

Table 2 The distribution of exon 6 alleles of ICAM-1 in MS and healthy controls

	n	Genotype			P value	Allele Frequency		
		C/C	C/T	T/T		Allele C	Allele T	P value
Controls	98	21(21.4)	38(38.8)	39(39.8)		40.8%	59.2%	
MS	93	12(12.9)	39(41.9)	42(45.2)	0.29	33.9%	66.1%	0.32
Asian	46	6(13.0)	19(41.3)	21(45.7)	0.48	33.7%	66.3%	0.41
Western	47*	6(12.8)	20(42.6)	21(44.7)	0.45	34.0%	66.0%	0.43
1501(+)	24	5(20.8)	11(45.8)	8(33.3)	0.80	43.8%	56.3%	0.79

P value was calculated by χ^2 test with a 2x3 contingency table(genotype) and a 2x2 table(allele).

* The data were not obtainable in two patients.

Asian-type vs Western-type MS; $\chi^2=0.015$, $P=0.99$.(2x3 contingency table).

Table 3 Distribution of AIF-1 polymorphism in MS, and healthy controls

	n	Genotypes			P value	Frequencies		
		Allele T/T (%)	C/T (%)	C/C (%)		Allele T (%)	Allele C (%)	P value
Controls	82	34(41.5)	39(47.5)	9(11.0)		65.2%	34.8%	
MS	95	52(54.7)	35(36.8)	8(8.4)	0.21	73.2%	26.8%	0.25
Asian	45	20(44.4)	21(46.7)	4(8.9)	0.91	67.8%	32.2%	0.77
Western	50	32(64.0) ^a	14(28.0)	4(8.0)	<u>0.041</u>	78.0%	22.0%	0.12
1501-	36	24(66.7) ^b	8(22.2)	4(11.1)	<u>0.026</u>	77.8%	22.2%	0.18

Allele C has a digestion of AciI

1501- Those who belong to Western type of MS and, at the same time, do not have a DRB1*1501 allele

^a Significantly increased compared with Controls $\chi^2=6.31$, $P_u=0.012$, $P_c=0.036$ (2x2 table)

^b Significantly increased compared with Controls $\chi^2=6.36$, $P_u=0.0117$, $P_c=0.035$ (2x2 table)

多発性硬化症と CTLA-4 遺伝子多型との関連

深澤 俊行¹⁾ 菊地 誠志²⁾ 柳川達生³⁾ 濱田 毅¹⁾ 田代 邦雄²⁾

目 的

多発性硬化症 (MS) 患者の CTLA4 遺伝子多型を分析し、疾患感受性、臨床経過、MRI 所見、髄液オリゴクローナルバンド (OCB)、HLA 背景などとの関連を検討する。

対 象

臨床的に診断確実な再発寛解型あるいは二次的進行型 MS 患者 (Poser et al, 1982) のうち 74 例を対象とした。神経症状が視神経および脊髄に局限した視神経脊髄型 MS および視神経炎のみ、脳幹症状のみ、横断性脊髄炎のみを再発する例、また、経過中に急性横断性脊髄症 (ATM) を呈した例 (Fukazawa et al 1990) は除外した。対照は健常ボランティア 93 名を用いた。

方 法

CTLA4 遺伝子の exon 1 内 nt49 A/G single nucleotide 多型を PCR-RFLP にて分析した。頭部 MRI は、臨床症状の情報を有さない同一の神経放射線科医が、既に報告した方法 (Fukazawa et al 1992) にて分析し、その結果をもとに、大脳白質病変の程度を mild と severe の 2 段階に分類した。HLA typing は、INNO-LiPA HLA kit (INNOGENETICS) を用いて DRB1, DRB3,4,5, DQB1, DPB1 について分析した。OCB は保存されていた血清・髄液ペアをもとに、臨床症状の情報を有さない経験豊富な検査技師 (カナダ) が検討した。統計学的処理には chi-square test あるいは Fisher's exact test、Student's t test、Mann-Whitney test を適宜用いて検討した。

結 果

今回検討した CTLA4 遺伝子多型の genotype, allele および phenotype frequency は患者-対照間で差はなかった (表 1)。罹病期間 10 年以上では、A allele を homozygous に有する群 (AA) が他の群より EDSS が

高い傾向にあり ($p=0.0586$)、また、EDSS>6 の高度障害例は AA で他の群より有意に高率 ($p=0.0072$) であった (表 2)。A allele を有する群 (AA または AG) では、MRI 所見が severe と分類された症例が有意に多かった ($p=0.0310$) (表 3)。A allele を有する群はそれ以外の群に比して OCB 陽性率が有意に高かった ($p=0.0128$) (表 4)。

表 1. CTLA-4 exon 1 polymorphism in MS patients and controls

	MS n=74	Controls n=93
Genotype frequency		
GG	29 (39.2%)	38 (40.9%)
GA	36 (48.6%)	38 (40.9%)
AA	9 (12.2%)	17 (18.3%)
Allele frequency		
G	94 (63.5%)	114 (61.3%)
A	54 (36.5%)	72 (38.7%)
Phenotype frequency		
G	65 (87.8%)	76 (81.7%)
A	45 (60.8%)	55 (59.1%)

Genotype, allele and phenotype frequencies were similar in MS patients and controls

表 2. CTLA-4 exon 1 polymorphism and disability in MS patients

	Duration > 10 years	
	EDSS≤6 n=20	EDSS>6 n=14
Genotype frequency		
GG	8 (40.0%) ^a	5 (35.7%) ^a
GA	12 (60.0%) ^a	4 (28.6%) ^a
AA	0 (0.0%) ^a	5 (35.7%) ^a
Allele frequency		
G	28 (70.0%)	14 (50.0%)
A	12 (30.0%)	14 (50.0%)
Phenotype frequency		
G	20 (100%) ^b	9 (64.3%) ^b
A	12 (60.0%)	9 (64.3%)

aP = 0.0166, bP = 0.0072

1) 北祐会神経内科病院
2) 北海道大学神経内科
3) 練馬総合病院内科

表3. CTLA-4 exon 1 polymorphism and MRI findings in MS patients

	Mild grade n=16	Severe grade n=58
Genotype frequency		
GG	10 (62.5%) ^a	19 (32.8%) ^a
GA	6 (37.5%) ^a	30 (51.7%) ^a
AA	0 (0.0%) ^a	9 (15.5%) ^a
Allele frequency		
G	26 (81.3%) ^b	68 (58.6%) ^b
A	6 (18.7%) ^b	48 (41.4%) ^b
Phenotype frequency		
G	16 (100%) ^c	49 (84.5%) ^c
A	6 (37.5%) ^d	39 (67.2%) ^d

aP = 0.0541

bP = 0.0186 (X² = 5.542, Odds ratio = 3.06, 95%CI = 1.21-7.76)

cP = 0.1910

dP = 0.0310 (X² = 4.655, Odds ratio = 3.42, 95%CI = 1.12-10.4)

表4. CTLA-4 exon 1 polymorphism and OCB positivity in MS patients

	OCB(+) MS n=27	OCB(-) MS n=23
Genotype frequency		
GG	6 (22.2%) ^a	13 (56.5%) ^a
GA	16 (59.3%) ^a	7 (30.5%) ^a
AA	5 (18.5%) ^a	3 (13.0%) ^a
Allele frequency		
G	28 (51.9%) ^b	33 (71.7%) ^b
A	26 (48.1%) ^b	13 (28.3%) ^b
Phenotype frequency		
G	22 (81.5%)	20 (87.0%)
A	21 (77.8%) ^c	10 (43.5%) ^c

aP = 0.0424

bP = 0.0421 (X² = 4.130, Odds ratio = 2.35, 95%CI = 1.03-5.35)

cP = 0.0128 (X² = 6.202, Odds ratio = 4.55, 95%CI = 1.38-14.9)

考 察

MSの発症/増悪には、活性化された自己反応性T細胞が関与すると想定されている。CTLA4は活性化T細胞のapoptosisに関与するT細胞上の分子と考えられており、免疫異常の進展経過に影響する可能性がある。CTLA4遺伝子多型が疾患感受性には関連を認めず、MRIの重症度および一定期間経過後の障害度と関連するとの我々の検討結果はこの点からも興味深い。すなわち、A alleleが疾患の進展に促進的に働く因子である可能性が示唆され

る。OCB陽性のMSでA alleleが多いとの結果は、予後とOCBとの関連からの間接的な結果であるとも考えられる。しかし、OCBの有無はMSの予後に関連しないとのわれわれの報告 (Fukazawa et al. 1998) を考慮すると、CTLA-4遺伝子多型の相違自体がOCBの発現に関与している可能性もある。

