

## Neuromyelitis optica (NMO)患者血清が血液脳関門に及ぼす影響の解析

分担研究者 神田 隆<sup>1)</sup>

共同研究者 ○清水文崇<sup>1)</sup>, 佐野泰照<sup>1)</sup>, 藤澤美和子<sup>1)</sup>, 柏村陽子<sup>1)</sup>, 春木明代<sup>1)</sup>, 高橋利幸<sup>2)</sup>

### 研究要旨

【目的】視神経脊髄炎(Neuromyelitis optica, NMO)では BBB の破綻が生じるが, その機序については明快な解答が得られていない. 抗 AQP4 抗体以外の血中成分である VEGF に代表される炎症性サイトカイン, あるいは内皮細胞を直接的に攻撃する自己抗体などが BBB 破綻因子の有力な候補として想定される. 【対象・方法】ヒト脳由来微小血管内皮細胞株(TY09)を用い, 抗 AQP4 抗体陽性を確認した急性期 NMO 15 例の血清を作用させた. (1)患者血清を作用させ TY09 の tight junction 関連分子(claudin-5)の発現の変化を解析した. (2)抗 VEGF 中和抗体を NMO 患者血清に併せて TY09 に作用させ claudin-5 の発現の変化を解析した. (3)TY09より抽出した蛋白を電気泳動しウェスタンブロット法を用い NMO 患者血清を反応させ抗脳微小血管内皮抗体が存在するかを検討した. 【結果】(1)NMO 患者血清を用いた培養では TY09 の claudin-5 の発現が低下した. (2)NMO 患者例で抗 VEGF ならびに抗 IL-17 中和抗体を作用させると claudin-5 の発現増加が確認された. (3)NMO 患者血清 10 例で抗脳微小血管内皮抗体が検出された. 【結論】NMO 患者血清に含まれる抗脳微小血管内皮抗体, ならびに VEGF, IL-17 が BBB を破綻させる可能性が考えられた.

### 【研究目的】

視神経脊髄炎(Neuromyelitis optica, NMO)では患者血清中に抗アクアポリン 4(AQP4)抗体が存在し, 血液脳関門(blood-brain barrier: BBB)の破綻を介して中枢神経内へ侵入した同抗体によるアストロサイトの傷害が病因の中核をなすものと考えられている. しかし, 本症での BBB の破綻機序については明快な解答が得られていない. 流血と接する唯一の BBB 構成細胞である脳微小血管構成内皮細胞には AQP4 は発現しないことから, 抗 AQP4 抗体以外の血中成分の BBB 破綻への関与が考えられ, VEGF に代表される炎症性サイトカイン, あるいは内皮細胞を直接的に攻撃する自己抗体などが BBB 破綻因子の有力な候補として想定される.

本研究では(1)NMO 患者血清が実際にバリアー

1) 山口大学大学院医学系研究科神経内科学

2) 国立病院機構米沢病院神経内科

機能を破綻させているか否かを検証し, 続いて(2)患者血清中に含まれている VEGF, IL-17 などのサイトカインがバリアー破綻に関与しているか, (3)NMO 患者血清中に BBB 構成内皮細胞に対する自己抗体が存在するか, の 3 点につき, 我々の樹立したヒト脳由来微小血管内皮細胞株を用いた検討を行った.

### 【研究方法】

対象として当院で診断加療し抗 AQP4 抗体陽性を確認した急性期 NMO 14 例, 急性期通常型多発性硬化症(C-MS) 7 例, ならびに正常コントロールとして健常成人 12 例の血清を用いた. NMO 患者, および C-MS 患者の血清は治療前のものを用いた.

(実験 1)ヒト脳由来微小血管内皮細胞(TY09)に NMO 患者血清, C-MS 患者血清, ならびに正常コントロール血清を作用させ TY09 の tight

junction 関連分子(claudin-5,occludin)の発現の変化を western blot 法を用い比較解析した。

(実験 2)VEGF, TGF- $\beta$ , IL-6, IL-17, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  に対する中和抗体を NMO 患者血清に併せて TY09 に作用させ tight junction 関連分子 (claudin-5, occludin)の発現の変化を real time PCR 法で解析した。

(実験 3)NMO 患者血清中ならび C-MS 患者血清中にヒト脳微小血管内皮に反応する自己抗体、すなわち抗脳微小血管内皮細胞抗体が存在するかを証明するために、TY09 より抽出した蛋白を電気泳動しウェスタンブロット法を用い患者血清を反応させ解析した。

(倫理面への配慮)

血清の採取に当たり、山口大学医学部倫理委員会による承認を得た後研究への協力を文書で説明し同意を得た。個人が特定できないように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】

(実験 1)健常成人と C-MS 患者血清を用いた培養では TY09 の claudin-5, occludin の発現に有意な変化が無かったが、NMO 患者血清を用いた培養では claudin-5, occludin の発現が低下した(図 1)。

(実験 2)NMO 患者例で患者血清に抗 VEGF 中和抗体および抗 IL-17 中和抗体を作用させると claudin-5, occludin の発現増加が確認された。NMO 患者血清に含まれる VEGF, IL-17 が tight

junction の破綻に関与している可能性が考えられた。

(実験 3)NMO 患者血清 10 例で健常成人では検出されない抗脳微小血管内皮細胞抗体が検出された。

#### 【考察】

NMO 患者血清が tight junction 関連分子の発現を低下させていることより、NMO 患者血清中の何らかの因子が BBB のバリアー機能を低下させていることが明らかとなった。また、NMO 患者血清中に存在する VEGF や IL-17 が内皮細胞のバリアー機能を低下させている可能性が示された。更に、NMO 患者血清にはヒト脳微小血管内皮細胞の蛋白に反応する自己抗体、すなわち抗脳微小血管内皮細胞抗体が存在することが明らかとなった。今後、この自己抗体が標的とする蛋白を細胞組織学的検討及びプロテオーム解析を用いて同定する予定である。

#### 【結論】

NMO 患者血清が BBB のバリアー機能を低下させることが示された。BBB のバリアー機能を破綻させる機序として、VEGF, IL-17 ならびに抗脳微小血管内皮細胞抗体の関与が想定された。

#### 健康危険情報

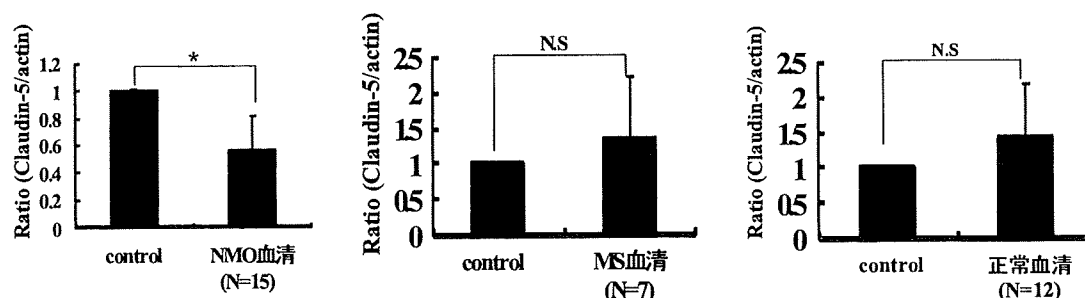
なし

#### 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

図 1 NMO 患者血清を作用させると TY09 の claudin-5 の発現が低下する



## Aquaporin 4 autoimmunity

研究分担者 糸山泰人<sup>1</sup>

共同研究者 三須建郎<sup>1</sup>、高野里奈<sup>1</sup>、西山修平<sup>1</sup>、高橋利幸<sup>1</sup>、中島一郎<sup>1</sup>、柿田明美<sup>2</sup>、高橋均<sup>2</sup>、藤原一男<sup>1</sup>、

