 ラージ T 抗原 (tsA58) をレトロウイルスを用いて導入した。内皮細胞群を

1) 山口大学大学院医学系研究科神経内科学  
2) 東北大学大学院薬学系研究科

cloning し characterization を行った。

2) cell culture insert chamber を用いて、SCMEC とラットアストロサイト不死化細胞株との共培養系を確立し、内皮細胞のバリア機能に対するアストロサイトの影響を検討した。

3) 健康成人、通常型 MS 患者及び、抗 AQP-4 抗体陽性 NMO/OSMS 患者 (いずれも再発期) 由来の血清を 10% 含んだ DMEM 培地を用いて、SCMEC の単層培養を 24 時間行った後に、バリア機能の指標である trans-endothelial electrical resistance (TEER) 及び、claudin-5 mRNA の発現について real time PCR を用いて比較検討した。

#### 研究結果 及び 考察

1) SCMEC は中枢神経系バリア構成内皮の特徴とされる spindle fiber shaped morphology を示し、von Willebrand factor の発現及び、DiI-Ac-LDL の取り込みを認めた。33°C の温度条件にて約 48 時間の doubling time で増殖し、37°C の温度条件にて増殖が停止すると共に高い TEER を示した。occludin, claudin-5, claudin-1 などの主要な tight junction 構成分子が発現し、中枢神経に特徴的な各種トランスポーターも認められる有用なバリア構成内皮細胞株が得られた。

2) アストロサイト株との共培養により、TEER の有意な上昇と、occludin, claudin-5, p-glycoprotein の遺伝子・蛋白レベルでの発現増加を認め、SCMEC のバリア機能が強化されることが明らかになった。内皮細胞のバリア機能維持にはアストロサイト由来因子が必要であり、NMO 病巣におけるアストロサイトの

障害に伴い、バリア機能が低下する可能性が示された。

3) 健康成人由来血清及び、通常型 MS 患者由来の血清を添加した培養条件では、SCMEC の claudin-5 mRNA の発現量に有意な違いはなかったが、NMO 患者由来血清を含んだ培養条件により、claudin-5 mRNA 発現量が低下した。3 群間での TEER 値に有意な差はみられなかったが、claudin-5 mRNA 量と TEER 値との高い相関を認め、NMO 患者血清中の何らかの因子が、内皮細胞の claudin-5 遺伝子発現を低下させ、バリア機能を低下させる可能性が示唆された。この病態が、NMO 病変部において、抗 AQP-4 抗体の血管側から中枢神経側への移行に、どのように関与するかについて今後の検討が必要である。

#### 結論

1) ラット脊髄微小血管より血液脊髄関門の首座である内皮細胞の純培養株を樹立した。

2) アストロサイト株との共培養により、TEER の有意な上昇と、occludin, claudin-5, p-glycoprotein の遺伝子・蛋白レベルでの発現増加を認め、内皮細胞のバリア機能が強化された。

3) NMO 患者血清は、内皮細胞の claudin-5 遺伝子の発現を低下させ、バリア機能を低下させる作用を有することが示唆された。

#### 健康危険情報

なし

#### 知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし

## 免疫吸着 (TR-350) 療法は自己抗体の IgG サブクラスにより除去能が異なる

班 員 埼玉医科大学 総合医療センター 神経内科 野村 恭一  
共同研究者 埼玉医科大学 総合医療センター 神経内科 王子 聡  
久保田 昭洋, 田島 孝士, 伊崎 祥子, 井口 貴子  
埼玉医科大学 総合医療センター 人工腎臓部  
金山 由紀, 小川 智也, 松田 昭彦, 松村 治

【要 旨】 Neuromyelitis Optica (NMO), 多発性硬化症 (MS), ギラン・バレー症候群 (GBS), 重症筋無力症 (MG) をはじめとする免疫性神経疾患では, その病態の形成・進展に自己抗体を含む病因物質が大きく関与する。これらの神経自己抗体の多くは IgG 分画に属し, さらに個々の自己抗体は抗 AQP4 抗体 (aquaporin 4) は IgG 1, 抗 GQ1b 抗体は IgG 3, 抗 Ach-R 抗体 (acetylcholin receptor) は IgG 3, 抗 MuSK 抗体 (muscle specific tyrosine kinase) は IgG 4 など特異的な IgG サブクラス (IgGs) に分けられる。

アフェレシス療法は自己抗体を含む病因物質を急速に除去し, 疾患の急性期からの速やかな脱却が待たれるが, 免疫吸着療法 (IAPP: immuno adsorption plasmapheresis) の施行に際して, 血漿中ブラジキニンに代表されるように, 一度吸着された物質が血漿処理量 (PV: plasma volume) の増加に従い, 脱着・解離を来たす場合がある。現時点において IAPP の血漿処理量 PV と施行回数は明確には規定されておらず, またその有効性に関して seropositive MG (IgG 1,3) では高い有効性を示す一方, seronegative MG (IgG 4) に対する IAPP は無効とされるなど, 自己抗体が属する IgGs により IAPP の有効率が異なる可能性が指摘された。