ま と め

CTLA4 遺伝子多型はMSの進展・予後、さらには髄液OCBの発現に影響する可能性があり、他集団での確認が必要である。

文 献

- 1) Waterhouse P et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4. *Science* 270: 985-988, 1996
- 2) Chambers CA et al. The role of CTLA-4 in the regulation of T-cell responses. *Immunol Rev* 153: 27-46, 1996
- 3) Walunas TL et al. CTLA-4 can function as a negative regulator of T-cell activation. *Immunity* 1: 405-413, 1994
- 4) Yanagawa T et al. CTLA-4 gene polymorphism associated with Graves' disease in a Caucasian population. *J Clin Endocrinol Metab* 80: 41-45, 1995
- 5) Yanagawa T et al. CTLA-4 gene polymorphism confers susceptibility to Graves' disease in Japanese. *Thyroid* 7: 843-846, 1997
- 6) Huang Det al. Genetic association of Ctla-4 to myasthenia gravis with thymoma. *J Neuroimmunol* 88: 192-198, 1998
- 7) Poser CM et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 13: 227-231, 1983
- 8) Buyse I et al. Rapid DNA typing of class II HLA antigens using the polymerase chain reaction and reverse dot blot hybridization. *Tissue Antigens* 41: 1-14, 1993
- 9) Fukazawa T et al. MRI findings of multiple sclerosis with acute transverse myelopathy. *J Neurol Sci* 110: 27-31, 1992
- 10) Fukazawa T et al. The significance of oligoclonal bands in multiple sclerosis in Japan: Relevance of immunogenetic background. *J Neurol Sii* 158: 209-214, 1998
- 11) Pender MP. Genetically determined failure of activation-induced apoptosis of autoreactive T cells as a cause of multiple sclerosis. *Lancet* 351:978-981, 1998

HLA-DPB1*0501 関連視神経脊髄型多発性硬化症の免疫学的特徴と患者生年からみた日本人の多発性硬化症病像の変化

吉良 潤一 河野 祐治 堀内 泉 三野原 元澄
呉 暁牧 原 英夫 山崎 賢智 西村 泰治

目 的

私どもは昨年日本人多発性硬化症 (MS) 患者では視神経脊髄型 MS が有意に HLA-DPB1*0501 と相関すること (93%陽性) を初めて明らかにした¹⁾。一方、視神経・脊髄以外にも中枢神経系に多巣性に病巣を認める西洋型 MS は日本人でもコーカシア系白人同様に HLA-DRB1*1501 と有意に相関することを私どもは報告している²⁾。両者は免疫遺伝学的な背景が異なっていることから、今回は両者の免疫学的な差異を明らかにすることを第 1 の目的とした。

さらに、近年我が国ではアトピー性疾患が激増している。これは高度成長期以降の食住環境の欧米化がアトピーを起こさせやすくしているといえる。アトピーはヘルパー T 細胞の中でも Th 2 細胞が優位な状態であることから、日本人の若い世代では免疫応答がそれ以前の世代に比し Th 2 優位な状態へ変化している可能性がある。このような変化が日本人の MS 病像を変化させているか明らかにすることを第 2 の目的とした。

方 法

1. 免疫学的研究

1) 末梢血 CD4 陽性 T 細胞内 Th1 型及び Th 2 型サイトカイン産生を、PMA と ionomycin 刺激後 IFN γ 、IL-4 に対するモノクローナル抗体で染色してフローサイトメトリ法で測定した。

2) 末梢血 CD4 陽性 T 細胞上の chemokine receptor, homing receptor をフローサイトメトリ法で測定した。検索したものは、Th1 細胞に発現する CCR5, Th 2 細胞に発現する CXCR4, リンパ節への homing receptor である CD62L, 皮膚への homing receptor である CLA (cutaneous lymphocyte associated antigen) 等である。

九州大学医学部神経内科

3) 末梢血より人工合成したミエリン蛋白ペプチドを刺激抗原として反応する T 細胞株を樹立した。

2. 臨床的研究

1964年6月から1998年10月までの34年5ヶ月間に当科で入院精査された臨床的に確実なMS患者143名 (Poserらの基準による)の臨床記録を、一人の神経内科医 (吉良) が一貫して評価し、病型分類した。脊髄型MSや再発のないDevic 症候群はMS以外の可能性があるので除外した。

結 果

1. 免疫学的研究

1) 視神経脊髄型MSは IL-4⁻/IFN γ ⁺ CD4 陽性 T 細胞が健常対照より有意に増加しており、このため CD4 陽性 T 細胞の IFN γ /IL-4 比が高値 (Th1 優位) となっていた (表 1)。西洋型 MS では健常対照と差がなかった。HAM は IL-4⁺/IFN γ ⁻ 細胞が優位に減ることで IFN γ /IL-4 比が高値となっていた。

2) 視神経脊髄型MSは健常対照及び西洋型MSに比し CD4⁺CD45RO⁺細胞 (メモリー T 細胞) と CD4⁺CD45RA⁺CCR5⁺細胞 (Th1細胞) が有意に増加していた (表 2, 3)。

3) ミエリン蛋白反応性 T 細胞株は視神経脊髄型 MS 11 人中6人で、西洋型 MS 8 人中3人で樹立された (表 4)。特に視神経脊髄型MSは myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) 反応性 T 細胞株の頻度が西洋型MSや健常者に比し高かった。

2. 臨床的研究

143名のうち視神経脊髄型は52名、西洋型は91名だった。生年別にみると1920年代生まれでは西洋型が著しく少なかった。1930年代から1950年代生まれまでは両病型の比率はほぼ一定しているが、1960年代生まれになって急に西洋型の比率が増加していた (1930-1950年代生まれに比し有意に高値) (表 5)。1950-69年、1970-1984年、1985-1998年の3期に発病年代を分けてみると (表 6)、

西洋型は各年代で初発年齢、性比に有意差がないのに対し、視神経脊髄型は次第に初発年齢が高く、女性の割合が多くなっていった。特に1985-1998年の発病者はそれ以前に比し有意に初発年齢が高く、女性の割合が多かった。

考 察

今回の検索により各種炎症性中枢神経疾患の中でも視神経脊髄型MSは、サイトカイン産生パターンからみても、リンパ球表面抗原からみても顕著にTh1細胞優位であることが明らかとなった。この型のMSもミエリン蛋白反応性T細胞株が樹立可能なことから、西洋型MSとは異なるHLA分子により規定された、Th1細胞による自己免疫疾患の可能性が考えられる。著明なTh1へのバイアスはこの型のMSが頻回に再発し、早期に重症化し易いことに寄与している可能性がある。

視神経脊髄型と西洋型の比率は1930年代から1950年代生まれまで（少なくとも第一次ベビーブームまで）は変化がないが、1960年代以降急に西洋型の比率が高くなっ

ている点が注目される。このことは、我が国で1960年代に始まった高度成長期以降の豊かで欧米化された食住環境下で幼小児期を過ごしたことが、西洋型MSを増し、重症の視神経脊髄型MSを減らす方向に影響を及ぼしたことを示唆する。

結 論

視神経脊髄型MSはHLA-DPB1*0501遺伝子により規定されたTh1 disease と考える。アトピーが激増している我が国の若年世代では、視神経脊髄型MSは減少する方向にある。一方、西洋型MSが増加しつつあることは、本病型にはTh2細胞の関与など何らかの視神経脊髄型MSとは異なる発症メカニズムが関与している可能性を示唆する。

文 献

- 1) Ito H, et al. Tissue Antigen 52:179-182, 1998.
- 2) Kira J, et al. Ann Neurol 40:569-574, 1996.

表 1. CD4 陽性 T細胞 IFN γ および IL-4産生細胞の割合

	IL-4 ⁺ /IFN γ ⁻	IL-4 ⁻ /IFN γ ⁺	IL-4 ⁺ /IFN γ ⁺	IL-4 ⁻ /IFN γ ⁻	IFN γ /IL-4比
多発性硬化症					
全患者 (n=40)	2.52 \pm 1.35	21.5 \pm 9.44	2.05 \pm 1.36	74.0 \pm 10.2	10.7 \pm 6.77*
視神経脊髄型 (N=17)	2.36 \pm 1.04	23.3 \pm 8.40*	2.39 \pm 1.56	71.9 \pm 8.84*	12.8 \pm 8.64*
西洋型 (n=23)	2.64 \pm 1.55	21.0 \pm 10.1	1.80 \pm 1.16	75.5 \pm 11.1	9.14 \pm 4.58
HAM (n=23)	2.03 \pm 1.10*	17.7 \pm 8.55	2.10 \pm 1.70	78.2 \pm 9.48	12.5 \pm 10.2*
脊髄炎 (n=22)	3.31 \pm 1.15	16.7 \pm 5.49	2.12 \pm 1.63	77.9 \pm 6.47	5.38 \pm 1.79*
変性性神経疾患 (n=23)	3.28 \pm 1.52	18.6 \pm 5.15	2.16 \pm 1.25	76.0 \pm 6.63	7.01 \pm 3.88
健常対照 (m=36)	2.89 \pm 1.29	18.3 \pm 6.27	1.88 \pm 0.96	76.9 \pm 6.87	7.38 \pm 4.70

* P<0.05 (健常対照との比較)