1) 東北大学 神経内科・多発性硬化症治療学

2) 新潟大脳研究所脳疾患リソース解析部門・病理学

### 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 vivo や in vitro の検討で、AQP4抗体によりアストロサイト障害が起こりうることが既に報告されているが、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、急性期NMO、MS、対象群における髄液中のアストロサイト関連蛋白(GFAP、S100B)や髄鞘・軸索の蛋白を検討し、NMOでは他群と比較してGFAPが極めて有意に高く、症状や病変の長さ強く相関することを報告したが、髄鞘や軸索関連マーカーには有意差は認められなかった。一次培養系の検討により、AQP4抗体は補体介在性にアストロサイトの細胞死を誘導するが、補体を非動化した血清でも細胞形態が変化して足突起の縮小や接着能の低下が起こる事が示唆された。AQP4抗体による自己免疫性病態は、補体介在性・非介在性に生じるアストロサイトの機能障害や細胞死を介した病態であると推察され、今後の治療方針を考える上で興味深い結果と思われた。

### 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の炎症性疾患である。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高発現するアクアポリン4(AQP4)であることが報告された(1)。我々は、NMO病巣の免疫組織学的検討により、AQP4の脱落とともにグリア線維性酸性蛋白(GFAP)の脱落を伴う事を報告した。一方、急性期病巣では

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(2)。NMO患者から抽出したIgGは、髄鞘特異的T細胞を移入した実験的脳脊髄炎ラットに腹腔内注射することで、補体介在性にAQP4の脱落病変を呈し重症化させることから、病原性を有する抗体であることが判明している(3)。しかし、抗AQP4抗体がどのようにヒトアストロサイトに作用するのか、臨床的にアストロサイト障害がどの程度NMOの病態を反映し脱髄や壊死に関わるのかは不明である。

1) 東北大学神経内科

2) 東北大学多発性硬化症治療学

### 研究方法

<アストロサイトに対するAQP4抗体の作用>

一次培養ヒトアストロサイトに、AQP4 抗体陽性 NMO 患者から抽出した IgG や補体を添加し、免疫組織学的変化・細胞障害を検討する。

#### < 髄液アストロサイト障害マーカーの検討 >

急性期の NMO 群(n=33)、MS 群 9 位(n=27)、ADEM (n=6)、Behcet (n=5)、髄膜炎(n=9)、正常対照群(n=12)における、髄液中の GFAP・S100B・MBP・Neurofilament-H (NF-H) を、ELISA 法を用いて測定し、各群間比較や臨床・画像・髄液所見や重症度 (EDSS) との相関関係を検討した。NMO8 例では治療前後でも比較した。

#### 研究結果

1. 一次培養アストロサイトの培養液中に精製 AQP4 抗体を添加すると、アストロサイトの足突起が縮小した。AQP4 は、AQP4 抗体のみによって細胞膜上から発現が低下することが判明した。AQP4 抗体添加後、更に補体を添加すると、細胞質と核は膨化し、一部の細胞は膨化後に破裂した。補体添加後、殆どは Propidium Iodide 陽性であった。これらの所見は、AQP4 抗体陰性 IgG や非動化補体では認められなかった。
2. NMO における髄液中 GFAP 濃度 ( $2476 \pm 8815$  ng/ml) は、MS ( $0.8 \pm 0.4$  ng/ml)、正常対照 ( $0.7 \pm 0.5$  ng/ml) と比較して有意に極めて高く、ADEM ( $14.1 \pm 27.4$  ng/ml) と比較しても高かった。S100B も同様の傾向であったが、GFAP と比較して軽度であった。一方、MBP や NF-H は有意な差が認められなかった。急性期の髄液 GFAP の増加は、治療により急速に正常化するが、髄液 MBP の増加は GFAP と比較して遷延した。髄液 GFAP 濃度は、重症度 EDSS や脊髄病変長と正の強い相関が認められたほか、6 ヶ月

後の EDSS とも相関が認められた。

#### 考察

我々は NMO の急性期に病理学的に AQP4 や GFAP が脱落することを報告しているが(2)、今回の検討により、ある程度髄液中 GFAP の濃度を検討する事により、NMO の病態を臨床的に評価できる事を明らかにした。アストロサイトの脱落は、髄鞘の脱落と比較して非常に高度であることが示唆され、脱髄から組織壊死に至る病態を考える上で興味深い結果である。In vitro の系での検討では、アクアポリン 4 抗体は、抗体自体のみでアストロサイト膜上のアクアポリン 4 を変性させるが効果は可逆的であるのに対して、補体を加える事で不可逆的な細胞死を遂げる。アクアポリン 4 抗体・補体を介在する機能障害・細胞障害が関連すると推察され、液性因子の制御が治療戦略上も重要であると考えられた。

#### 結論

疾患概念上、NMO はアストロサイトの広範な障害を特徴とするアストロサイトパチーであり、その臨床的な病態の把握には髄液中 GFAP が有効であると考えられた。

#### 引用文献

1. Lennon VA, et al. JEM 2005; 202: 473-7.
2. Misu T, et al. Brain. 2007;130:1224-1234.
3. Bradl M, et al. Ann Neurol 2009;66:630-43.

