

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

中枢・末梢連合脱髄症の診断基準作成と
臨床疫学調査の実施による
治療指針の確立

平成 25 年度 総括研究報告書

研究代表者 吉良 潤一

平成 26 年(2014 年) 5 月

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
（総括）研究報告書

研究課題：中枢・末梢連合脱髄症の診断基準作成と臨床疫学調査の実施による治療指針の確立

課題番号： H24-難治等（難）一般-055

研究代表者：氏名 吉良 潤一

研究施設 九州大学大学院医学研究院神経内科学・教授

研究要旨

中枢・末梢連合脱髄症(Combined central and peripheral demyelination, CCPD)は、中枢神経と末梢神経を侵す希少な難治性脱髄性疾患であり、原因不明で診断基準も存在しない。私たちは CCPD と考えられる患者で、中枢・末梢神経に共通して存在する neurofascin に対する血清抗体価が極めて高いことを発見した。本研究では CCPD 診断における抗 neurofascin 抗体の有用性を確認するとともに、CCPD の診断基準を暫定的に「MRI もしくは VEP で中枢神経に脱髄病巣を有し、末梢神経伝導検査で、脱髄所見を認める症例」とし、全国臨床調査を実施する。前年度では、CCPD 症例における血清抗 neurofascin 抗体を、cell-based assay, ELISA で測定した。本年度はより精度の高い抗体検査法を確立すべく、1) Flow cytometry を用いた抗 NF155 抗体・抗 NF186 抗体測定系、2) Human recombinant NF155 protein を用いた ELISA 法、について測定を行った。

結果、1) 2)ともに複数の CCPD, CIDP, GBS, MS, その他のニューロパチー、健常者を対象に評価した。Flow cytometry 法を利用して抗 NF155 抗体を測定した結果、前年度までに報告した CCPD 症例で血清が確保できた 6 例のうち、陽性は 2 例のみであった。その他の炎症性脱髄性疾患、健常対照はいずれも陰性であった。また、後に新規で測定した CIDP 症例で 1 例陽性となった。抗 NF155 抗体陽性の 2 症例はいずれも抗 NF186 抗体価は陰性であった。Human recombinant NF155 protein を用いた ELISA 法では、前年度までに報告した CCPD 症例で血清が確保できた 5 例のうち、陽性は 2 例にとどまった。残りの 3 症例は以前の rat recombinant NF155 protein で測定した際に陽性であった症例であった。陽性の 2 例は flow cytometry 法で陽性を確認した症例であった。その他の炎症性脱髄性疾患、健常対照は 1 例を除きいずれも陰性であった。今後は引き続きより精度の高い neurofascin 抗体測定方法を行うべく、さらに症例数を集めて検討する予定。

研究分担者氏名・所属研究機関名
及び所属研究機関における職名

名古屋大学環境医学研究所神経免疫学・教授 錫村明生
近畿大学神経内科・教授 楠 進
九州大学大学院医学研究院臨床神経生理学・教授 飛松省三
九州大学大学院医学研究院神経内科学分野・共同研究員 河村信利
九州大学大学院医学研究院神経内科学分野 学術研究員 松下 拓也
九州大学大学院医学研究院神経内科学分野 助教 松瀬 大