表 2. リンパ球サブセットの比較

	アジア型MS (n=15)	西洋型MS (n=16)	健常対照 (n=20)
CD3 ⁺	73.8 \pm 9.1 †	70.2 \pm 7.4 †	59.7 \pm 9.0
CD4 ⁺	42.7 \pm 6.1 †	42.1 \pm 7.5 †	37.2 \pm 5.9
CD8 ⁺	37.9 \pm 7.3 †	35.2 \pm 6.2	32.9 \pm 5.4
CD25 ⁺	6.2 \pm 3.9	6.7 \pm 3.4	5.8 \pm 4.1
CD3 ⁺ /CD4 ⁺	40.5 \pm 6.0 †	40.3 \pm 7.0 †	33.3 \pm 6.5
CD3 ⁺ /CD8 ⁺	31.7 \pm 8.8 †	28.2 \pm 6.9	25.1 \pm 6.2
CD4 ⁺ /CD25 ⁺	6.0 \pm 4.0	6.3 \pm 3.6	6.1 \pm 4.3
CD4 ⁺ /CD45RO ⁺	29.4 \pm 7.7 ††	24.0 \pm 5.2	22.1 \pm 3.2

† P<0.05 (健常対照との比較)

†† P<0.05 (アジア型MSと西洋型MSの比較)

表 3. メモリーT細胞サブセットの比較

	アジア型MS (n=15)	西洋型MS (n=16)	健常対照 (n=20)
CD4 ⁺ /CD45RA ⁺ /CCR5 ⁺ (Th1)	7.3 \pm 2.9 ††	4.5 \pm 2.6	3.5 \pm 1.3
CD4 ⁺ /CD45RA ⁺ /CCR5 ⁻	16.0 \pm 6.9	15.0 \pm 4.7	15.1 \pm 2.6
CD4 ⁺ /CD45RA ⁺ /CXCR4 ⁺ (Th2)	7.8 \pm 3.1 †	6.5 \pm 5.0	4.7 \pm 1.5
CD4 ⁺ /CD45RA ⁺ /CXCR4 ⁻	15.2 \pm 6.8	13.1 \pm 5.7	13.6 \pm 2.5
CD4 ⁺ /CD45RO ⁺ /CD62L ⁺	18.4 \pm 6.6 †	15.5 \pm 4.8	14.8 \pm 3.1
CD4 ⁺ /CD45RO ⁺ /CD62L ⁻	11.0 \pm 4.9 †	9.0 \pm 3.9	7.3 \pm 2.3
CD4 ⁺ /CD45RO ⁺ /CLA ⁺	6.0 \pm 3.2	5.7 \pm 3.3	5.1 \pm 1.2
CD4 ⁺ /CD45RO ⁺ /CLA ⁻	23.8 \pm 6.5 †	19.1 \pm 4.3	16.2 \pm 3.5

† P<0.05 (健常対照との比較)

†† P<0.05 (アジア型MSと西洋型MSの比較)

表 4. 髄鞘蛋白特異的T細胞株の樹立頻度と反応抗原

	アジア型MS	西洋型MS	健常対照
MBP	3/11 (27 %)	3/8 (38 %)	0/6 (0 %)
PLP	3/11 (27 %)	2/8 (25 %)	2/6 (33 %)
MOG	6/11 (55 %)	2/8 (25 %)	1/6 (17 %)
合 計	6/11 (55 %)	3/8 (38 %)	2/6 (33 %)

表 5. 生年別にみた視神経脊髄型MSと西洋型MSの比率の変遷

生 年	視神経脊髄型	西洋型	視神経脊髄型：西洋型
1920年代	12 (9)	6 (2)	1:0.5 (1:0.22)
1930	11 (7)	14 (5)	1:1.27 (1:0.71)
1940	11 (7)	18 (8)	1:1.64 (1:1.14)
1950	10 (6)	17 (5)	1:1.7 (1:0.83)
1960	6 (2)	28 (12)	1:4.67 (1:6)
1970年以降	2 (0)	8 (1)	1:4

() 内はEDSS5以上の重症患者数と重症患者にしめる視神経脊髄型と西洋型の比率を示す

表 6. MS患者の発病年代別にみた初発年齢と性比

発病年代	初発年齢 (歳)		性比 (男対女)	
	視神経脊髄型 (n)	西洋型 (n)	視神経脊髄型 (n)	西洋型 (n)
1950-1969年	28.5±9.0 (10)	27.8±9.1 (10)	1:1.5 (10)	1:1 (10)
1970-1984	33.6±13.3 (28)	30.1±9.2 (31)	1:2.5 (28)	1:1.38 (31)
1985-1997	42.4±13.5 (14)	29.7±11.7 (50)	1:3.67 (14)	1:1.78 (50)

アトピーを基盤にした脊髄炎・末梢神経炎の存在とその 動物モデル作製の試み

吉良潤一 堀内 泉、 河野祐治、 呉 暁牧、 山崎賢智

目 的

私どもは各種中枢神経疾患で系統的に血清IgEを測定し、脊髄炎患者でのみ有意に健常対照より血清全IgE値とダニ特異的IgEの陽性率が高いことから、高IgE血症とダニ特異的IgEを伴う脊髄炎をアトピー性脊髄炎(atopic myelitis)として報告した¹⁾⁴⁾。このうちアトピー性皮膚炎(atopic dermatitis, 以下ADと略す)を伴う脊髄炎患者が一定の病像をとることを既に明らかにしている。今回はADを伴わないが高IgE血症とダニ特異的IgEが陽性の脊髄炎患者の臨床像を明らかにすることを第1の目的とした。第2に炎症性末梢神経疾患でダニアトピーの関与があるものはないか明らかにすることを目的とした。第3にアトピーの脊髄炎への関与を証明するため、動物モデルの作製を試みた。

方 法

1. 脊髄炎臨床像の比較

1979年から1998年までの20年間に当科で精査された急性または亜急性発症の脊髄炎・脊髄症患者65例の臨床記録を調査し、ADや気管支喘息(bronchial asthma, 以下BA)の合併の有無を調べた。これらのうち、以下の3群の臨床像を比較した。(1)AD合併脊髄炎群:1994年以降に経験したADを合併している脊髄炎患者14名、(2)AD非合併で高IgE血症を伴う脊髄炎群:1997年1月から1998年10月までの22ヶ月間に当科で経験した明瞭な再発のない原因不明に脊髄炎患者17例のうち高IgE血症(>250U/ml)の認められた11名、(3)AD非合併で高IgE血症のない脊髄炎群:前記のうち高IgE血症のない6例と1991年から1996年までの自験脊髄炎例のうち急性期に高IgE血症がないことを確認し得た5例をあわせた1例。

2. 炎症性末梢神経疾患における血清IgEの測定

各種末梢神経炎91例、変性性神経疾患43例、健常対照82例で血清全IgE、アレルギー特異的IgEをELISA法により測定した。各群で検査時年齢に有意差はない。

3. 動物モデル作製の試み

NC系マウスはコンベで飼育するとアトピー性皮膚炎を自然発症する。これはマウスのダニが原因と推測されているが、確証はない。私どもはヒトのダニアレルゲンでアトピーを起こさせるためにSPF環境下で9週齢のNCマウスをヤケヒョウヒダニ、コナヒョウヒダニ、ケナガコナダニの粗抽出抗原とアラム(Th2細胞を誘導するアジュバント)で感作後1年3ヶ月間臨床的に観察した。

結 果

1. 脊髄炎臨床像の比較

私どもの報告後に最近当院皮膚科から紹介されたAD合併脊髄炎例9例を除いた56例について1979-1998年まで5年ごとの脊髄炎患者数を表1に示す。最近5年間で脊髄炎患者数が急増しており、特にADまたはBA合併例が増加していた。表2にAD合併脊髄炎群、AD非合併脊髄炎で高IgE血症群と正IgE血症群の3群に分けて臨床所見を示す。

AD合併例およびAD非合併で高IgE血症の脊髄炎例はAD非合併で正IgE血症の脊髄炎より有意に血清全IgE値、ヤケヒョウヒダニ特異的IgE陽性率、コナヒョウダニ特異的IgE陽性率が高かった。AD非合併で高IgE血症を呈した脊髄炎例の中に4例の気管支喘息の合併がみられた。AD合併脊髄炎例、AD非合併で高IgE血症を伴う脊髄炎例では約半数で軽度の好酸球増多を認めた。AD合併脊髄炎例は臨床的にも、MRI上も頸髄病巣が多いのに対し、AD非合併で高IgE血症を伴う脊髄炎は胸髄病巣が多かった。AD合併脊髄炎例、AD非合併で高IgE血症を伴う脊髄炎はすべて部分的な脊髄症候を呈し、EDSSが4以上の重篤なものではなかった。AD合併脊髄炎例では髄液細胞増多を呈したものはなく、AD非合併で高IgE血症を伴うものでも髄液細胞増多の頻度は低かった。これら2群では約半数で副腎皮質ステロイド剤が無効だった。これに対して、気管支喘息合併例は(1)非対称性の部分的な脊髄症候、(2)前角運動ニューロン障害の存在、(3)脊髄障害の回復に乏しい、(4)髄液細胞増多が少ない等の点の特徴だった

(表3)。

2. 各種末梢神経炎におけるIgE応答

Guillain-Barre 症候群 (GBS)と多発単神経炎は健常対照に比し有意に血清全 IgE値、ヤケヒョウヒダニ特異的 IgE陽性率が高かった (表4)。また慢性脱髄性多発神経症でも血清 IgEが健常対照より有意に高かった。