#### 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

# Aquaporin4 の細胞内局在解析

研究分担者 武藤多津郎<sup>1)</sup>

共同研究者 朝倉邦彦<sup>1)</sup>, 植田晃広<sup>1)</sup>, 三原貴照<sup>1)</sup>, 伊藤信二<sup>1)</sup>

## 研究要旨

視神経脊髄炎 (NMO) 患者血清中に存在する NMO-IgG 抗体の標的となる aquaporin4 (AQP4) の 2 つの isoform、AQP4M1 と AQP4M23 の細胞内局在を検討した。C 末端に EGFP のついた AQP4M1 を発現する細胞と、C 末端に EGFP をつけた AQP4M23 を発現する細胞を得た。各々の細胞を lipid rafts マーカーで染色したところ、AQP4M1 は lipid rafts マーカーと共存し、AQP4M23 は lipid rafts マーカーとは共存しなかった。AQP4M1 発現細胞から lipid rafts 画分を調製し、Western blotting によりその局在を検討したところ、lipid rafts 画分に AQP4M1 が認められ、AQP4M1 分子は lipid rafts 画分に存在することが示唆された。一方、AQP4M23 は、lipid rafts に存在しないことが示唆された。また、これらの細胞に NMO 患者血清を加えた実験から、NMO 患者血清は細胞表面に発現させた isoform 単独では細胞に影響を及ぼさず、2 つの isoform が同時に発現することが NMO-IgG 抗体による病態発現には重要であると考えられた。

## 研究目的

2004 年 Lennon らにより視神経・脊髄を侵す視神経脊髄炎(NMO)患者血清中に中枢神経系抗原と反応する抗体(NMO-IgG 抗体)が存在することが報告され、水チャンネルとして脳内、とくにアストロサイト足突起に広く分布する aquaporin4(AQP4)がその抗原であることが示された。抗 AQP4 抗体は、NMO の診断のマーカーとして注目されているが、その病態への関与について詳細はいまだ不明である。

AQP4 は 323 個のアミノ酸からなる AQP4M1 と N 末端が 22 個短い 301 個のアミノ酸からなる AQP4M23 の 2 種類の AQP4 分子が存在し、生体内では AQP4 は AQP4M1 2 分子と AQP4M23 2

分子が heterotetramer の状態で存在する。最近の AQP4 発現系における検討では、AQP4M1 N 末端のシステイン残基部分がパルミトイル化されることが示され、AQP4 と lipid rafts との関連が示唆されている。今回、AQP4M1 と AQP4M23 の発現ベクターを作製し、細胞内における局在を検討した。

## 研究方法

ヒト AQP4 の全長 cDNA を ATCC より入手し、PCR 法により、AQP4M1 と AQP4M23 の 2 種類の cDNA の 5' 末端に Kozak 配列を挿入した後、蛍光色素 (EGFP) を組み込んだ発現ベクター pEGFP-N1 に挿入した。これらの発現ベクターを lipofection 法により、PC12、CHO-K1、L929、BHK-21 などの細胞株に transfection し、それぞれ

<sup>1)</sup> 藤田保健衛生大学脳神経内科学講座

れの AQP4 分子を発現させた transient transformant、stable transformant を作製した。

これらの transfection した細胞に非働化した NMO 患者血清を 2%濃度で添加し、細胞の形態変化を観察した。また、transfection した細胞を、lipid rafts のマーカーで蛍光染色し、異なる蛍光を観察することにより、AQP4 の細胞内局在を検討した。さらに、stable transformant を界面活性剤で処理した後、sucrose gradient による超遠心法で lipid rafts 画分を分離し、Western blotting により AQP4 の局在を検討した。

## 研究結果

AQP4M1 の C 末端に EGFP をつけたプラスミドを transfection した PC12 細胞と、AQP4M23 の C 末端に EGFP をつけたプラスミドを transfection した BHK-21 細胞で stable transformant を得ることができた。AQP4M1 を強発現している PC12 細胞を lipid rafts のマーカーである NGF 受容体 (Trk) を Cy3 標識の 2 次抗体で染色したところ、AQP4M1 と Trk はまったく同じ染色パターンを示し、NGF 刺激により突起伸展させた場合も同じ染色パターンを示した。一方 AQP4M23 を強発現した BHK-21 細胞では、lipid rafts のマーカーである caveolin を Cy3 標識の 2 次抗体で染色したところ、AQP4M23 と caveolin は異なる染色パターンを示した。

また、AQP4M1 の stable transformant を用いて sucrose gradient による超遠心法で lipid rafts 画分を精製し、AQP4M1 の局在を Western blotting により検討したところ、lipid rafts 画分に抗 AQP4 抗体で認識される AQP4M1 (EGFP との融合蛋白) が認められた。

さらに、これらの stable transformant に NMO 患者血清を 2%濃度で反応させ経時的に位相差顕微鏡で観察したが、AQP4M1、AQP4M23 を強発現させたいずれの細胞でも、細胞の形態変化は認められなかった。

## 考察

蛍光色素との融合蛋白として発現させた AQP4M1 分子は、蛍光染色および Western blotting 法により lipid rafts 画分に存在することが示唆された。一方、パルミトイル化される可能性のある N 末端 13 番目と 17 番目のシステイン残基を持たない AQP4M23 は、AQP4M1 と異なり、lipid rafts には存在しないことが示唆された。

また、NMO 患者血清は細胞表面に発現させた isoform 単独では、細胞に影響を及ぼさず、AQP4M1 と AQP4M23 の 2 つの分子が同時に発現することが NMO-IgG 抗体による病態発現には重要であることが示唆された。

## 結論

AQP4M1 分子は、lipid rafts 画分に存在することが示唆された一方、AQP4 のもう 1 つの isoform である AQP4M23 は、AQP4M1 と異なり、lipid rafts には存在しないことが示唆された。

また、NMO 患者血清は細胞表面の AQP4 isoform 単独では、細胞に影響を及ぼさず、AQP4M1 と AQP4M23 の 2 つの分子が同時に発現することが病態発現には重要であることが示唆された。

## 健康危険情報

なし

## 自己免疫性脱髄疾患 (EAE) における aquaporin-4 に関する検討

研究分担者 高 昌星<sup>1)</sup>

共同研究者 柳澤 智<sup>1)</sup>、 武市尚也<sup>1)</sup>、 兼山友樹<sup>1)</sup>

### 研究要旨

最近、視束脊髄炎(NMO)の患者血清中に aquaporin-4 (AQP-4)に対する抗体が発見されたことにより、AQP-4 の役割が注目されている。myelin basic protein (MBP)を感作したラットは多発性硬化症 (MS)の動物実験モデルの一つであり、中枢神経系に強い浮腫を引き起こすことが既に知られており、水チャンネルである AQP-4 の関与が疑われる。今回我々は MBP 感作ラット EAE において発症前 (8 日)、重症期(13 日)、完治期(18 日)の脊髄・下部脳における AQP-4・GFAP の発現量の変化を検討した。AQP-4 は mRNA・protein レベルともに脊髄・下部脳において重症期にコントロールと比較して有意に減少し(p<0.05)、EAE の回復期に mRNA・protein レベルともに脊髄・下部脳において増加・回復することが明らかとなった。GFAP の protein レベルは重症期・回復期と進むにつれ脊髄・下部脳において増加することが明らかとなった。MBP 感作による EAE ラットの脊髄・下部脳において AQP-4 と GFAP の発現量に変動があることが明らかとなり、MBP 感作 EAE ラットにおいて AQP-4 が発症に関与している可能性が示唆された。

### 研究目的

最近、視束脊髄炎(NMO)の患者血清中に NMO-IgG が存在することが発見され、それが aquaporin-4 (AQP-4)に対する抗体であることが明らかになった。NMO 患者における特徴的病理所見として AQP-4 の消失が報告されており、抗 AQP-4 抗体の有無、または AQP-4 の発現量が NMO もしくは多発性硬化症 (MS)における病態に深く関与している可能性が示唆されている。MS の動物モデルでは、myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)を感作したマウス実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)において、EAE の発症により

