

新規に保険収載された検査法 ELISA による抗アクアポリン 4 抗体測定

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay for Anti-aquaporin4 antibody

たか はし とし ゆき ふじ はら かず お
高橋 利 幸^{1,2)} : 藤原 一 男²⁾
Toshiyuki TAKAHASHI Kazuo FUJIHARA

はじめに

アクアポリン (aquaporin : AQP) は、生物の細胞膜に発現している膜タンパクで、主に水分子が通過するチャンネルとして機能している。ヒトでは 13 種類 (AQP0 ~ AQP12) の AQP が知られており、その一つがアクアポリン 4 (aquaporin-4 : AQP4) である。AQP4 は、中枢神経系・気管・腸管・腎臓・骨格筋などに発現しているが、特に中枢神経系に豊富に発現しており、神経系と血液間での水分子の出入りや、脳脊髄液循環などに深く関係していると考えられている¹⁾。一方、視神経炎と脊髄炎を主徴とする炎症性中枢神経疾患、視神経脊髄炎 (Neuromyelitis optica : NMO) の患者血清から、極めて特異性の高い自己抗体が検出され、この対応抗原が AQP4 であることが判明した。その後の知見により、現在、抗 AQP4 抗体は、単なる疾患マーカーではなく、NMO 発症の病原性を持った自己抗体だと考えられている。また、抗 AQP4 抗体は、NMO の部分症と考えられる疾患群でも陽性となることが分かり、最近では、NMO とその部分症を併せて、NMO 関連疾患 (NMO spectrum disorders : NMOSD) と呼ぶ^{2,3)}。NMOSD は、特に病初期において多発性硬化症 (multiple sclerosis : MS) と類似し、治療選択上の問題となるが、これらの鑑別のために、抗 AQP4 抗体測定が広く用いられることとなった。国内では主に、AQP4 発現細胞を用いた間接蛍光抗体法 (cell-based assay : CBA) によって幾つかの研究施設が測定を行ってきたが、今回、Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) による、診断目的での測定

が保険収載された (陽性例の経過観察目的での検査は認められていない)。本稿では、この抗体が陽性になり得る疾患である NMOSD について概説し、国内における従来法である CBA による抗 AQP4 抗体測定と、今回保険適用になった ELISA による抗 AQP4 抗体測定について、順に述べる。

I. 視神経脊髄炎関連疾患 (Neuromyelitis optica spectrum disorders : NMOSD) 概説

1. 視神経脊髄炎の歴史的背景

視神経脊髄炎 (Neuromyelitis optica : NMO) の疾患概念は、1894 年に Devic が「視神経炎を伴った亜急性脊髄炎」と題する 1 例を報告したことに端を発する。同年、彼の弟子 Gault がこの 1 例を含む欧米の 17 症例をまとめて解析し、視神経と脊髄を侵す特異な疾患として Neuromyelitis optica という名称を提唱した。1907 年に、Acchiote によって、Devic 病という名前も提唱され、以後、Neuromyelitis optica あるいは Devic 病として記載されていくことになった⁴⁾。その後約 100 年の間、視神経炎・脊髄炎の特徴、発症間隔、再発の有無等に基づき、各研究者によって異なる定義が用いられてきたが、1999 年に、Wingerchuk らが自験例をもとに、単相性・再発性を問わない診断基準案を提案し、これが近年の研究発展の基盤となった⁵⁾。この基準は、「視神経と脊髄」という病変分布以外の、NMO の特徴である、重篤な視力障害や運動障害、MRI における長大な (しばしば 3 椎体長を超える) 脊髄病変、などを明確にし、

1) 国立病院機構米沢病院神経内科
〒992-1202 山形県米沢市大字三沢26100-1

2) 東北大学大学院医学系研究科 多発性硬化症治療学講座
〒980-8574 仙台市青葉区星陵町1-1

1) Department of Neurology, Yonezawa National Hospital
(26100-1 Misawa, Yonezawa)

2) Department of Multiple Sclerosis Therapeutics,
Tohoku University Graduate School of Medicine
(1-1 Seiryō-cho, Aoba-ku, Sendai)