3. 動物モデル

ヤケヒョウヒダニ感作群4匹中1匹でアトピー性皮膚炎様の皮膚の変化、2匹で多発関節炎の発生を認めた。コナヒョウヒダニ、ケナガコナダニ感作群では疾病の発生はなかった。

考 察

本研究により私どもがアトピー性脊髄炎と提唱している病態は、ADの有無にかかわらず、(1) 高IgE血症、(2) ダニ特異的IgEが陽性、(3) 部分的な脊髄症候、(4) MRI 上も小病巣、(5) 髄液細胞増多は少ない、(6) 軽度の好酸球増多を半数で認める、(7) 副腎皮質ステロイド剤が半数で無効、(8) 脊髄症候やMRI上の小病巣が長期間残存し易い等の特徴を呈することが明らかとなった。小児(既報告は13歳以下)で喘息発作後に一肢の脱力、筋萎縮をきたす poliomyelitis-like illness (Hopkins 症候群)が知られている。自験例のうち1例(15歳)は下位運動ニューロン障害のみでこの範疇に含まれるが、他4例は成人発症でより広範な障害でHopkins 症候群とはいえない。しかし、喘息発作後に脊髄炎を生じた点では共通しており、小児のHopkins 症候群と同様な病態が成人でも起こり得ることが示唆される。ただ成人例では小児と脊髄炎病巣の分布が異なっていると考えられる。

またGBSや多発単神経炎などの末梢神経炎でもダニアトピーの頻度が有意に高く、これらの一部でダニアトピー

ーが発症に寄与している可能性がある。preliminary ではあるが、ヤケヒョウヒダニ粗抗原で多発関節炎とアトピー性皮膚炎が誘導できた。コナヒョウヒダニ、ケナガコナダニでは疾病がみられないことからダニの種類により病原性が異なる可能性も考えられ、今後さらに検索していきたい。

結 論

アトピーを基盤にして起こる脊髄炎が存在する。AD先行例、BA先行例、アトピー性疾患は先行していないが高IgE血症とダニ特異的IgE陽性のもも含めてアトピー性脊髄炎との病名を提唱したい。視神経脊髄型MSの減少と西洋型MSの増加、アトピーを伴う脊髄炎の発生など、我が国では炎症性中枢神経疾患の疾病構造が急に変化しつつある可能性があり、各世代ごとの疫学調査が望まれる。

文 献

- 1) Kira J, et al. Acute myelitis associated with hyperIgEemia and atopic dermatitis. *J Neurol Sci* 148:199-203, 1997.
- 2) Kira J, et al. Acute myelitis with hyperIgEaemia and mite antigen specific IgE: atopic myelitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 64:676-679, 1998.
- 3) Kira J, et al. Clinical, immunological and MRI features of myelitis with atopic dermatitis (atopic myelitis). *J Neurol Sci* 162:56-61, 1998.
- 4) 吉良潤一, 堀内泉. Th1/Th2バランスからみたアトピー性脊髄炎の病態とその臨床像. *神経免疫学* 6:39-46, 1998.

表1. 最近20年間の当科における脊髄炎患者数の推移 (皮膚科からの紹介例は除く)

	1979-1983年	1984-1988年	1989-1993年	1994-1998年
全脊髄炎患者数	11	9	9	27
アトピー性皮膚炎合併例	0	0	1	5
気管支喘息合併例*	1	0	0	4

* 気管支喘息合併例5例中4例は喘息発作後2-14日で脊髄炎を発症。うち4例は成人例。

表2. 臨床像の比較

	AD合併脊髄炎 (n=14)	AD非合併脊髄炎	
		高IgE血症 (n=11)	正IgE血症 (n=11)
血清全IgE (中央値 U/ml)	1266*	792*	99
特異的IgE ヤケヒョウヒダニ	14/14*	11/11*	6/11
コナヒョウヒダニ	14/14*	10/11*	4/11
スギ花粉	9/14	5/11	3/11
好酸球増多	7/13	6/11	3/10
発症年齢 (平均±SD, 歳)	32±10	28±10*	39±13
性比 (男対女)	6:8	8:3	8:3
臨床症候からみた主病巣			
頸髄	14*	2	6
胸髄	0	9	5
EDSS (平均±SD)	1.5±0.7*	3.2±0.4	3.7±2.2
脊髄MRI T2高信号域			
頸髄	8	2	5
胸髄	1	6	4
髄液 細胞増多 (>5/μl)	0/7	3/10	6/11
蛋白増多 (>45mg/dl)	1/7	5/10	5/11
副腎皮質ステロイド剤無効例	2/4	4/8	2/8

* P<0.05 (正IgE血症群との比較)

表3.

気管支喘息を伴う脊髄炎症例の臨床像

症 例	1	2	3	4	5
発症年齢(歳)/性	15/男	22/女	73/女	39/男	28/男
血清全IgE値 (U/ml)	1300	298	306	未検	400
好酸球 (%)	1.8 %	6.5 %	8.7 %	6 %	5 %
喘息発作から脊髄炎までの期間	6日	7日	2日	約2週	約18ヶ月
症候 筋萎縮	+(片側)	+(片側)	+(片側)	-	-
脱力	+(片側)	+(片側)	+(片側)	+(片側)	+(左右差)
錐体路徴候	-	-	+(両側)	+(片側)	+(両側)
感覚障害	-	+	-	+	+
膀胱直腸障害	-	-	-	-	+
臨床症候からみた病巣	腰・仙髄	頸・胸・腰髄	頸髄	頸髄	胸髄
EDSS	3	3.5	3	3	3.5
MRI上の病巣	-	-	-	/	胸髄
針筋電図	脱神経	脱神経	脱神経	/	/
髄液 細胞数 (/μl)	7	1	1	2	/
蛋白 (mg/dl)	54	52	40	93	/
経過	ス剤無効	ス剤無効	ス剤無効	不変	改善

/ = 未検査

表4. 各種末梢神経炎における血清全IgEおよびアレルギー特異的IgE

対 象	IgE (中央値U/ml)	高IgE血症 (%)	アレルギー特異的IgE陽性率 (%)		
			ヤケヒョウヒダニ	コナヒョウヒダニ	スギ花粉
Guillain-Barre 症候群 (n=50)	135*	34	56*	46	60
Fisher 症候群 (n=9)	100	22	67	67	56
慢性炎症性脱髄性多発神経症 (n=14)	175*	36	57	43	50
多発単神経炎 (n=18)	199*	44	72*	50	56
変性性神経疾患 (n=43)	47	23	40	30	51
健常対照 (n=82)	79	21	32	30	50

* P<0.05 (健常対照群との比較)

CpG-DNA アジュバントを利用した EAE の誘導

Gyorgy Fazekas, 山村 隆、田平 武

目的

多発性硬化症の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) はミエリン抗原による感作 (active challenge) あるいは脳炎惹起性 T 細胞の受け身移入によって誘導される。EAE の active challenge には通常結核死菌成分と不完全 Freund アジュバント (IFA) の混和物が用いられる (Freund 完全アジュバント, CFA)。結核死菌を含む微生物の中には自然免疫系を活性化して EAE の誘導を促進する成分が含まれているが、その実体は muramyl dipeptide などの蛋白成分が一部明らかになった以外はあまりよく分かっていない。最近微生物がもつ CpG 配列を有する DNA が強いアジュバント効果を発揮し、Th1 細胞を活性化する事が分かってきた (1-4)。しかし、その EAE 誘導における作用はまだ明らかでない。そこで、結核菌成分に代わって合成 CpG オリゴヌクレオチドを含むアジュバントが EAE の active challenge に有効かどうかを検討することを目的として本研究を行った。

方法

雌 SJL/J マウスにプロテオリピッドプロテインの合成ペプチド (PLP136-150) で誘導する EAE モデルを用いた。メチル化されていない CpG モチーフを含むオリゴヌクレオチド (CpG: GCATGACGTTGAGCT) または対照のメチル化されたシトシンを含むオリゴヌクレオチド (ZpG: GCATGAZGTTGAGCT) を IFA または PBS に混和してアジュバントとして用いた。これらのアジュバント (100 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) と PLP136-150 (100 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) との混和物を

マウス皮下に接種し、EAE の発症を観察した。また免疫 10 日目にリンパ節細胞を調整し、PLP136-150 に対する増殖反応、サイトカイン産生をそれぞれチミジンの取り込み、ELISA 法で評価した。同時に血清の抗 PLP136-150 抗体価を測定した。

結果

1) CpG-IFA アジュバントと PLP136-150 で接種したマウスは全例 EAE を発症した (図 1)。その臨床症状は CFA をアジュバントとして利用した場合に比較して遜色なく、むしろ重症化する経口が伺えた。一方、ZpG-IFA アジュバントと PLP136-150 で免疫したマウスでは EAE の発症は一部のマウスに限られ、症状も極軽度であった。IFA アジュバントでは EAE は誘導できなかった。

2) CpG-PBS アジュバントまたは PBS と PLP136-150 で接種したマウスでは EAE は誘導されなかった。一方、ZpG-PBS アジュバントを使った場合、3 例中 2 例が grade 1 の EAE を免疫 1 カ月後に発症した。