1) 信州大学医学部

AQP-4 が脊髄・脳において共に増加したとの

報告はされているが、他の MS の動物実験モデルにおいては十分な検討がされていない。myelin basic protein (MBP)を感作したラットは MS の動物実験モデルの一つであり、中枢神経系に強い浮腫を引き起こすことが既に知られており、水チャンネルである AQP-4 の関与が疑われる。今回、我々は MS の動物実験モデルの一つである、MBP を感作したラット EAE を用いて、脊髄・下部脳における AQP-4 の量的変動を検討した。

### 研究方法

Guinea pig myelin basic protein (GPMBP) とフロイントの完全アジュバンドを等量混ぜエマルジョンを作製し、Lewis

ラット雌 9 週齢の両足足蹠に 200  $\mu$ l 匹投与した。MBP を感作した EAE ラットの臨床症状に応じて発症前 (8 日)、重症期 (13 日)、完治期 (18 日) の 3 時期で脊髄・下部脳を取り出した (Fig.1)。各時期における AQP-4 の発現量を real-time-PCR 法、western blot 法、免疫染色法で測定した。また、同時期の GFAP の発現を western blot 法、免疫染色法で測定した。脳・脊髄における AQP-4 の局在を共焦点レーザー顕微鏡により解析した。

### 研究結果

MBP 感作 EAE ラットにおいて、AQP-4 は下部脳・脊髄において、血管の周囲に強く発現していることが確認された。AQP-4 の mRNA レベルは、EAE の重症期において脊髄・下部脳ともにコントロール (PBS+アジュバンド感作) と比較して有意に減少した ( $p < 0.01$ )。また、完治期は脊髄・脳ともに重症期と比較して AQP-4 の mRNA は有意に増加・回復した (脊髄:  $p < 0.01$ , 下部脳:  $p < 0.05$ ) (Fig.2)。Western blot 法による AQP-4 の半定量の結果においても、同様に脊髄・下部脳において重症期はコントロールと比較して有意に AQP-4 発現量は有意に低下していた (脊髄:  $p < 0.01$ , 下部脳:  $p < 0.05$ ) (Fig.3)。完治期では重症期と比較して、脊髄・下部脳において共に増加・回復する傾向がみられた (Fig.3)。免疫染色では、重症期の脊髄において AQP-4 の消失が細胞浸潤の強い部分でみられた。一方、アストロサイトのマーカーで

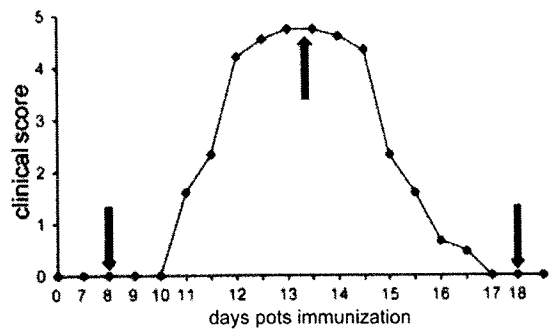


Fig.1 clinical course

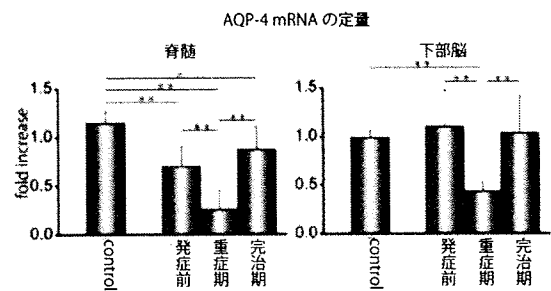


Fig.2 AQP-4 mRNA の定量

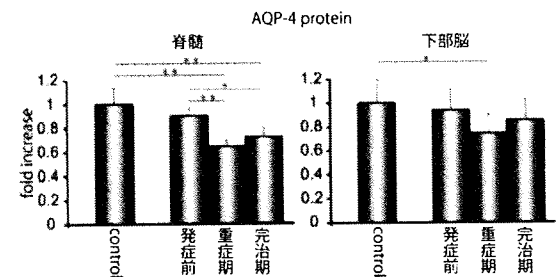


Fig.3 AQP-4 protein の定量

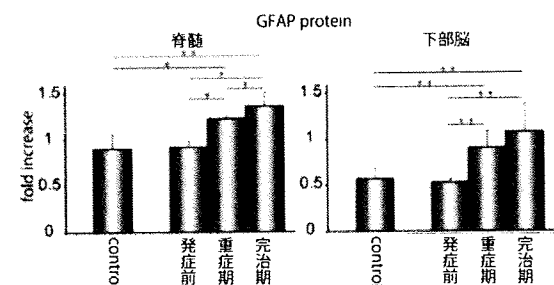


Fig.4 GFAP mRNA の定量



ある GFAP の発現は、脊髄・下部脳において重症期・完治期と経過するにつれ増加することが認められた (Fig.4)。

### 考察

今回の研究により、MS の動物実験モデルとされている MBP を用いた EAE ラットにおいて、AQP-4 は EAE 発症により減少し、EAE の回復と共に増加・回復することが明らかとなった。またアストロサイトのマーカーである GFAP は EAE 発症により増加することが明らかとなった。MBP を感作した EAE ラットは中枢神経系に強い浮腫を引き起こすことから、AQP-4 の変動が浮腫の増悪・回復に関与している可能性が示唆される。

### 結論

MBP 感作ラット EAE において AQP-4 の発現量が変化することが明らかとなった。AQP-4 が EAE の病態に深く関与している可能性が示唆される。今後さらに、MBP-EAE の発症における AQP-4 の役割について、詳細に研究する必要がある。

### 文献

Ahn, M., Jin, J-K, Moon, C., Matsumoto, Y., Sung Koh, C., Shin, T. Glial cell line-derived neurotrophic factor is expressed by inflammatory in the sciatic nerves of Lewis rats with experimental autoimmune neuritis. *Brain Res.* 1102, 86-91.

Kim, H., Moon, C., Ahn, M., Byun, J., Lee, Y., Kim, M.D., Matsumoto, Y., Koh, C.S., Shin, T., 2009. Heat shock protein 27 upregulation and phosphorylation in rat experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res.* 1304, 155-63.

Misu, T., Fujihara, K., Nakamura, M., Murakami, K., Endo, M., Konno, H., Itoyama, Y., 2006. Loss of aquaporin-4 in active perivascular lesions in neuromyelitis optica: a case report. *Tohoku J Exp Med.* 209, 269-75.

Misu, T., Fujihara, K., Kakita, A., Konno, H., Nakamura, M., Watanabe, S., Takahashi, T., Nakashima, I., Takahashi, H., Itoyama, Y., 2007. Loss of aquaporin 4 in lesions of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Brain.* 130, 1224-34.

Miyamoto, K., Nagaosa, N., Motoyama, M., Kataoka, K., Kusunoki, S., 2009. Upregulation of water channel aquaporin-4 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurol Sci.* 276, 103-7.