子に対する自己抗体等の液性因子の

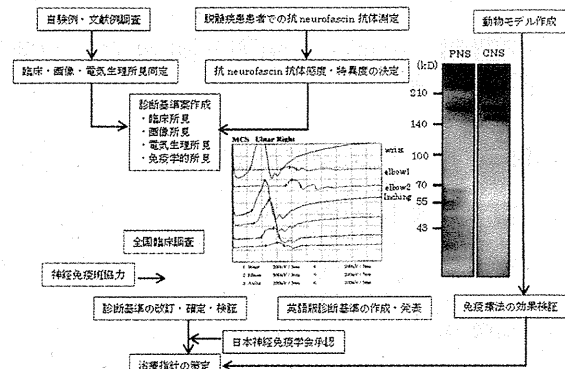


図1. 研究の流れ図

A. 研究目的

中枢・末梢連合脱髄症(Combined central and peripheral demyelination, CCPD)は、原因不明の希少な難治性疾患である。本症は、脱髄性疾患の中でも中枢神経のみを侵す多発性硬化症(multiple sclerosis, MS), 末梢神経のみを侵すギラン・バレー症候群 (Guillain-Barré syndrome, GBS)や慢性炎症性脱髄性多発根ニューロパチー(chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy, CIDP)とは異なり、中枢神経と末梢神経を同時に侵すのが大きな特徴である。欧米の大学病院神経内科では年間 1~6 例の新規患者がいるとの報告もあるが、我が国では調査されたことがない。世界的にみても診断基準は存在せず、大規模な臨床疫学調査が実施されていない。大量ステロイド療法が無効で血漿交換が著効した症例を認めることから、中枢神経と末梢神経に共通して存在する分

関与が示唆されているが、原因は全く不明である。

私たちは、最近、多数の脱髄性疾患患者血清の自己抗体探索により、中枢神経と末梢神経と同時に脱髄をきたした患者でのみ、中枢・末梢神経に共通して存在する neurofascin に対する抗体価が極めて高いことを発見した。このような高力価の抗 neurofascin 抗体は、多数例の MS や視神経脊髄炎, GBS, CIDP, その他の神経疾患, 健常対照ではみられず, CCPD に特異的な自己抗体と考えられた。このことは, CCPD が MS や CIDP などの中枢神経あるいは末梢神経に限局した脱髄性疾患とは異なる独立した一疾患単位であることを強く示唆する。

本研究では CCPD 診断における抗 neurofascin 抗体の有用性を確認するとともに, CCPD の診断基準を暫定的に下記のように定め, 全国臨床調査を実施する。前年度では, CCPD 症例における血清抗 neurofascin 抗体を,

CCPD 暫定診断基準

<疾患概念> 同一症例に中枢神経と末梢神経の脱髄炎が生じる疾患

<基準>

① MRI 上明らかな T2 高信号病巣を脳（白質）もしくは脊髄に認める．あるいは視神経に MRI または視覚誘発電位（VEP）で異常を認める．

② 末梢神経伝導検査で脱髄に合致する伝導遅延・伝導ブロック・時間的分散を認める．

③ 原因疾患が明らかでない．

神経ボレリア感染症などの感染症，神経サルコイドーシスや神経ベーチェット病，関節リウマチなど炎症性・自己免疫性，ビタミン欠乏症や慢性アルコール中毒などの代謝性疾患，白質ジストロフィー症などの遺伝子疾患のように，中枢神経と末梢神経の両者を侵す原因の明らかなものは含めない．

慢性虚血性変化と思われる非特異的 MRI T2 高信号病巣は含めない．

糖尿病に伴うニューロパチーのように末梢神経障害の原因が明らかなものは含めない．

なお，発症の様式は，急性（1 週間以内にピーク），亜急性（1 カ月以内にピーク），慢性（1 カ月を超えてピーク）でもよい．

〈神経伝導検査 適格基準〉

正中神経，尺骨神経，脛骨神経において少なくとも 2 つの神経において，脱髄を示唆する所見（遠位潜時の延長，神経伝導速度の延長，伝導ブロック，時間的分散，F 波潜時の延長）を認める症例

cell-based assay, ELISA で測定した．本年度はより精度の高い抗体検査法を確立すべく，1) Flow cytometry を用いた抗 NF155 抗体・抗 NF186 抗体測定系，2) Human recombinant NF155 protein を用いた ELISA 法，について測定を行った．