3) IFA を含むアジュバント (CFA, IFA, CpG-IFA, ZpG-IFA) を使った場合は、何れの場合も強い PLP 特異的リンパ球増殖反応が誘導された。一方、IFA を含まないアジュバントの中では、CpG-PBS のみが強いリンパ球増殖反応を誘導した。

4) CFA または CpG-IFA アジュバントで PLP136-150 で免疫したマウスのリンパ球は、in vitro の PLP136-150 刺激に対して、インターフェロン γ (IFN- γ) を強く産生した。ZpG-IFA アジュバントと PLP136-150 で免疫下マウスのリンパ球も IFN- γ をある程度産生したが、IFA, CpG-PBS, ZpG-PBS アジュバントで免疫したマウスのリンパ球は IFN- γ を産生しなかった。

国立精神・神経センター神経研究所

5) 血清中 PLP136-150 抗体価は、CFA, IFA, CpG-IFA, ZpG-IFA アジュバントによる免疫マウスで検出された。Ig アイソタイプ分画(IgM, IgG1, IgG2a)を評価した結果、CFA や IFA を利用して免疫した場合には IgG1>IgG2aであったが、CpG-IFA アジュバントを使った場合は IgG1<IgG2a と逆転が見られた。この結果は CpG-IFA が CFA よりも Th1 細胞を誘導する効率が良いことを意味している。

考察

多発性硬化症を含む自己免疫疾患では感染因子の関与が考えられている。これまでに微生物の成分とミエリン抗原との分子相同性が論じられ有る程度実験的にも証明されてきた。しかし、その機序は分子相同性に限らず、本研究によってオリゴヌクレオチドが自己免疫疾患のアジュバントとして機能することが初めて明らかになった。そのメカニズムとして CpG モチーフを含むオリゴヌクレオチドがアジュバント活性を発揮し、Th1 タイプの T 細胞を強く誘導することが伺える。今後その詳細な機序を明らかにすれば、感染によって誘発される自己免疫疾患の発症、再発を抑える薬の開発が可能になるであろう。

まとめ

従来多発性硬化症などの自己免疫疾患の発症には感染因子が絡むといわれてきた。その一つは感染因子と自己抗原の共通抗原性であると考えられ、実際菌体成分の一部で自己抗原反応性 T 細胞が出現することが示されてきた。今回、感染因子に含まれる CpG 配列を有するオリゴヌクレオチドが Th1 タイプの T 細胞機能を活性化し、EAE を悪化させる事が初めて示された。このことは感染因子に含まれる DNA がアジュバント効果を発揮し、自己免疫機序を促進する事を示している。今後どのような微生物にこのような配列のオリゴヌクレオチドが多く含まれるか、どのようにすればこれによる免疫反応の促進が阻害されるかを研究すれば、MS の発症・予防を抑える方法の開発につながるかと期待される。

文献

- 1) Weiner GJ et al: Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing the CpG motif are effective as immune adjuvants in tumor antigen immunization. Proc Natl Acad Sci US A 94:10833-7, 1997
- 2) Chu RS et al: CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. J Exp Med 186:1623-31, 1997
- 3) Sun S et al: DNA as an adjuvant: capacity of insect DNA and synthetic oligodeoxynucleotides to augment T cell responses to specific antigen. J Exp Med 18:1145-50, 1998
- 4) Brazolot Millan CL et al: CpG DNA can induce strong Th1 humoral and cell-mediated immune responses against hepatitis B surface antigen in young mice. Proc Natl Acad Sci US A 95:15553-8, 1998

図 1 EFFECT OF CpG-ODN ON ACTIVE EAE

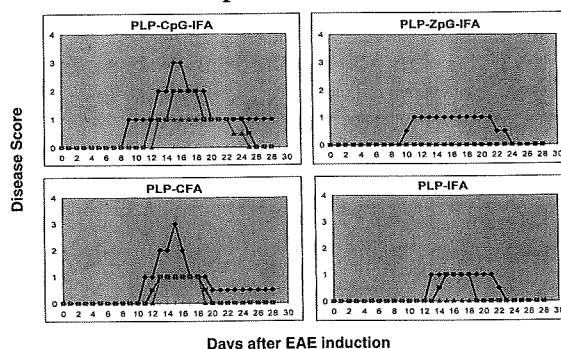
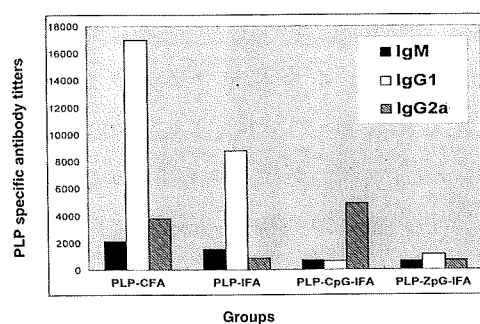


図 2 PLP₁₃₆₋₁₅₁ PEPTIDE SPECIFIC ANTIBODIES IN CpG,ZpG TREATED OR CONTROL MICE



オリゴデンドロサイトと反応する自然自己抗体による髄鞘再生

永松 正明 朝倉 邦彦 河合 邦幸 Moses Rodriguez*

祖父江 元

目的

免疫グロブリン製剤による多発性硬化症(MS)の治療が試みられており、比較的病初期における投与では、有効であるとする結果が相次いで報告されている^{1) 2) 3)}。我々は単一の免疫グロブリン、即ちモノクローナル抗体によるMSの治療の可能性についてTheilerウイルスを用いたMS実験モデルにおいて研究を行ってきた。その結果髄鞘再生を促進する2つのモノクローナル抗体を作製し、本学会議にて報告してきた^{4) 5)}。これらの抗体の特徴を調べた結果、いずれもオリゴデンドロサイト特異的な抗原と反応し、自然自己抗体の範疇に属する抗体であることが明かとなった。この結果をもとに、今回オリゴデンドロサイトに特異的な抗原と反応する自然自己抗体は髄鞘再生を促進するという仮説の検証を試みた。

対象および方法

既存のオリゴデンドロサイトを認識するマウスモノクローナル抗体O1, O4, HNK-1, A2B5 (表1) を各々ハイブリドーマ上清より精製し、脳内にTheilerウイルスを播種したSJL/Jマウス(感染後5~6ヶ月)に週2回、5週間腹腔内投与した(総投与量: 0.5 mg)。O1, O4, HNK-1, A2B5はいずれもIgMκ抗体で、可変領域をコードするcDNA塩基配列の解析などから自然自己抗体に属するものであることを既に報告している⁶⁾。対照としてリン酸緩衝液(PBS)とオリゴデンドロサイトと無関係なマウスIgMκモノクローナル抗体CH12およびXMMEN-OE5 (表1) をTheilerウイルスを慢性感染させたSJL/Jマウスに投与した。CH12はマウスB細胞リンパ腫(CH12.Lx)より分泌され、可変領域をコードするcDNAの塩基配列は、抗体の結合に最も重要なcomplementarity-determining region 3 (CDR3)における数個のアミノ酸を除いて、H鎖、L鎖ともSCH94.03の可変領域とまったく同じであることが判明している。また、オリゴデンドロサイトを認識するマウスIgG3モノクローナル抗体R24 (表1) を精製し、同様に投与した。投与

終了後、灌流固定し全脊髄を摘出した。脊髄連続横断切片を作製し、脊髄白質内の脱髄病変およびオリゴデンドロサイトによる髄鞘再生を定量的に解析した。脱髄巣の一部にシュワン細胞による髄鞘再生が認められることがあるが、これらはその定量より除外した。またこれらの抗体がTheilerウイルスの殻蛋白と反応するかどうかを、ウエスタン・ブロット法およびELISA法により検討した。

結果

(1) 抗体投与による髄鞘再生 (表2)

いずれの治療群においても、脊髄内の脱髄病変の程度に差はなかった。O1, O4, HNK-1, A2B5投与群では、いずれも脱髄病変の約20から25%に髄鞘再生がみられ、いずれの対照群(PBS, CH12, XMMEN-OE5投与群)に比べても髄鞘再生の有意な増加を認めた($p < 0.01 \sim 0.05$)。IgG3モノクローナル抗体R24投与群では、対照群に比較して髄鞘再生の増加はまったく認められなかった。

(2) ウエスタン・ブロット, ELISA

調べたいずれの抗体もウエスタン・ブロット法およびELISA法において、Theilerウイルス由来のどの殻蛋白とも反応せず、ウイルス中和作用も認めなかった。これらのことから、O1, O4, HNK-1, A2B5いずれの抗体もTheilerウイルスの複製に影響を及ぼさないと考えられた。

考察

複数のオリゴデンドロサイトを認識する自然自己抗体が髄鞘再生を促進することから、これらの抗体を用いたMS治療の可能性が示唆された。今後、マウス由来の抗体の免疫原性を減らすために、これら髄鞘再生能のある抗体のCDR (CDR1~3)のみをヒトの抗体に組み込んだ“humanized”抗体を作製し治療に用いる可能性も考えられる。一方、オリゴデンドロサイトを認識するIgG抗体R24では髄鞘再生が認められないことから、この免疫グロブリンを介した髄鞘再生にはμ鎖が重要であり、CH12でも髄鞘再生促進作用が認められないことから、CDR3が重要な役割を果たしていることが示唆された。^{5) 7) 8) 9)}