Nakayama, K., Nagase, H., Hiratochi, M., Koh, C.S., Ohkawara, T., 2009. Do similar mechanisms regulated by g-secretase play a potential role in

- signaling events involving type 1 transmembrane proteins including Notch, Delta and APP?. Res Adv in Nucleic Acids Res. 3, 55-69.
- Nesic, O., Lee, J., Ye, Z., Unabia, G.C., Rafati, D., Hulsebosch, C.E., Perez-Polo, J.R., 2006. Acute and chronic changes in aquaporin 4 expression after spinal cord injury. Neuroscience. 143, 779-92.
- Saadoun, S., Papadopoulos, M.C., 2009. Aquaporin-4 in brain and spinal cord oedema. Neuroscience.
- Sekiguchi, Y., Ichikawa, M., Takamoto, M., Ota, H., Koh, C.S., Muramatsu, M., Honjo, T., Agematsu, K., 2009. Antibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein are not involved in the severity of chronic non-remitting experimental autoimmune encephalomyelitis. Immunol Lett. 122, 145-9.
- Yanagisawa, S., Takeichi, N., Kaneyama, T., Yagita, H., Taniguchi, S., Kim, B.S., Koh, C.S., Effects of anti-CD70 mAb on Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced demyelinating disease. Brain Res.
- 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

## NMO 患者 IgG のラットへの passive transfer

研究分担者 松尾秀徳<sup>1)</sup>

共同研究者 中根俊成<sup>1)</sup>, 内藤慎二<sup>2)</sup>, 本村政勝<sup>3)</sup>, 福田 卓<sup>3)</sup>

### 研究要旨

視神経脊髄炎は多発性硬化症とその発症機序において異なる疾患単位であることが明らかになりつつある。これは両者の治療という面から見ても、病態の相違点を明確にすることは臨床的意義が高い。視神経脊髄炎の病態で key role を果たしているのは抗アクアポリン4抗体であり、これによって免疫反応が惹起され、中枢神経系に病変を生じている可能性が報告されている。今回、われわれはこの抗アクアポリン4抗体陽性の視神経脊髄炎患者血清より IgG を精製し、ラットに passive transfer することによって疾患モデルが作製できるかを試みた。結果としては、単純な IgG の passive transfer ではラットは神経症状を呈さず、病理学的な変化も認めなかった。したがって、抗アクアポリン4抗体の病原性を確認するためには実験系を modify する必要があると考察した。

### 【目的】

近年、視神経脊髄炎 (NMO) の病態が抗アクアポリン4 (AQP4) 抗体の役割を中心に解明されようとしている。しかしそのメカニズムはいまだ完全に明らかではない。今回、われわれは抗 AQP4 抗体陽性の NMO 患者血清を用いることによって NMO の動物モデルを作製することを試みた。この NMO 患者 IgG を移送することによって神経症状を発症するか検証を行った。

### 【対象・方法】

1) Lewis ラット (6-8 週齢, 雌) の足底部にフロイント完全アジュバント (CFA を投与

後、百日咳菌毒素 (PTX) を腹腔内に2回 (同時および 48 時間後) 注射し、その5日後に血液脳関門 (BBB) の破壊を確認する目的で Evans' Blue を腹腔内に注射した。血液脳関門 (BBB) の破壊を確認する目的で Evans' Blue を腹腔内に注射した。

2) 上記と同様に Lewis ラット (6-8 週齢, 雌) の足底部に CFA を注射し、PTX を腹腔内に2回 (同時および 48 時間後) 投与した。さらに PTX 初回注射より5日後および6日後に IgG 各 40mg (計 80mg) の passive transfer (腹腔内注射) を行った。

用いた IgG は健常ヒト血清 IgG および NMO 患者血清より精製した抗 AQP4 抗体陽性 IgG で、それぞれの群で passive transfer 後より EAE スコアの評価と体重測定を行い、比較した。

3) Passive transfer 後 10 日に両群のラットをパラホルムアルデヒドで灌流固定し、脳および脊髄の病理学的変化 (H. E. 染色, GFAP お

---

1) 長崎川棚医療センター 臨床研究部, 神経内科

2) 嬉野医療センター 研究検査科

3) 長崎大学・院・展開医療科学

よび IgG による免疫組織化学) を検討した。  
4) さらに MBP/CFA で Lewis ラット免疫し、所属リンパ節から作成した単核細胞浮遊液を MBP で 72 時間刺激培養したものを adoptive transfer することで EAE を惹起した (adoptive EAE) ラットに対し、第 5 日目に臨床症状が出現し始めるのを確認し、第 7 日目に IgG を尾静脈より注射した。用いた IgG は健常ヒト IgG 群 (3 匹)、NMO 患者血清より精製した抗 AQP4 抗体陽性 IgG 群 (3 匹) で、それぞれの群で adoptive transfer 後より EAE スコアの評価と体重測定を行い、比較した。また adoptive transfer 後 14 日目に両群のラットをパラホルムアルデヒドで灌流固定し、脳および脊髄の病理学的変化 (H.E. 染色, GFAP および IgG による免疫組織化学) を検討した。

#### 【結果】

- 1) CFA/PTX による BBB の破壊を Evans' Blue による脳実質の染色で確認した。
- 2) 健常ヒト IgG 群, 抗 AQP4 抗体陽性 IgG 群を比較したが、両群とも臨床的に神経症状を来さず、体重の減少も認めなかった。
- 3) 両群のラット脳および脊髄には炎症性変化、壊死などを認めず、両群間で有意な差異を認めなかった。IgG は血管内に留まっていた。
- 4) Adoptive EAE に IgG を passive transfer した実験系においても健常ヒト IgG 群, 抗 AQP4 抗体陽性患者 IgG 群間での比較を行ったが、EAE スコアおよび体重の推移に有意差を認めなかった (EAE スコアについては 5 日目より発症率 100% であり、最重症期で grade 2, 8-9 日には症状は

改善)。また抗 AQP4 抗体陽性患者 IgG 群のうち 1 匹のラット脊髄にて 1 カ所、リンパ球の集簇を認めたが、その他の病的変化は見られなかった。

#### 【考察・結論】

今回の検討では PTX によって BBB を破壊したのみで、抗 AQP4 抗体陽性血清 IgG の passive transfer を行ったが、これでは臨床症状、病理学的変化を呈さず、その病原性を証明することはできなかった。その理由としては①BBB の破壊が十分でない、②ヒト由来の抗 AQP4 抗体陽性血清 IgG はラットでは補体介在性の免疫反応を惹起し得ない、③抗 AQP4 抗体には病原性を発現する条件がある、などの可能性がある。今後はこれらの可能性を追求するために検討を継続していく予定である。