典型的な NMO の疾患概念はここで完成したと考えられる。

2. NMO-IgG (抗 AQP4 抗体) の発見

その後、病理学的に、液性免疫の関与が強く示唆されることも分かり、解析が進む中、2004 年に極めて特異性の高い自己抗体として、NMO-IgG が報告された⁶⁾。これは、マウスの中枢神経組織を患者血清で免疫染色すると、特異なパターンが検出されるというもので、NMO に対する感度は 73%、特異度は 91% と報告された。翌年に、その対応抗原がアクアポリン 4 (aquaporin-4 : AQP4) であることが分かり、抗 AQP4 抗体測定系の確立が相次ぐこととなった。東北大学で確立した、AQP4 発現細胞を用いた間接蛍光抗体法 (cell-based assay : CBA) では、血清抗 AQP4 抗体の NMO に対する感度は 91%、High-risk syndrome (NMO の部分症と考えられる症例群。現在では NMOSD の範疇に入る。) に対する感度は 85% で、特異度は 100% であった^{7,8)}。

3. 現行の NMO 診断基準

抗 AQP4 抗体陽性例の解析が進むと、抗体陽性例では大脳病変も稀ではなく、しばしば AQP4 の高発現部位 (視床下部・脳室周囲・脳幹の水道周囲など) に病変が出現することも分かってきた⁹⁾。1999 年の診断基準は、脳病変がないことを前提にしていたため、Wingerchuk らは 2006 年に診断基準案を改訂し、ここに NMO-IgG (抗 AQP4 抗体) も取り入れられた (表 1)¹⁰⁾。現時点では、これが NMO の診断基準として一般に用いられている。

4. NMO から NMOSD への発展

しかし、NMO の部分症と考えられる、視神経炎や脊髄炎単独例、あるいは、単独の脳病変例での抗体陽性例も多く、2006 年の基準だけで抗体陽性例を

議論するには明らかに不十分であった。また、病理学的な検討や、動物モデルによる検討により、抗 AQP4 抗体が単なる疾患マーカーではなく、中枢神経系への病原性を持つことも確定的となった。抗 AQP4 抗体が直接関与する NMO の発症機序は、1) 血中に何らかの理由で抗 AQP4 抗体が出現する。2) 抗 AQP4 抗体が何らかの理由で血液脳関門 (Blood-Brain Barrier : BBB) を越える。3) BBB を裏打ちしているアストロサイトの足突起には、AQP4 が高発現しており、complement-dependent cytotoxicity や antibody-dependent cellular cytotoxicity によりこれが傷害され、引き続き細胞浸潤・脱髄・壊死等により病変形成に至る^{11,12)}。なお剖検例の詳細な病理学的検討では、これとは別に補体沈着を伴わず、アストロサイトの細胞質の腫大、空胞化、突起の念珠状変化や崩壊、アポトーシス様の核の変化がみられる clasmatodendrosis など多彩な病理像が同一症例においてもみられることがわかっている¹³⁾。抗 AQP4 抗体陽性例のうち典型的な表現型が NMO であるが、その部分症や NMO に特徴的な脳病変を呈する症例も抗 AQP4 抗体が陽性であれば同一の疾患概念に含まれると考えられるようになった。そこで、2007 年に NMO 関連疾患 (Neuromyelitis optica spectrum disorders : NMOSD) という疾患概念が提示され (表 2)、以後、NMO とその部分症は主に NMOSD として記載されることとなった²⁾。ただし、この記載は「こういった例で抗 AQP4 抗体が陽性になり得る」というものであり、診断基準ではないため、その後の NMOSD の定義は研究者によって異なることに注意が必要である。実臨床では、①何らかの中枢神経病変があり、②抗 AQP4 抗体が陽性で、③その中枢神経病変が NMO あるいはその部分症として矛盾のない場合、NMOSD と診断され得る。なお、臨床型が NMOSD を示唆するにもかかわらず、抗 AQP4 抗体が陰性である症例群が存在し、sero-

表 1 視神経脊髄炎の 2006 年 Wingerchuk らの診断基準案

以下の (1)~(3) を満たす
(1) 視神経炎
(2) 急性脊髄炎
(2) 以下の補助基準のうち少なくとも 2 つを満たす
補助基準 1 : 3 椎体以上に連続する脊髄 MRI 病変を認める
補助基準 2 : 発症時の頭部 MRI が Paty らの多発性硬化症の診断基準 ¹⁾ を満たさない
補助基準 3 : 血清 NMO-IgG 陽性 ²⁾

1) 4 個以上の大脳白質病変、または、1 つが側脳室に接する場合は 3 個以上の大脳白質病変を認める。

2) 現在、この項目は「血清抗 AQP4 抗体陽性」で代用されることが一般的である。

表2 Neuromyelitis optica spectrum disorders

Neuromyelitis optica
Limited forms of neuromyelitis optica
・ Idiopathic single or recurrent events of longitudinally extensive myelitis (≥ 3 vertebral segment spinal cord lesion seen on MRI)
・ Optic neuritis: recurrent or simultaneous bilateral
Asian optic-spinal multiple sclerosis
Optic neuritis or longitudinally extensive myelitis associated with systemic autoimmune disease
Optic neuritis or myelitis associated with brain lesions typical of neuromyelitis optica (hypothalamic, corpus callosal, periventricular, or brainstem)

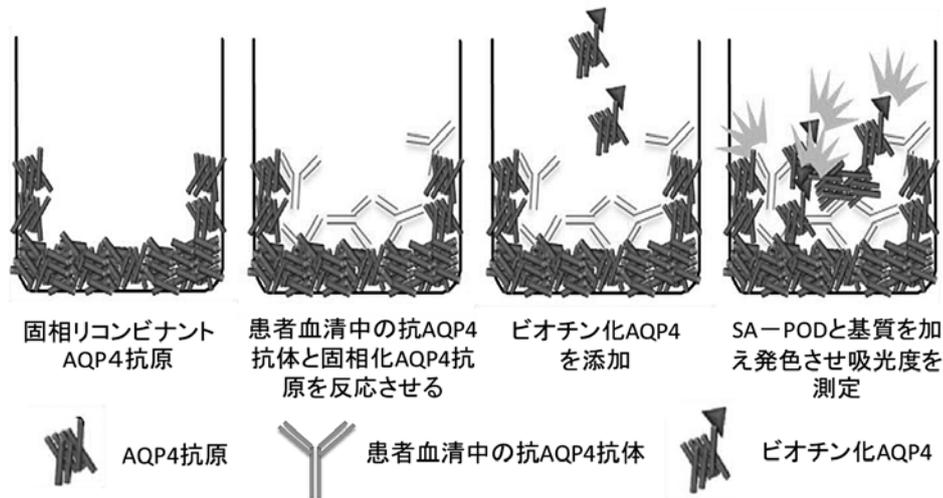


図1 ELISA測定原理

negative NMOSD と呼ばれる。この seronegative NMOSD の一部で、血清抗 MOG 抗体が陽性になることが分かっており、今後さらに検討を要する^{14,15)}。現在、国際委員会により新たな NMOSD の診断基準が検討されている。

Ⅱ . 抗アクアポリン 4 抗体測定

前述の通り、今回、ELISA による抗 AQP4 抗体測定が保険収載されたが、国内ではこれまで主に CBA による検査が行われてきた。実臨床上、CBA と ELISA の感度・特異度の違いも問題になると想定され、まず、CBA および ELISA の概要について述べ、各感度・特異度について述べる。

1. Cell-based assay (CBA)

AQP4 発現細胞を用いた間接蛍光抗体法による測定法である。抗 AQP4 抗体検査系としては、2006 年に筆者らが最初に報告しており、生きた細胞のまま抗原抗体反応を行うことで、高い精度の検査となった^{7,8)}。当初は抗原として M1-AQP4 を用いてい

たが、その後の知見で、M23-AQP4 を用いた方が、より精度が高くなることが確定的となり、2012 年からは M23-AQP4 を抗原として用いている¹⁶⁾。なお、M1-AQP4 は 1 番目のアミノ酸から、M23-AQP4 は 23 番目のアミノ酸から翻訳されている、splicing variant である。M23-AQP4 は M1-AQP4 と異なり、細胞膜上で集簇した Orthogonal arrays particles (OAPs) と呼ばれる構造を作るが、この OAPs の有無が抗 AQP4 抗体の親和性の差異に寄与していると考えられている¹²⁾。

2. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

今回保険適用となったのは、イギリスの RSR 社によって開発され、コスミック社が輸入販売、あるいは受託測定していた ELISA キットである（今後の実際の測定は SRL 社、および、三菱化学メディエンス社で行われる）。AQP4 抗原と患者血清の反応後、ビオチン化 AQP4 を添加し、Streptavidin-Peroxidase (SA-POD) と基質を反応させることで発色させ、その吸光度を測定する（図 1）。患者血清の抗体を AQP4 抗原で挟み込む形で検出する、ブリッ