また、現在使用されている免疫グロブリン製剤は健康人数千から数万人の血清プールより精製され、その成

名古屋大学医学部神経内科

*メイヨークリニック神経内科

表1 本研究に用いた抗体の抗原特異性

抗体	Igクラス, サブクラス	主たる抗原
O1	IgMκ	galactocerebroside
O4	IgMκ	sulfatide
HNK-1	IgMκ	carbohydrate
A2B5	IgMκ	gangliosides
CH12	IgMκ	red blood cell
XMMEN-OE5	IgMκ	bacterial lipopolysaccharide
R24	IgG3	ganglioside GD3

表2 抗体投与による髄鞘再生

Treatment	No. of mice	Area of white matter (mm ²)	Area of demyelinated lesion (mm ²)	Area of CNS-type remyelination (mm ²)	Area of CNS-type remyelination/area of lesions (%)
O1	6	7.57 ± 0.52	0.53 ± 0.10	0.14 ± 0.04	24.8 ± 6.2*
O4	7	8.01 ± 0.16	0.84 ± 0.10	0.17 ± 0.05	20.4 ± 4.2*
A2B5	7	7.28 ± 0.38	0.70 ± 0.18	0.18 ± 0.05	24.6 ± 4.6*
HNK-1	7	7.16 ± 0.38	0.78 ± 0.10	0.15 ± 0.03	20.6 ± 2.8**
CH12	7	7.43 ± 0.28	0.57 ± 0.11	0.05 ± 0.02	8.5 ± 4.6
R24	7	7.52 ± 0.34	0.65 ± 0.13	0.04 ± 0.01	6.7 ± 2.5
XMMEN-OE5	6	9.32 ± 0.42	1.06 ± 0.27	0.03 ± 0.01	3.4 ± 1.0
PBS	6	7.46 ± 0.76	0.51 ± 0.15	0.05 ± 0.02	8.0 ± 2.2

Values represent the mean ± SEM. Statistics by Student's t-test of the percent area of CNS-type remyelination/area of lesions in mice treated with oligodendrocyte-reactive mAbs (O1, O4, A2B5, and HNK-1) compared to mice treated with XMMEN-OE5 (control IgM) or PBS revealed * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

分のほとんどがIgGであり、IgMはまったく含まれていないが、自然自己抗体の大部分はIgM分画に存在すると考えられており、健常人血清プールより精製したIgMによる治療の可能性を示唆するものであると考えられた。

(3)健常人血清プールより精製したIgMによるMS治療の可能性が示唆された。

まとめ

Theilerウイルスを用いたマウス脱髄モデルにおいて、種々の抗体の髄鞘再生能を検討した。

(1)オリゴデンドロサイトを認識する自然自己抗体が髄鞘再生を促進した。

(2)免疫グロブリンを介した髄鞘再生にはμ鎖とCDR3が重要な役割をになっていると考えられた。

文献

- 1) Fazekas F. et al. Randomized placebo-controlled trial of monthly intravenous immunoglobulin therapy in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Lancet* 349:589-593, 1997.
- 2) Achiron A. et al. Intravenous immunoglobulin treatment in multiple sclerosis: effect on relapses. *Neurology* 50:398-402, 1998.
- 3) Sorensen P.S. et al. Intravenous immunoglobulin G

reduces MRI activity in relapsing multiple sclerosis. *Neurology* 50: 1273-1281, 1998.

4) Miller D.J. et al. Monoclonal antibodies promote central nervous system repair in animal model of multiple sclerosis. *J Neurosci* 14:6230-6238, 1994.

5) Asakura K. et al. Targeting of IgMk antibodies to oligodendrocytes promotes central nervous system remyelination. *J Neurosci* 18:7700-7708, 1998.

6) Asakura K. et al. Oligodendrocyte-reactive monoclonal antibodies, O1, O4, and HNK-1 are encoded by

germline immunoglobulin genes. *Mol Brain Res* 154: 2460-2469, 1995.

7) Asakura K. et al. A certain population of circulating natural autoantibodies promotes central nervous system remyelination. *Multiple Sclerosis* 4:217-221, 1998.

8) 朝倉邦彦, 他 免疫グロブリンによる中枢神経系髄鞘再生. *神経治療学* 15:245-250, 1998.

9) McGavern et al. Do antibodies stimulate myelin repair in multiple sclerosis? *Neuroscientist* 5: 19-28, 1999.

自己免疫性脳炎における NKT 細胞の役割

山村 隆

張 本寧

谷口 克*

目 的

T 細胞と NK 細胞の両者の性格を合わせ持つ NKT (natural killer T) 細胞は、V α 14-J α 281 の再構成による invariant TCR 鎖を発現し、CD1 分子に拘束された糖脂質を認識して大量のサイトカインを短時間で産生する、などの特異な性格を持つリンパ球集団である。これまでこのリンパ球サブセットの転移性癌細胞の排除、自己免疫性糖尿病の抑制などへの関与が示唆されているが、神経免疫疾患との関わりで研究されたことはない。昨年度は NK 細胞が EAE の重要な調節細胞であることを報告したが^{1,2)}、今回我々は C57BL/6 (B6) マウスに誘導した実験的自己免疫性脳炎 (EAE) における NKT 細胞の役割を検討した。

対象と方法

NKT 細胞を欠如するマウス (B6 バックグラウンド) を以下の 3 種類の方法で作製した。1) 抗 V α 14 モノクローナル抗体の *in vivo* 投与 (V α 14 抗体処理マウス) 2) 抗 NK1.1 抗体 (PK136) を *in vivo* 投与して NK 細胞と NKT 細胞を除去した後、NKT 細胞を持たない RAG-2 ノックアウト・マウスの脾細胞を移入する方法 (キメラ・マウス)、3) J α 281 遺伝子を *gene targeting* でノックアウトする方法 (NKT ノックアウト・マウス)³⁾。NK 細胞のみを欠損するマウスは、抗アジアロ GM1 抗体の *in vivo* 投与によった。EAE は myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) 35-55 ペプチドを完全フロイント・アジュバントとともに感作する方

国立精神・神経センター神経研究所

*千葉大学医学部高次研

法によった。リンパ球増殖反応はチミジンの取り込みによって評価し、感作リンパ球の産生するサイトカイン、血清中のサイトカインは、Sandwich ELISA 法により測定した。

結 果

- 1) 自然発症自己免疫病モデルでは、疾患発症に伴う末梢血中の NKT 細胞の減少が報告されている⁴⁾。しかし、EAE では発症にともなってむしろ増加した。
- 2) NKT 細胞のみを後天的に除去されたマウス (V α 14 抗体処理マウス、キメラ・マウス)、NKT 細胞を先天的に欠損するマウス (NKT ノックアウト・マウス) のいずれにおいても、EAE 発症の著しい早期化が見られた。すなわち、対照の B6 マウスでは感作後 12-18 日後に初発症状 (limp tail) が観察されたのに対して、NKT 細胞を欠損するマウスでは感作後 5-6 日目に EAE の発症が観察された (図 1)。EAE の重症度は対照と NKT 欠損マウスで差がなく、いずれも 1 週間以内に完全に回復した。
- 3) リンパ節細胞増殖反応の評価では、対照マウスは免疫後 10 日目になってようやく MOG35-55 ペプチドに対する有意の増殖反応を示すのに対して、NKT 細胞欠損マウスでは免疫後 5 日目に強い増殖反応が検出された。また、血清中 Th1 サイトカイン (interferon- γ 、TNF- α) の値は、NKT 細胞欠損マウスでは免疫後 5 日目に既に著しく上昇しており、EAE 早期発症との関連が推測された (図 2)。
- 4) NK 細胞のみを欠損するマウスにおいては、EAE の

発症は通常と同じか、やや遅れる傾向があった。しかし、発症後速やかに症状が進行し、全例が EAE 症状(麻痺)のために死亡した(図 3)。

5) V α 14 抗体と抗アシアロ GM1 抗体の両方を投与して NK 細胞と NKT 細胞共に除去されたマウスでは、再発性の EAE が観察された。同様の結果は、NK1.1 抗体で NK 細胞と NKT 細胞共に除去されたマウスにおいても観察された。

6) IL-4 ノックアウト・マウスにおいては、V α 14 抗体投与は EAE の臨床経過に影響を与えなかった。一方、抗アシアロ GM1 抗体の投与により EAE が重症化した。