#### 【健康危険情報】

なし

#### 【倫理面への配慮】

当院倫理委員会に動物実験計画書を提出し承認を得た。

#### 【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

# 抗 AQP4 抗体による病態モデル作製の試み

研究分担者 松井 真<sup>1)</sup>

共同研究者 田中恵子<sup>1)</sup>、山田光則<sup>2)</sup>、田中正美<sup>3)</sup>

## 研究要旨

抗アクアポリン4抗体 (AQP4-Ab) が neuromyelitis optica (NMO) の病態形成に直接関わるか否かについてはこれまで証明がなかった。最近、ラットに実験的脳脊髄炎を誘導後 AQP4-Ab を投与、あるいは脳内に抗体と補体を直接注入することで、NMO の病変が再現できたとの報告がなされた。我々は血液脳関門 (BBB) が脆弱な胎児ラット、あるいは AQP4 蛋白免疫で持続的な抗体産生が生じているマウスの BBB を LPS で損傷させ、中枢神経内に AQP4-Ab が単独で流入する条件下での病態形成の可否を検討した。抗体は神経組織内に流入したものの、炎症所見は見られず、AQP4 蛋白の減少も見られなかった。このことから、NMO の病変形成には AQP4-Ab および多量の補体が同時に存在する必要があることが明らかになった。

## 研究目的

Neuromyelitis optica (NMO) では、抗アクアポリン4 (AQP4) 抗体の存在が診断の有有用なマーカーとなる。NMO では、血漿交換療法などの抗体を除去する治療で症状の改善が得られ、早期病変部位で AQP4 が広汎に消失していることが示されたことや、AQP4 の発現部位と本症の病変好発部位が一致するなど、抗体が本症の病態に深く関わっていると考えられる。しかしながら、抗体のみを用いた病態モデル作成の可否については結論に至っていない。最近、myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) で誘導した experimental allergic encephalomyelitis

(EAE) に抗 AQP4 抗体を移入することにより、NMO の病態モデルが作成されたとの報告がなされている。今回我々は、EAE を誘導することなく、抗体が中枢神経内に侵入しうる条件下での、NMO 病態の再現の可否を検討した。

## 研究方法

抗 AQP4 抗体は、NMO 症例で再燃急性期に施行された単純血漿交換で得られた廃液から IgG 分画を精製して用いた。対照には市販の正常抗ヒト精製 IgG を用いた。

方法は、1) 妊娠9日目の Lewis rat および Sprague-Dawley rat 各6匹を3群に分け、2匹ずつ、抗 AQP4 抗体陽性症例の血漿 IgG 分画 100mg、正常ヒト IgG 分画 100mg、PBS のみ、を出産に至るまで週1回腹腔内投与を行い、生まれた子ラットから生後1・3・7日目に大脳・小脳・脊髄を採取した。2) C57BL/6 マウス20匹を10匹ずつに分け、rat AQP4 蛋白または卵白アルブミンをアジュバントと

- 1) 金沢医科大学脳脊髄神経治療学 (神経内科学)
- 2) 国立病院機構さいがた病院臨床研究部
- 3) 国立病院機構宇多野病院 MS センター

もに週1回計4回免疫し、それぞれの群の各5匹に2週目から連日リポポリサッカリド(LPS)または生理食塩水を腹腔内投与し、6週目に大脳・小脳・脊髄を採取した。4%パラフォルムアルデヒドで固定または急速凍結した各組織について、Hematoxylin-Eosin, Klüver-Barrera 染色、抗 AQP4 抗体、抗 MBP 抗体での免疫染色、および抗ヒトおよび抗マウス IgG, リンパ球表面マーカーなどを用いた免疫染色を行った。

#### (倫理面への配慮)

本研究班のプロジェクトとして、倫理審査で承認され、インフォームドコンセントのもと収集された検体を使用した。動物の組織採取には、実験動物取り扱い規定に基づき倫理審査で承認を受けた後、十分な麻酔を施した上で脱血屠殺の上、各組織を採取した

#### 研究結果

上記処置を行った妊娠ラットは、妊娠21-23日目に各10-12匹の子を出産した。生まれた子ラット、およびその他上記処置各群のどの個体にも麻痺などの神経障害を思わせる変化は見られなかった。

それぞれの各組織については形態上の変化は認めず、炎症細胞の浸潤もみられなかった。

抗 AQP4 抗体を投与した妊娠ラットの子および、rat AQP4 蛋白で免疫し LPS を投与したマウスの大脳・小脳・脊髄の脳表、神経組織内小血管周囲には IgG の沈着が見られた。なお、rat AQP4 蛋白で免疫したマウスの血清中には高力価の抗 AQP4 抗体の産生が確認された。

しかしながら、抗 AQP4 抗体を投与したマウス・ラットとも血管周囲の AQP4 の脱落は見られず、リンパ球のマーカー染色でもリンパ球の浸潤は確認できなかった。

#### 考察

NMO では、AQP4-Ab の存在が診断の有用なマーカーとなり、血漿交換療法などの抗体を除去する治療で症状の改善が得られ、早期病変部位で AQP4 が広汎に消失しているなどから、抗体が本症の病態に深く関わっていると考えられる。NMO の病変形成に AQP4-Ab がどのように関わるかについて、最近 EAE ラットに AQP4-Ab を投与、あるいはマウス脳内に AQP4-Ab を補体とともに注入することで、本症の病変形成が可能であることが示された。我々は以前から、抗体単独での神経組織傷害への関与について検討を進めてきたが、BBB を超えて脳内に AQP4-Ab が入る条件下でも神経組織に病変は生じず、AQP4 の脱落も見られなかったことから、抗体単独では病変形成が困難であることを確認した。最近の知見を総合すると、NMO の病変形成には脳内に流入した AQP4-Ab と大量の補体が主役を演じることが明らかになった。

#### 結論

今回、マウスおよびラットを用いて、抗 AQP4 抗体が血液脳関門を通過しうる条件下での、抗体単独での神経傷害の可否を検討した。異なる複数の方法を用いたが、いずれも中枢神経内に炎症所見は見られず、また AQP4 の脱落も確認できなかった。以上より抗体単独での病態再現は困難と考えられた。

#### 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

## 実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)における Sema4D-PlexinB1 相互作用について

分担研究者 佐古田三郎<sup>1)</sup>

共同研究者 中辻裕司<sup>1)</sup>、森谷真之<sup>1)</sup>、木下允<sup>1)</sup>、

奥野龍禎<sup>2)</sup>、熊ノ郷淳<sup>2)</sup>

### 研究要旨

セマフォリン分子群は主に神経軸索ガイダンス分子として神経発生学領域で研究されてきた分子群であるが、近年免疫制御において重要な働きをしていることが判明している。昨年度我々はクラスIVセマフォリン Sema4A の測定系を樹立し多発性硬化症(MS)患者末梢血中 Sema4A が有意に高値を示し MS の補助診断法となりうることを報告した。今年度は同じくクラスIVセマフォリンである Sema4D の MS における働きを明らかにするために MS の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)マウスを利用し解析した。主に T 細胞に発現する Sema4D がミクログリアの Plexin-B1 を介して中枢神経系(CNS)の炎症機転を促進し EAE の病態に重要な分子であること、さらに作成したモノクローナル抗 Sema4D 抗体投与により EAE の治療効果があることを示した。