B. 研究方法

1) Flow cytometry を用いた抗 NF155 抗体・抗 NF186 抗体測定系

定性的な cell-based assay よりも情報量が多く多検体の処理が可能な抗 NF 抗体測定系を flow cytometry を用いて開発した．

Negative control の HEK293 細胞と GFP-NF155 発現細胞を 1:1 で混合し，20 倍に希釈したヒト血清と抗原

抗体反応を行い，続いて蛍光 2 次抗体の Alexa 647 anti-human IgG antibody で二次染色を行った．フローサイトメーターを用いて，染色後の細胞の蛍光強度を測定した．

図 2 左上が，血清を当てていない細胞での flow cytometry の結果である．横軸は GFP の蛍光強度であるが，通常の HEK 細胞と，GFP-NF155 発現クローンの細胞集団を分離すること可能である．縦軸は Alexa 647 の蛍光強度であり，この場合はいずれの細胞集団も Alexa647 の蛍光を認めないため低値となっている．右上は陰性例．GFP-NF155 発現細胞における Alexa647 の蛍光強度は，左上の二次抗体のみの例よりも上昇しているが，HEK 細胞の Alexa647 蛍光強度も同

程度上昇していることから、この上昇は非特異的な反応である。下段は陽性例。右下は GFP-NF155 発現細胞における Alexa647 の蛍光強度は 282.61 であり、HEK 細胞における Alexa647 の蛍光強度は 5.06 であるため ratio は 55.9、delta は 278 となり、先程の陰性例と比較するといずれも高値を示している。

今回は GFP-NF155 発現細胞における Alexa647 の蛍光強度と通常の HEK 細胞における Alexa647 の蛍光強度の比(ratio)もしくは差(delta)をとって評価した。なお、カットオフ値は健常対照の平均+5SD とした。

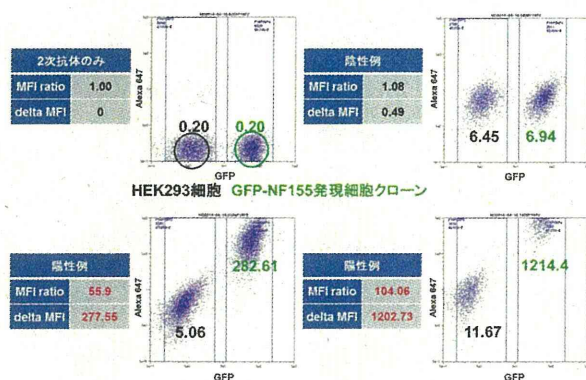


図 2. Flow cytometry を用いた抗 NF155 抗体測定

2) Human recombinant NF155 protein を用いた ELISA 法

より特異的な抗原抗体反応を確認する目的で、抗原を R&D systems 社の rat recombinant NF155 protein

から OriGene 社の human recombinant NF155 protein へ変更して ELISA 法を施行した。

CCPD 5 例, CIDP 13 例, GBS 12 例, MS 17 例, 健常対照 10 例に対して ELISA 法で抗 NF155 抗体を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は九州大学倫理委員会の承認を受けて実施した。「疫学研究に関する倫理指針」の「第 3. インフォームドコンセント等」に則り、目的、連絡先などを含んだ本研究の情報を Web サイト (九州大学神経内科ホームページ内) における提示により周知した上で調査票を発送した。対象となる患者の診療記録より調査票に基づき情報を収集 (既存資料記録などを抽出、加工) する。この過程において、得られた情報は、決して外部に流出しないよう、厳重に保管する。個人情報管理責任者は九州大学神経内科教授吉良潤一とした。臨床情報の収集にあたっては個人が同定される情報は提供を受けない。その公表 (学会発表や論文発表) に際しては、被検者の個人名が特定できないようプライバシーの保護に配慮する。

C. 研究結果

1) Flow cytometry を用いた抗 NF155 抗体・抗 NF186 抗体測定系

CCPD 6 例, CIDP 9 例, GBS 10 例, その他のニューロパチー 17 例, MS 17 例, 健常対照 10 例に対して flow cytometry 法を利用して抗 NF155 抗体を測定した結果を図 3