考 察

以上の実験は、NKT 細胞が EAE の早期発症を抑制する重要な調節細胞として機能することをはじめて明らかにしたものである。EAE に代表される抗原感作によって誘導される自己免疫病 (induced autoimmune disease) の経過は、これまで誘導相 (induction phase) と効果相 (effector phase) に分けて理解されてきた。すなわち、数少ないナイーブな脳炎惹起性 T 細胞前駆細胞が分化・増殖し、成熟するまでが誘導相 (約 1 週間から 10 日) であり、成熟した T 細胞が疾病を誘導するまでが効果相 (約 4-5 日) であるとされてきた。しかし、NKT 細胞を欠損するマウスでは、感作 EAE が免疫後 5 日目で発症するという我々の実験結果は、病気を誘導する成熟した脳炎惹起性 T 細胞が健常なマウスにおいて既に十分な数だけ存在していることを意味する。すなわち、NKT 細胞が疾病を誘導できる準備状態にある脳炎惹起性 T 細胞の抗原刺激による活性化を抑制することによって、EAE の早期発症が予防されていると言える。NKT 細胞による EAE 早期発症抑制のメカニズムはまだ解明されていないが、おそらく NKT 細胞の産生する IL-4 が介在しているものと推測される。

NKT 細胞だけを欠如するマウスでは、EAE の完全な回復が見られたのに対し、NK 細胞だけを欠如するマウスでは、致死的な EAE が観察された。NK 細胞と

NKT 細胞の両者を欠如するマウスでは、再発性の EAE が見られた。以上の結果から、早期発症 EAE の回復には NK 細胞、NKT 細胞以外の調節機構 (例えば抗イデオタイプ応答⁵⁾) が関与する可能性がある。EAE の後期相の回復においては、NK 細胞が決定的な役割を果たすことがわかった。このように NKT 細胞と NK 細胞はまったく異なるやり方で自己免疫病を調節し、多発性硬化症などの免疫性神経疾患を理解する上で基本的に重要な細胞であることが明確になった。

結 論

NKT 細胞は自己免疫性脳炎の調節細胞として、NK 細胞とは異なる重要な役割を担っている。

文 献

1. Zhang B-n, T Yamamura et al. Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by natural killer (NK) cells. *J. Exp. Med.* 186:1677-1687, 1997
2. Zhang B-n, and T Yamamura. The role of natural killer (NK) cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. pp. 1089-1092, *Proceeding for 10th International Congress of Immunology*, 1998
3. Cui J, T Shin et al. Requirement for V α 14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science* 278: 1623-1626, 1997
4. Mieza MA et al. Selective reduction of V α 14⁺ NK T cells associated with disease development in autoimmune-prone mice. *J. Immunol.* 156:4035-4040, 1996
5. Kozovska MF, T Yamamura and T Tabira. T-T cellular interaction between CD4⁻CD8⁻ regulatory T cells and T cell clones presenting TCR peptide. Its implication for TCR vaccination against experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 157:1781-1790, 1996

図の説明

図 1: NKT 細胞欠損マウスにおける EAE の早期発症
上パネルは対照の B6 マウスの EAE、下パネルは NKT

細胞を欠損したマウス（ここでは Vα14 抗体投与群）における EAE を示す。

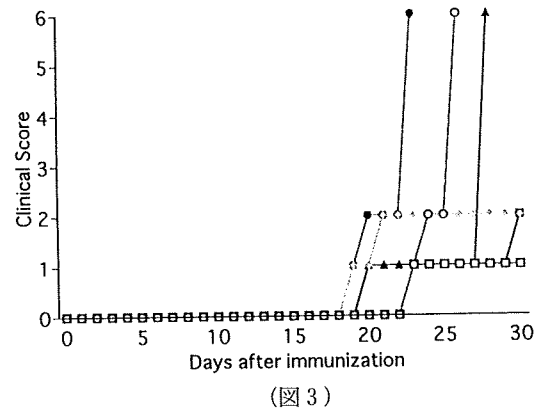
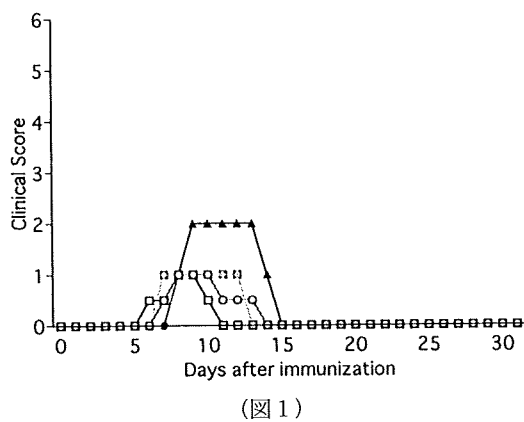
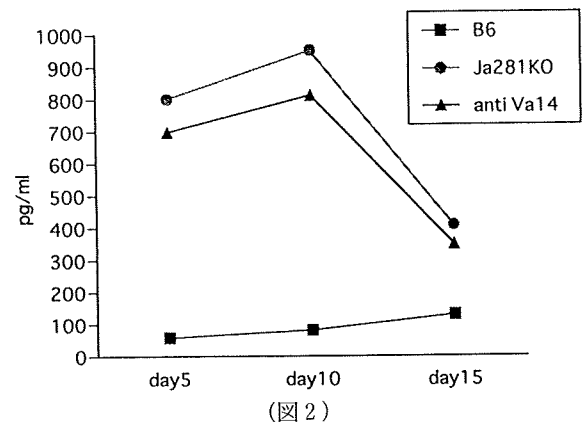
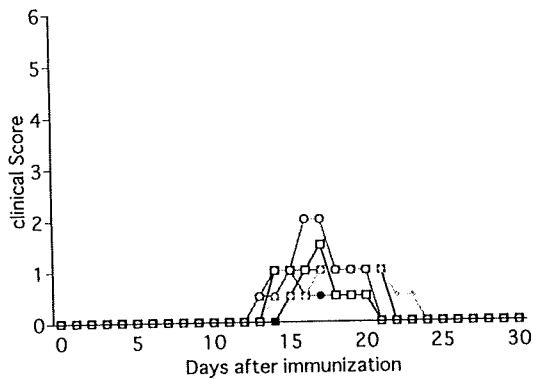
図 2: NKT 細胞欠損マウスに誘導した EAE におけるインターフェロン・ガンマの上昇

EAE 誘導操作を加えてから、経時的に血清中インターフェロン・ガンマを測定した。NKT 細胞欠損マウスでは免疫後 5 日目に著明なインターフェロン・ガンマの上昇が観察される。

(B6; wild-type B6 マウス, Ja281KO; NKT ノックアウト・マウス, anti Va14; 抗 Va14 抗体処置マウス)

図 3: NK 細胞欠損マウスにおける致死的 EAE の誘導

抗シアロ GM1 抗体による NK 細胞除去後に EAE を誘導した。早期発症は見られず、致死的な EAE が誘導された。



Phosphodiesterase 阻害剤による多発性硬化症の治療の可能性： 臨床および免疫学的検討

錫村明生、菊井祥二、中室卓也、高柳哲也、澤田 誠*

目的

昨年までの研究で種々の Phosphodiesterase 阻害剤 (PDEI) がグリア細胞の腫瘍壊死因子(TNF α)産生を抑制し、免疫性神経疾患の治療薬になる可能性があること、3種類の異なった PDEI を用いることによって、通常の治療容量で得られる血中濃度に近い低濃度の PDEI でも *in vivo* で TNF α 産生が抑制されることを示した。さらに昨年度の pilot study では、実際に多発性硬化症 (MS) の治療にも有用であることを示した。今回は、3種類の異なった PDEI が MS の治療薬になるか否か、長期観察例について検討するとともに、その免疫学的機序について検討した。

方法

臨床例での検討。**Study (1)**: 昨年の pilot study の症例を引き続きフォローアップした。対象は寛緩再発型 MS 12例(男2例、女10例)。平均年齢は35才、平均罹病期間は6.5年、過去一年間の平均再発回数は3回。異なった3種の PDEI を投与し臨床経過を観察した。用いた PDEI はカラン[®] (タイプ I)、ヘキストール[®] (タイプ II、IV、III)、テオフィリン[®] (非特異的) で、いずれも通常容量を経口で投与した。ヘキストール発売中止後はトレンタール 300[®] (タイプ III) を用いた。**Study (2)**: 本年度新たに16例の寛緩再発型 MS を登録し、カラン、ケタス(タイプ III、IV)、プレタール(タイプ III) の3種を用い、臨床的に再発予防効果を検討すると同時に、投与前、投与1ヶ月後に採血、リンパ球サブセットの測定を flowcytometry にて検討した。および D3/CD4 陽性細胞分画を sorting により分離し、mRNA を調整し、そのサイトカイン mRNA の表現を RT-PCR 法にて測定した。検討したサイトカインは Th1 のマーカーとして、IL-2、IFN γ 、Th2 のマーカーとして IL-4、IL-10、IL-13 を用いた。

結果

臨床例における Study (1) では、平成10年11月20日現在で平均437日間の経過を観察しているが、再発は12例中5例にみられたのみであり、約60%の症例はほぼ2年間再発をみていない。12例の年間平均再発回数は3.1(±3.3, 1-11回/年)から0.9(±1.9, 0-6回/年)に低下した。副作用として嘔気を1例に認めたのみで、薬剤中止に至るような副作用は認められていない。2例は1年経過時に中止(再発回数は減っているものの再発があったため)。Study (2) では、投与前の年間再発は2.7(±1.3, 1-5回)であったものが、PDEI 投与後には年間再発