### 研究目的

Sema4D は T 細胞に高発現し、樹状細胞及び B 細胞を活性化するクラスIVセマフォリンであり、免疫系では CD72、神経系では Plexin-B1 がそれぞれ受容体として機能している。Sema4D 欠損マウスでは CD72 を介した樹状細胞の活性化が障害されるため、ミエリン抗原特異的 T 細胞の産生が障害され、EAE 抵抗性であることが判明している。さらに、HTLV-1 関連脊髄症患者の脊髄内及び髄液中で Sema4D が増加し、オリゴデンドロサイト及び神経細胞の再生障害に関係すること

が報告されるなど、神経免疫疾患との関連が示唆されている。今回我々は、多発性硬化症の治療ターゲットとして Sema4D に注目し、その動物モデルである EAE に対する抗 Sema4D 抗体の効果とその作用メカニズムについて検討することを目的とした。

### 研究方法

(1) 再発性 EAE は SJL マウスを proteolipid protein (PLP) ペプチドと完全フロイントアジュバント(CFA)で免疫することにより作成した。抗 Sema4D 抗体あるいはコントロール IgG は免疫後9日、16日及び23日にそれぞれ投与し、症状を観察した。

- 1) 大阪大学大学院医学系研究科神経内科学
- 2) 大阪大学微生物病研究所感染病態分野

(2) Sema4DとPlexin-B1の発現を調べるため、対照(C57BL/6)及び発症直後のEAE脊椎髄のPFA固定後凍結切片を抗Sema4D抗体及びPlexin-B1抗体で免疫染色した。蛍光二重染色には抗CD3抗体、抗IBA-1抗体、抗GFAP抗体を用いた。

(3) Sema4Dの炎症との関連とそのメカニズムを調べるため、ミクログリアの初代培養を野生型マウス(C57BL/6)、CD72欠損マウス及びPlexin-B1欠損マウス(C57BL/6)新生仔より調製し、リコンビナントSema4DとCD40刺激抗体を組み合わせて刺激し、代表的な炎症性分子であるiNOSの誘導をウエスタンブロット法で解析した。NO産生については培養上清を用いてGreiss法にて測定した。

(4) Plexin-B1欠損マウス(Ly5.2)に致死量の放射線照射後、野生型マウス(Ly5.1)の骨髄細胞を移入することにより、中枢神経系のみPlexin-B1を欠損するキメラマウス(Wt→Plexin-B1KO)を作成した。対照としては、野生型マウス(Ly5.1)の骨髄細胞を放射線照射した野生型マウス(Ly5.2)に移入したキメラマウス(Wt→Wt)を用いた。これらのマウスの免疫系が再構成されたことを確認後、MOG反応性T細胞を移入した。MOG反応性T細胞は、MOGペプチドとCFAで野生型マウス(C57BL/6)を免疫し、10日後にリンパ節及び脾臓を取り出して、細胞を調整し、MOGペプ

チドとIL-12で3日間再刺激を行い、negative selectionを行って調整した。

## 研究結果

(1) 抗Sema4D抗体投与群ではコントロールIgG投与群に比べてEAEは有意に軽症であった。さらに脊椎髄への単核球浸潤も抗Sema4D抗体投与群において軽減しており、エフェクター相においてSema4D阻害療法は有効であった。

(2) Sema4DとそのレセプターであるCD72及びPlexin-B1の発現をEAEの脊椎髄において検討したところ、Sema4DはT細胞(CD3陽性細胞)に、Plexin-B1はミクログリア(IBA1陽性細胞)に主に発現していたがCD72の発現確認はできなかった。

(3) 野生型ミクログリアではSema4DはCD40刺激で誘導されたiNOS及びNOの産生を増加させたが、Plexin-B1欠損ミクログリアではこれらの増加が野生型に比し減少していた。CD72欠損ミクログリアではこれらは野生型と同様に増加した。

(4) ミクログリアに発現したPlexin-B1のEAEにおける炎症機転への寄与を、中枢神経でPlexin-B1を欠くマウス(Wt→Plexin-B1KO)及びその対照(Wt→Wt)にMOG反応性T細胞を移入し、EAEを誘起したところ(Wt→



Plexin-B1KO)のほうが(Wt→Wt)に比し有意に軽症であった。

#### 考察

EAE の中枢神経病巣において、浸潤T細胞に高発現した Sema4D はミクログリアに発現誘導される Plexin-B1 を介して、炎症機転を促進していることが示唆された。モノクローナル抗 Sema4D 抗体は T 細胞に発現した Sema4D の機能を阻害することにより、炎症を抑制し EAE に対する治療効果があることが示された。

#### 結論

Sema4D-Plexin-B1 相互作用の阻害は多発性硬化症の有力な治療ターゲットになりうることを示された。

#### 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

班 員 松井 真<sup>1)</sup>  
共同研究者 羽柴奈穂美<sup>1)</sup>、荒谷信一<sup>1)</sup>、稲田紘之<sup>1)</sup>、長山成美<sup>1)</sup>  
菌部佳史<sup>2)</sup>、錫村明生<sup>2)</sup>

### 研究要旨

MS-like disease としての MOG-EAE マウスにフェニトイン (phenytoin; PHT) を投与することで EAE スコアが軽減されることが報告され、昨年度はこの動物モデルにおいて PHT が症状発現時期からの週 3 回投与で EAE を抑制すること、投与ルートによる大きな差はなく、むしろ内服は 0.5mg、腹腔内投与では 1mg が十分な抑制効果をもたらしたことを明らかにした。今回、EAE 抑制の病理学的な背景と関与する免疫学的要因を解析した。その結果、PHT の至適濃度および投与経路での EAE の抑制は再現性があること、EAE 腰髄における病理像はスコアの重症度に応じて髄膜直下に強い炎症細胞浸潤を認め、EAE スコアと病理学的な炎症所見は一致していること、さらに PHT 0.5mg 経口投与群において、Day 15 において対照群に比して脾臓中の CD3+CD4+CD25+CD127<sup>dim</sup> Treg は有意に増加することが判明した。したがって PHT の EAE 抑制作用には免疫修飾作用が関与している可能性が示唆され、今後 Foxp3 に焦点を当てた Treg の解析を行い確認する必要があると考えられた。

### 研究目的

MS-like disease としての MOG-EAE マウスにフェニトイン (phenytoin; PHT) を投与することで EAE スコアが軽減されることが報告され、昨年度はこの動物モデルにおいて至適投与量の検討と投与経路による効果の相違を検証した。その結果、PHT は症状発現時期からの週 3 回投与で EAE を抑制すること、投与ルートによる大きな差はなく、むしろ内服は 0.5mg、腹腔内投与では 1mg が十分な抑制効果をもたらしたことを報告した。