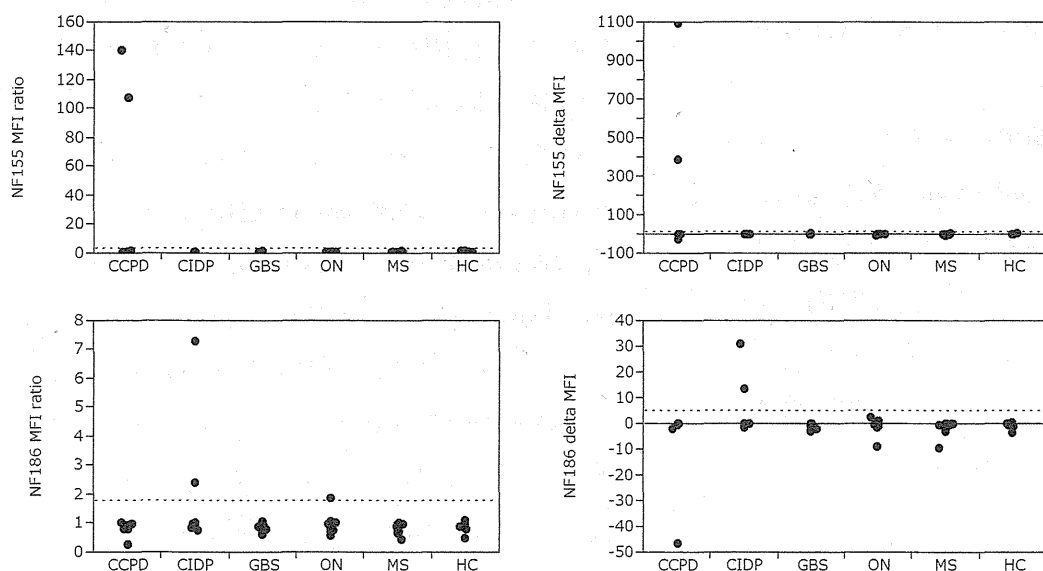
(上) へ示す. 前年度までに報告した CCPD 症例で血清が確保できた 6 例のうち, 陽性は 2 例のみであった. その他の炎症性脱髄性疾患, 健常対照はいずれも陰性であった. 後に新規で測定した CIDP 症例で 1 例陽性となった.

抗 NF186 抗体についても同様の手技を用いて検査を行った. 結果は図 3 (下) へ示す. MFI ratio では 2 例の CCPD 症例および, その他のニューロパチー症例 1 例が, delta MFI では 2 例の CCPD 症例のみが陽性となった. なお, 抗 NF155 抗体陽性の 2 症例はいずれも抗 NF186 抗体価は陰性であった.

図 3. Flow cytometry 法を利用した抗 NF155 抗体・抗 NF186 抗体測定の結果

2) Human recombinant NF155 protein を用いた ELISA 法

CCPD 5 例, CIDP 13 例, GBS 12 例, MS 17 例, 健常対照 10 例に対して ELISA 法で抗 NF155 抗体を測定した結果図 4 へ示す. 前年度までに報告した CCPD 症例で血清が確保できた 5 例のうち, 陽性は 2 例にとどまった. 残りの 3 症例は以前の rat recombinant NF155 protein (R&D systems) で測定した際に陽性であった症例であった. 陽性の 2 例は flow cytometry 法で陽性を確認した症例であった. その他の炎症性脱髄性疾患, 健常対照は 1 例を除きいずれも陰性であった. この抗 NF155 抗体陽性 CIDP 症例については, 前述の flow cytometry 法施行時の CIDP 群には含



まれていなかったが、後に flow cytometry 法でも陽性であることを確認した。また rat CNS tissue lysate と反応し NF155 と思われる箇所にバンドを形成した。