表3 保険収載されたELISAによる抗アクアポリン4抗体測定

保険適用日	平成25年11月1日
測定項目	抗アクアポリン4抗体
測定方法	酵素免疫測定法(ELISA法)
主な測定目的	血清中の抗アクアポリン4抗体の測定(視神経脊髄炎の診断の補助)
保険点数	1,000点
区分	「D014」自己抗体検査の26
判断料	免疫学的検査判断料 144点
留意事項	抗アクアポリン4抗体は、ELISA法により、視神経脊髄炎の診断(治療効果判定を除く。)を目的として測定した場合に算定できる。

ジ型のELISAである¹⁷⁻¹⁹⁾。現時点では、用いられている抗原はM1-AQP4である。保険診療としては、視神経脊髄炎の診断目的で測定した場合に算定でき、保険点数は1,000点である(表3)。

3. CBAとELISAの感度・特異度

CBAおよびELISAの感度・特異度については、さまざまな報告があるが、名称として同じCBAあるいはELISAであっても、各施設で検査や臨床診断の精度が異なる可能性があり、単純な比較は困難である。今のところ、最も信頼性が高いと考えられるのは、2012年に報告されたWatersらの検討で、同一検体群が複数の方法で測定され、各測定法の感度・特異度が比較されている。これによると、NMOSDに対する各検査の感度は、通常のCBAが73%、EUROIMMUN社のCBAキットが68%、RSR社のELISAが60%で、特異度はそれぞれ100%であった²⁰⁾。自験例も併せて考えると¹⁶⁾、東北大学で行われてきたCBAを基準とした場合、保険適用となったRSR社ELISAの感度は20%程度低くなることが予想され、特異度もやや低くなることが予想される。

おわりに

かつて病変分布によって規定されたNMOという疾患概念は、近年の目覚ましい研究発展により、抗AQP4抗体によって惹起される中枢神経病変、NMOSDへと大きく変貌した。これにより、抗AQP4抗体測定は、日常臨床で必須のものとなり、広範に検査が行われることとなった。今回、ELISAによるNMO診断目的での抗AQP4抗体測定が保険収載され、検査提出が容易になった。ELISAは国内の従来法であるCBAと比較して、感度・特異度は

劣る可能性があるものの、依頼者としては、検査提出がより容易になり、測定者としても、多くの検体を一度に定量的に測定することができるという利点がある。また、ELISA施行後に希望がある場合、有償ではあるが、コスミック社において、東北大学から技術提供されたCBAを行う態勢も取られている。今後、これらの検査が、NMOSDや他の炎症性中枢神経病変の診療向上に寄与することが期待される

文 献

- 1) Papadopoulos MC, Verkman AS. Aquaporin water channels in the nervous system. *Nat Rev Neurosci.* 2013 ; **14** (4): 265-277.
- 2) Wingerchuk DM, Lennon VA, Lucchinetti CF, Pittock SJ, Weinshenker BG. The spectrum of neuromyelitis optica. *Lancet Neurol.* 2007 ; **6**(9): 805-815.
- 3) Jacob A, McKeon A, Nakashima I, Sato DK, Elson L, Fujihara K, de Seze J. Current concept of neuromyelitis optica (NMO) and NMO spectrum disorders. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2013 ; **84** (8): 922-930.
- 4) 藤原一男, 宮澤イザベル, 中島一郎, 三須建郎, 藤盛寿一. Neuromyelitis optica (Devic病) 原典とその今日的意義. *神経内科.* 2002 ; **56**(4): 306-311.
- 5) Wingerchuk DM, Hogancamp WF, O'Brien PC, Weinshenker BG. The clinical course of neuromyelitis optica (Devic's syndrome). *Neurology.* 1999 ; **53**(5): 1107-1114.
- 6) Lennon VA, Wingerchuk DM, Kryzer TJ, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Fujihara K, Nakashima I, Weinshenker BG. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet.* 2004 ; **364** (9451): 2106-2112.
- 7) Takahashi T, Fujihara K, Nakashima I, Misu T, Miyazawa I, Nakamura M, Watanabe S, Ishii N, Itoyama Y. Establishment of a new sensitive assay for anti-human aquaporin-4 antibody in neuromyelitis optica. *Tohoku J Exp Med.* 2006 ; **210**(4): 307-313.
- 8) Takahashi T, Fujihara K, Nakashima I, Misu T, Miyazawa I, Nakamura M, Watanabe S, Shiga Y, Kanaoka C, Fuji-