### 1. 目 的

各種免疫性神経疾患に対するアフェレシス療法は自己抗体を含む病因物質を急速に除去し, 疾患の急性期からの速やかな脱却が期待されるが, 免疫吸着療法 (IAPP: immuno adsorption plasmapheresis) の施行に際して, 血漿中ブラジキニンに代表されるように, 一度吸着された物質が血漿処理量 (PV: plasma volume) の増加に従い, 脱着・解離を来たす場合がある。

現時点において IAPP の血漿処理量 PV と施行回数に関しては明確には規定されておらず, またその有効性に関して seropositive MG (IgG 1,3) では高い有効性を示す。一方, seronegative MG (IgG 4) に対する IAPP は無効とされるなど, 個々の自己抗体が属する IgGs により, IAPP の有効率が異なる可能性が指摘されている。

今回我々は, IAPP 有効性の差異に関して PV と IgGs 脱着の可能性に着目し, 各種免疫性神経疾患に対する IAPP の各 PV における IgGs (IgG 1, 2, 3, 4) の吸着率を測定し, PV と IgGs の吸着率との関係から至適 PV, 施行回数について検討した。

〒 350-8550 埼玉県川越市鶴田辻道町 1981

埼玉医科大学総合医療センター 神経内科

## 2. 対象・方法

対象は抗 Ach-R 抗体陽性 MG に対する IAPP 2 回, 抗 MuSK 抗体陽性 MG 1 回, 抗 AQP4 抗体陽性脊髄炎 1 回の合計 4 回とした。IAPP は血漿分離器 Plasmaflo (OP-05W, 旭化成クラレメディカル), 吸着カラム Immusorba-TR (TR-350, 旭化成クラレメディカル) を用い, 1 回の PV は 2,000ml を目標とし, PV 500ml 毎における各々の IgGs についての吸着率を検討した。IgGs は nephelometry 法を用いて測定した。

倫理的配慮として IAPP 施行にあたり全施行例において十分な説明を行い, 文書による同意を得て施行した。

## 3. 結果

各 PV において IgG 1,2,3,4 の吸着率はそれぞれ血漿処理量 PV 500ml (n=4) では, 98.3±0.4%, 97.1±1.1%, 70.0±28.1%, 63.8±29.6% であり, 以下 PV 1,000ml (n=4) では, 46.0±13.5%, -3.1±6.0%, 58.2±34.4%, -15.8±12.7%。PV 1,500ml (n=3) では, 17.1±10.7%, -6.3±4.3%, 58.8±18.7%, -9.6±9.4%。PV 2,000ml (n=3) では, 2.0±6.6%, -7.9±4.5%, 47.1±15.6%, -4.8±5.3% であった (table 1)。

table 1 : the result of IAPP adsorption rate in each plasma volume.

	PV 500ml (n=4)	PV 1,000ml (n=4)	PV 1,500ml (n=3)	PV 2,000ml (n=3)
IgG1	98.3±0.4	46.0±13.5	17.1±10.7	2.0±6.6
IgG2	97.1±1.1	3.1±6.0	-6.3±4.3	-7.9±4.5
IgG3	70.0±28.1	58.2±34.4	58.8±18.7	47.1±15.6
IgG4	63.8±29.6	-15.8±12.7	-9.6±9.4	-4.8±5.3

## 4. 考察

上記結果より, IgG 3 は少なくとも PV 2,000ml までは吸着・除去されるが, IgG 1, IgG 4 はそれぞれ PV 2,000ml, 1,000ml で脱着・解離を来し, 生体内へ返送される可能性が考えられた。IAPP 施行に際して, 各疾患の自己抗体が属する IgGs により PV を設定する必要性が考えられた (Fig. 1)。トリプトファンカラム (TR-350) による 1 回の IAPP では IgG3 は 53.7% 吸着除去される (Fig. 2)。そのため seropositive MG のように IgG3 が関与する疾患に対する IAPP は, 少なくとも 2,000ml の血漿処理量で 3 回以上, 施行する必要性が考えられた (Fig. 2)。

## 5. 学術的・国際的・社会的意義

### 6. 今後の展望

免疫性神経疾患に対するアフエリス療法は疾患の急性期からの脱却や薬剤治療抵抗性を示す症例に対して有効であるが, 現時点ではアフエリス療法施行に際して, 1 回の血漿処理量・試行回数に明確な規定はなく, 多くの施設では一回の血漿処理量は 2,000ml, 施行回数は 2-3 回程度で施行されている。また有効性に関して seropositive MG (IgG1,3) では高い有効性を示す一方, seronegative MG (IgG 4) に対する IAPP は無効とされるなど, 各々の自己抗体が属する IgGs により, IAPP の有効