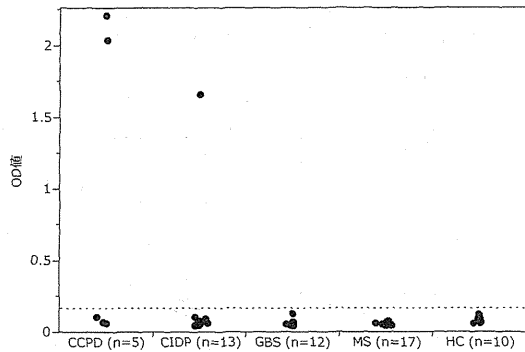


図 4. Human recombinant NF155 protein を用いた ELISA 法

D. 考察

今回新たに、flow cytometry を用いた抗 NF155 抗体・抗 NF186 抗体測定系、human recombinant NF155 protein を用いた ELISA 法を行った。

1) Flow cytometry を用いた抗

NF155 抗体・抗 NF186 抗体測定系について

定量性、簡便性を目的として目視による cell-based assay から flow cytometry 法を採用したが、結果、これまで陽性としていた CCPD 症例が一部陰性となった。目視による cell-based assay では、非特異的な反応か真の反応かの区別が測定者の主観に依存するため、多少なりとも臨床情報などのバイアスがかかっていた

可能性はある。また目視法では Alexa594 を使用していたが、flow cytometry 法ではより高い stain index を有する Alexa 647 を使用したことも異なる結果が得られた要因の一つかもしれない。

抗 NF186 抗体測定においても一部陽性者を認めたが、その値は抗 NF155 抗体陽性者でみられたような著明な上昇ではなかった。使用する細胞が異なるため一概には言えないが、病的意義の判断には慎重を要する。また抗 NF186 抗体測定は flow cytometry 法でしか行っていないため、今後は ELISA 法を含めた別の検査系での評価を行う必要がある。

2) Human recombinant NF155

protein を用いた ELISA 法について

今年度より OriGene 社の human recombinant NF155 protein へ変更して ELISA 法を施行したところ、前年度までに陽性と報告していた症例の一部は陰性となった。

前年度まで使用していた R&D systems 社の rat recombinant NF155 protein は NS0 murine myeloma cells から発現、精製したものである。Ng らは、R&D systems 社の rat recombinant NF155 protein を用いて ELISA 法を行った場合に非特異的の反応が増加することを指摘して

いる。その原因として Ng らは、動物種の問題よりも、NS0 murine myeloma cells より発現した蛋白は培養の状況によっては異常な糖化が生じることを重要視しており、結果として非特異的な免疫原性を獲得している可能性があることを指摘している。

当科では rat CNS tissue lysate と rat PNS tissue lysate に対する CCPD 症例血清の反応を確認したところ、flow cytometry 法と human recombinant NF155 protein を用いた ELISA 法いずれも陽性の 2 例については NF155 に相当するバンドが出現したが、その他の症例ではバンドは検出されなかった。

今年度に得られた知見を総合するとこれまで陽性と判断していた CCPD 症例の一部では NS0 murine myeloma cells 由来の rat recombinant NF155 protein との非特異的な反応をみていた可能性が高い。なお、新たに発見された CIDP 症例では rat CNS lysate に対して NF155 に相当するバンドが出現することを確認した。

E. 結論

今年度は新たに、flow cytometry を用いた抗 NF155 抗体・抗 NF186 抗体測定系、human recombinant NF155 protein を用いた ELISA 法を行った。

いずれの検査系においても前回抗 NF155 抗体陽性であった患者の一部は陰性となった。Western blot 法の結果を併せると、今回の検査結果が真を得ている可能性が高い。

今年度から施行している flow cytometry 法と human recombinant NF155 protein を用いた ELISA 法結果は概ね一致しているが、お互いの検査精度の確認のため、当面は両検査を並行して引き続き測定を行っていく予定である。

CCPD 症例における NF155 抗体の陽性率は当初考えていたよりも低い可能性がある。上記の測定系において、CCPD 症例のみならず、CIDP 症例 1 例でも血清抗 NF155 抗体が陽性となった。今後は CCPD 症例での測定を進めていくとともに、CIDP 症例においても測定を行っていく予定である。

F. 研究発表

原著論文

- 1) Hagiwara K, Ogata K, Okamoto T, Uehara T, Hironaga N, Shigeto H, Kira J-I, Tobimatsu S: Age-related changes across the primary and secondary somatosensory areas: An analysis of neuromagnetic oscillatory activities. Clin Neurophysiol 2014; 125: 1021-1029.
- 2) Kawamura N, Yamasaki R,

Yonekawa T, Matsushita T,
Kusunoki S, Nagayama S, Fukuda Y,
Ogata H, Matsuse D, Murai H, Kira
J. Anti-neurofascin antibody in
patients with combined central and

peripheral demyelination.
Neurology 2013;81:714-722.

3) Kanamori Y, Isobe N, Yonekawa T,
Matsushita T, Shigeto H,
Kawamura N, Murai H, Tobimatsu
S, Kira J-I. Multimodality evoked
potentials for discrimination of
atopic myelitis and multiple
sclerosis. Clin Exp Neuroimmunol
2013; 4: 29-35.

4) Kusunoki S. Autoantibodies in
neuroimmunological diseases;
relevance of fine specificity. Exp
Neurol 2013; 250: 219-220.

総説

1) 飛松省三: 視床障害の症候 体性感
覚障害. Clinical Neuroscience, 2013;
31: 93-95.

学会発表

1) 緒方英紀, 松瀬大, 河村信利, 山
崎亮, 米川智, 今村志穂子, 松下拓也,
楠進, 錫村明生, 吉良潤一. 中枢・末
梢連合脱髄症における抗 neurofascin
抗体陽性率の検討および全国臨床疫
学調査: 第 54 回 日本神経学会学術大
会. 2013.5.30 東京

2) 緒方英紀, 松瀬大, 松下拓也, 河
村信利, 山崎亮, 飛松省三, 楠進, 錫
村明生, 吉良潤一. 中枢・末梢連合脱
髄症における全国臨床調査報告およ
び抗 neurofascin 抗体陽性率の検討:
第 24 回 日本末梢神経学会学術集会.
2013.8.23 新潟

3) 寒川真, 平野牧人, 津川潤, 阪本
光, 田畑絵美, 高田和男, 桑原基, 山
藤聖子, 加藤茉里, 山田達夫, 原英夫,
坪井義夫, 中村雄作, 楠進. 抗
galactocerebroside 抗体陽性で末梢神
経障害を合併した急性散在性脳脊髄
炎の臨床的特徴: 第 24 回日本末梢神
経学会学術集会. 2013.8.23-24 新潟

4) Ogata H, Yamasaki R, Matsuse D,
Kawamura N, Yonekawa T,
Matsushita T, Imamura S,
Kusunoki S,
Nagayama S, Fukuda Y, Murai H,
Kira JI. Combined Central and
Peripheral Demyelination:
Diagnostic Value of

Anti-Neurofascin Antibody and the
First Nationwide Survey In Japan :
the 6th Pan-Asian Committee for
Treatment and Research in Multiple
Sclerosis 2013.11.8 Kyoto.

5) Samukawa M, Hirano M,
Tsugawa J, Sakamoto H, Tabata E,
Takada K, Kuwahara M, Suzuki S,
Kato M, Yamada T, Hara H, Tsuboi
Y, Nakamura Y, Kusunoki S.

Effectiveness of repeated
intravenous immunoglobulin
therapy for refractory acute
disseminated encephalomyelitis
associated with
anti-galactocerebroside antibody.
2013 Annual Meeting of the
American Neurological Association,
New Orleans, USA, October 13-15,
2013.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許所得
なし.
2. 実用新案登録
なし.
3. その他
なし.