今回われわれは、EAE 抑制の病理学的な背景と関与する免疫学的要因を抽出することを試みたので報告する。

### 研究方法

EAE はミエリンオリゴデンドロサイト糖蛋白 (MOG) 35-55 とフロイント完全アジュバント (CFA) をエマルジョン化し、C57BL/6J ♀7 週齢の腰背部に皮下注射、当日と 2 日後

1) 金沢医科大学脳脊髄神経治療学神経内科学

2) 名古屋大学環境医学研究所神経免疫

に、百日咳菌毒素 (PTX) を 2 回腹腔内注射することで作成した。EAE スコアは以下のように評価した。0: 正常、1: 尾の脆弱化・尾の低位置保持、2: 後肢の脆弱化、3: 後肢麻痺、4: 全身麻痺、5: 全身衰弱・死亡。

PHT は 0.1ml の注射用蒸留水に溶解し、EAE 感作後 day12 より週 3 回隔日投与を施行した。0.5mg を経口で、また 1mg を腹腔内投与し、Day 43 まで観察した。Control として同量の注射用蒸留水を経口または腹腔内投与した。

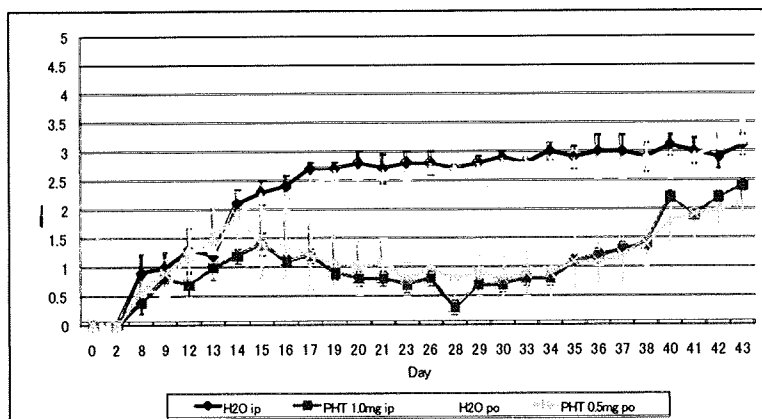
病理学的解析は、発症初期の Day 15 および病極期に近い Day 22 に、麻酔下にマウスを sacrifice し、腰髄膨大部の HE 染色を行った。

病理解析と連動して、マウス末梢血と脾細胞を採取し、以下の抗原に対するモノクローナル抗体を用いて免疫指標をスクリーニングした。

CD3, CD4, CD8 各陽性細胞;

CD3+CD4+CD25+CD127<sup>dim</sup> Treg ; Annexine V 陽性 apoptotic cell

## PHT1.0mg腹腔投与群 及び PHT 0.5mg経口投与群とcontrol群の比較



(倫理面への配慮)

すべての動物実験は、動物愛護の観点から、金沢医科大学動物実験委員指針に従って行われた。

### 結果

- 1) PHTはEAE発症直後のDay12から週3回投与することで有意にEAEスコアを軽減し、再現性があった。0.5mg経口投与と1mg腹腔内投与は同程度の抑制効果をもたらした(図)。
- 2) 病理像はスコアの重症度に応じて、髄膜直下に最も強い炎症細胞浸潤を認め、症状と病理学的な炎症所見は一致していた。
- 3) PHT0.5mg経口投与群において、Day15において対照群に比して脾臓中のTregは有意に増加した。
- 4) Day31でPHT投与を中止して2週間経過すると、前回の報告と同様、EAEスコ

アは対照群に近づく現象が再確認された(図)。

### 結論と考察

- 1) PHTのEAE急性期症状の改善効果は明らかに存在する。Treg増加という免疫修飾作用を介している可能性があり、Foxp3解析を併用して確認する必要がある。
- 2) PHTの投与中止後、比較的早期に対照群と同レベルまで麻痺スコアが増悪することを考慮すると、軸索保護作用の解除という要因を無視できない。投与中止後の症状増悪期にあるマウスの脊髄を対象に、軸索染色等を用いて病理学的に解析する必要がある。

### 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

研究分担者 原 寿郎<sup>1)</sup>

共同研究者 鳥巢浩幸<sup>1)</sup>、山口 結<sup>1)</sup>、吉良龍太郎<sup>1)</sup>、實藤雅文<sup>1)</sup>、石崎義人<sup>1)</sup>、  
吉良潤一<sup>2)</sup>、楠 進<sup>3)</sup>

## 研究要旨

我が国の小児急性散在性脳脊髄炎(ADEM)、多発性硬化症(MS)とその類縁疾患の実態を明らかにするために、International pediatric MS study group が提案した疾患定義に基づいて診断された ADEM 67 例、Clinically isolated syndrome (CIS) 22 例、MS 37 例の臨床像に関して解析を行った。ADEM 患者群は MS 患者群に比べ男児の割合が高く(62.4% vs 32.4%)、平均発症年齢が低かった(5.8 歳 vs 8.4 歳)。多症候性 CIS 群は、性差、年齢分布、誘因、前駆症状において ADEM 患者群に近い傾向を有していたが、臨床症状では MS 患者群と同様に視力障害合併が有意に高く(ADEM 9.0%, CIS 37.5%, MS 70.3%)、後遺症においても MS 患者群と同様に視覚障害の頻度が高かった(ADEM 1.5%, CIS 13%, MS 14%)。今後、我が国における CIS の特徴や MS への移行の危険性を詳細に検討していく必要がある。

## 研究目的

近年、小児の急性散在性脳脊髄炎(acute disseminated encephalomyelitis; ADEM)や多発性硬化症(multiple sclerosis; MS)の症例調査が各国で行われ、好発年齢、臨床症状、MRI 所見が報告されるようになった。我が国でも 2003 年に我々が福岡県での小児 ADEM、MS の全数調査を実施し、その疫学的特徴を報告した。しかし、これまでの多くの小児 ADEM 調査は病院単位で行われ、ADEM の疾患定義や診断基準が報告ごとに異なることから、地域間や人種間での比較検討は十分になされていない。

そこで、我々は小児 ADEM、MS および類縁疾患の我が国における現状を明らかにする

- 1) 九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野 (小児科)
- 2) 九州大学大学院医学研究院神経内科
- 3) 近畿大学医学部神経内科

ために、International pediatric MS study group (IPMSSG)から提案された MS と類縁疾患の定義(2007)に基づき、2008 年より全国疫学調査を開始した。一次調査(患者数調査)では、疫学的に抽出した 977 施設中 709 施設から回答を得て、我が国の小児 ADEM 罹患率を 0.8 人/10 万人年と推定した。(平成 20 年度本班会議報告)

今回、我々は 2009 年に実施した二次調査の集積データを用いて、臨床像を中心に解析を行った。

## 研究方法

### (1) 一次調査

全国の小児科を標榜する病院から疫学的に抽出した 977 施設の小児科に、2005 年 1 月 1 日～2007 年 12 月 31 日の期間に受診した、IPMSSG の定義に基づいた ADEM、再発