- mori J, Sato S, Itoyama Y. Anti-aquaporin-4 antibody is involved in the pathogenesis of NMO : a study on antibody titre. *Brain*. 2007 ; **130**(5): 1235-1243.
- 9) Pittock SJ, Weinshenker BG, Lucchinetti CF, Wingerchuk DM, Corboy JR, Lennon VA. Neuromyelitis optica brain lesions localized at sites of high aquaporin 4 expression. *Arch Neurol*. 2006 ; **63**(7): 964-968.
 - 10) Wingerchuk DM, Lennon VA, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Weinshenker BG. Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica. *Neurology*. 2006 ; **66**(10): 1485-1489.
 - 11) Fujihara K, Misu, Nakashima I, Takahashi T, Bradl M, Lassmann H, Takano R, Nishiyama S, Takai Y, Suzuki C, Sato D, Kuroda H, Nakamura M, Fujimori F, Narikawa K, Sato S, Itoyama Y, Aoki M. Neuromyelitis optica should be classified as an astrocytopathic disease rather than a demyelinating disease. *Clin Exp Neuroimmunol*. 2012 ; **3**: 58-73.
 - 12) Ratelade J, Verkman AS. Neuromyelitis optica : aquaporin-4 based pathogenesis mechanisms and new therapies. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012 ; **44**(9): 1519-1530.
 - 13) Misu T, Höftberger R, Fujihara K, Wimmer I, Takai Y, Nishiyama S, Nakashima I, Konno H, Bradl M, Garzuly F, Itoyama Y, Aoki M, Lassmann H. Presence of six different lesion types suggests diverse mechanisms of tissue injury in neuromyelitis optica. *Acta Neuropathol*. 2013 ; **125**: 815-827.
 - 14) Reindl M, Di Pauli F, Rostásy K, Berger T. The spectrum of MOG autoantibody-associated demyelinating diseases. *Nat Rev Neurol*. 2013 ; **9**(8): 455-461.
 - 15) Sato DK, Callegaro D, Lana-Peixoto MA, Waters PJ, Jorge FM, Takahashi T, Nakashima I, Apostolos-Pereira SL, Talim N, Simm RF, Lino AM, Misu T, Leite MI, Aoki M, Fujihara K. Distinction between MOG antibody-positive and AQP4 antibody-positive NMO spectrum disorders. *Neurology*. 2014 ; **82**(6): 474-481.
 - 16) Sato DK, Nakashima I, Takahashi T, Misu T, Waters P, Kuroda H, Nishiyama S, Suzuki C, Takai Y, Fujihara K, Itoyama Y, Aoki M. Aquaporin-4 antibody-positive cases beyond current diagnostic criteria for NMO spectrum disorders. *Neurology*. 2013 ; **80**(24): 2210-2216.
 - 17) 谷口崇, 鈴木智子, 駒形美穂, 板橋光春, 菊地強, 田中愛. ELISA法による抗アクアポリン4抗体測定キット(コスミック社)の基礎的検討. *医学と薬学*. 2012 ; **68**(1): 139-142.
 - 18) Chen Shu, Furmaniak Jadwiga, Smith Bernard Rees. 視神経脊髄炎におけるアクアポリン-4抗体(Aquaporin-4 antibodies in neuromyelitis optica). *Medical Science Digest*. 2012 ; **38**(14): 662-669.
 - 19) 松下拓也, 宮本 勝一, 吉良 潤一. ELISAによる抗アクアポリン4抗体測定キットの基礎的・臨床的検討. *医学と薬学*. 2013 ; **70**(4): 821-827.
 - 20) Waters PJ, McKeon A, Leite MI, Rajasekharan S, Lennon VA, Villalobos A, Palace J, Mandrekar JN, Vincent A, Bar-Or A, Pittock SJ. Serologic diagnosis of NMO : a multi-center comparison of aquaporin-4-IgG assays. *Neurology*. 2012 ; **78**(9): 665-671.