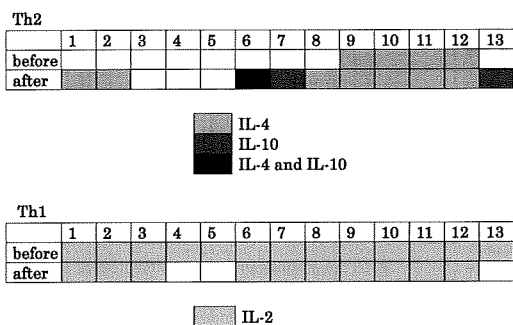
は0.4(±0.9, 0-3回)に減少した。これらの症例の免疫学的検討では、PDEI 投与前後でリンパ球サブセットの有意な変動はみられなかったが、投与後に CD4 細胞の比率が増加する傾向、B 細胞の比率が低下する傾向がみられた(表1)。

表1。Flowcytometric Analysis on Lymphocyte Subpopulation during PDEI Therapy

	before	after	
CD 3	65.6 ± 7.4	67.6 ± 7.3	NS
CD 4	37.9 ± 8.0	41.5 ± 7.9	P = 0.060
CD 8	24.1 ± 6.9	24.6 ± 8.9	NS
CD4/8	1.81 ± 0.99	2.15 ± 1.54	NS
B cell	18.8 ± 8.8	15.2 ± 6.8	P = 0.087
NK	12.7 ± 7.4	12.2 ± 7.4	NS

CD3/CD4 細胞でのサイトカイン mRNA の検索では Th2 系サイトカイン mRNA の増強が認められた(図1)。すなわち、投与前には認められなかった IL-4 が13例中3例に、IL-10 が2例に、この両者が1例に認められるようになり、さらに Th2 に分化すると認められなくなる IL-2 が3例で認められなくなった。13例中8例に Th2 への偏倚の証拠が得られた。

図1 Detection of Cytokine mRNAs in CD4 cells during PDEI Therapy



考察

種々の PDEI がマクロファージ、リンパ球、グリア細胞の TNF 産生を抑制し、免疫性脱髄を抑制することが

奈良県立医科大学神経内科、*藤田保健衛生大学総医研

示されている。これらの薬剤は現在広く日常臨床で用いられており、有効性が確認されれば有用であると考えられる。欠点として、通常使用量の10-100倍量を使用しないと十分な血中濃度が得られない点あげられていた。しかしながら、我々はタイプの異なるPDEIは相乗的に働き、3種類を組み合わせるにより、通常の容量でもTNF産生を抑制しうる可能性を示した。2年間のpilot studyでは、再発寛解型MS12例で平均再発回数が1/3に減少した。さらに特記すべきことは、12例中7例がPDEIによる治療後再発が認められていないことであり、再発の認められた症例においても投薬前より再発回数は半減していた。これらの成績は、interferon β の治療成績と同等またはそれ以上である。重篤な副作用もなく、経口剤であることから、現在使用されているかまたは治験中の他の治療法に比しても、本剤の有用性、安全性が示された。Study2における投与中のヘルパーT細胞のサイトカインプロフィールは13例中8例(62%)でTh2優位の状態に偏倚しており、末梢血のヘルパーT細胞をTh1優位からTh2優位に変化させるといふ、現在のMS治療の根本的考え方に合致し、この点でもMSの治療として適切であると考えられた。

まとめ

異なった3種のPDEIがMSの再発を抑制する可能性が示された。この作用機序として、昨年度までに報告した、グリア細胞、免疫細胞の腫瘍壊死因子産生抑制、一酸化窒素などのfree radicalの産生抑制とともに、今回Th1優位の状態で引き起こされるMSの悪化を末梢レベルでTh2優位に誘導することも重要な機序であると考えられた。副作用も少なく、経口剤のみでいいことから今後の治療薬の候補となりうると考えられた。

文献

- 1) Sawada M, Kondoh K, Suzumura A, et al: Production of tumor necrosis factor by microglia and astrocytes in culture. *Brain Res* 491: 394-397, 1989.
- 2) Selmaj KW, Raine CS, Farooq M, et al: Cytokine cytotoxicity against oligodendrocytes. Apoptosis induced by lymphotoxin. *J Immunol* 147:1522-1529, 1991.
- 3) Probert L, Akassoglou K, Pasparakis M, et al: Spontaneous inflammatory demyelination in transgenic mice showing central nervous system-specific expression of tumor necrosis factor alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 11294-11297, 1995.
- 4) Taupin V, Renno T, Bourbonniere L, et al: Increased severity of experimental autoimmune encephalomyelitis, chronic macrophage/microglial reactivity, and demyelination in transgenic mice producing tumor necrosis factor- α in the central nervous system. *Eur J Immunol* 27: 905-913, 1997.
- 5) Tsujino A, Nakamura T, Nishiura Y, et al: Pentoxifylline down-regulates adhesion molecule expression and inflammatory cytokine production in cultured peripheral blood mononuclear cells from patients with HTLV-I-associated myelopathy. *J Neuroimmunol*, 73: 191-196, 1997.
- 6) Genein CP, Roberts T, Davis RL, et al: Prevention of autoimmune demyelination in non-human primates by a cAMP-specific phosphodiesterase inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:3601-3605, 1995.
- 7) van Oosten BW, Rep MHG, van Lier RAW, et al: A pilot study investigating the effects of orally administered pentoxifylline on selected immune variables in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 66: 49-55, 1996.
- 8) Rieckmann P, Weber F, Gunther A, et al: Pentoxifylline, a phosphodiesterase inhibitor, induces immune deviation in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 64: 193-200, 1996.
- 9) Yamazaki M, Inoue A, Koh C-S, et al: Phosphatidylserine suppresses Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced demyelinating disease. *J Neuroimmunol* 75: 113-122, 1997.
- 10) Suzumura A, Sawada M, Makino M et al: Propentofylline inhibits production of TNF α and infection of LP-BM5 murine leukemia virus in glial cells. *J Neurovirol*, 4:553-559, 1998.

免疫性脱髄疾患における B7-1, B7-2 分子の役割

高 昌星* 井上 敦* 八木田秀雄**

目的

T 細胞の活性化には T 細胞受容体複合体を介した認識シグナルと CD28 分子を介した副刺激が必要である。B7-1, B7-2 は T 細胞上に発現する CD28 や CTLA-4 に結合し, T 細胞の活性化やその抑制を制御しており, Th1/Th2 細胞の誘導に深く関与している。一方 CD4 陽性 Th1 細胞が中心的な役割を果たすタイラー脳脊髄炎ウイルスによる免疫性脱髄疾患 (TMEV-IDD) 及び実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) はともに代表的なヒト多発性硬化症 (MS) の動物実験モデルである。今回これら免疫性脱髄疾患の発症機序を検索するため, CD28 分子のリガンドである B7-1, B7-2 分子の果たす役割を検討した。

方法

モノクローナル抗体(mAb)の作製:

抗 B7-1(CD80)mAb(3H5--rat, RM80--mouse), 抗 B7-2 (CD86)mAb(24F--rat, PO3--mouse)産生ハイブリドーマは各々培養増殖させた後ヌードマウス腹腔内に移入し抗体を得た。各抗体は protein G column にて精製後使用した。

脱髄疾患動物モデルの誘導および mAb 投与:

EAE はルイスラットにミエリン塩基性タンパク(MBP) (1.25mg/100ml/rat)をフロイントの完全アジュバントとともに感作して誘導した(day 0)。ラットを 4 群に分け mAb を day-1, 2, 8 に mAb(4.5mg/1ml/rat/day)を腹腔内に投与した。

A 群--control mouse IgG1,

*信州大学医学部第 3 内科, **順天堂大学医学部免疫学

B 群-- 抗 B7-1mAb(3H5)

C 群--抗 B7-2 mAb(24F),

D 群--抗 B7-1mAb(3H5)+抗 B7-2 mAb(24F)

TMEV-IDD は SJL/J マウスの右大脳半球にタイラー脳脊髄炎ウイルス BeAn8386 を脳内感染させて誘導した。マウスを 4 群に分け day4, 14 に mAb(500mg/100ml/mouse)に抗 B7-1mAb(RM80), 抗 B7-2 mAb(PO3)を投与した。

A 群--control rat IgG,

B 群-- 抗 B7-1mAb(RM80)

C 群--抗 B7-2 mAb(PO3),

D 群--抗 B7-1mAb(RM80)+抗 B7-2 mAb(PO3)

臨床症状の観察, 症状の評価:

rat EAE

Normal:0, Loss of tonicity of the distal tail: 0.25

Loss of tonicity of the entire tail: 0.5

Grossly ataxic gait:1.0, Paresis of hind leg: 2.0

Bilateral hind leg paralysis: 3.0

TMEV-IDD

Normal: 0, Slight waddling gait:1, Waddling gait: 2

Spastic hind limb paralysis: 3, Severe hind limb paralysis accompanied by incontinence: 4

抗原特異的遅延型過敏反応:

脳内接種 50 日後各マウスの耳の厚さをデジマチックマイクロメータにて測定した。その後 10ml PBS 中 5 mg の精製 TMEV を耳の背側に注入し 24 時間後に同様に測定し耳の厚さの増加度を検討した。

抗原特異的 T 細胞増殖アッセイ: