

2回目再発までの期間については、1.6MIU群と比較して8.0MIU群で有意な延長が認められた ($p=0.009$)。非再発症例率は、1.6MIU群で34.4%、8.0MIU群で44.2%であり、8.0MIU群で多かった。

重症度が中等度以上の再発についての年間再発率は、1.6MIU群で0.457、8.0MIU群で0.363であり、8.0MIU群で低かった。また、年間再発期間(中央値)は、1.6MIU群で16.4日、8.0MIU群で7.1日であり、8.0MIU群で有意に短かった ($p=0.030$)。

病型別の検討では、視神経脊髄型における年間再発率(95%信頼区間)は、1.6MIU群で1.725(1.263~2.301)、8.0MIU群で1.048(0.721~1.488)、通常型における年間再発率は、1.6MIU群で0.925(0.763~1.113)、8.0MIU群で0.690(0.547~0.859)であった。

3. MRI病巣面積:

投与前に対する最終評価時のMRI総病巣面積(平均値)の変化率は、1.6MIU群で+2.4%、8.0MIU群で-16.3%であり、群間で有意差が認められた ($p=0.035$)。

4. EDSS/NRS/ISスコア:

両群とも、投与前と比較した最終評価時のスコアに変化は認められなかった(中央値)。

5. 有害事象:

1.6MIU群の91例(94.8%)、8.0MIU群の93例(96.9%)に有害事象の発現が認められた。最も発現率が高かった有害事象は発熱であり、1.6MIU群で56例(58.3%)、8.0MIU群で75例(78.1%)に認められた ($p=0.005$)。発熱の発現率は1~2週目が最も高く、その後発現率の急速な低下が認められた。1.6MIU群の51例(53.1%)、8.0MIU群の53例(55.2%)に発赤、疼痛、硬結等の注射部症状が認められた。

6. 臨床検査/生理学的検査:

両群とも、白血球数、リンパ球数、好中球数の減少と、肝機能検査値の上昇が10%以上の症例で認められた。生理学的検査では明らかな変動は認められなかった。

結 論

1. 日本人RR-MS患者においても、IFN β -1bによ

る再発予防効果が認められた。

2. 再発予防効果は、通常型MSのみならず、本邦に比較的多いとされている視神経脊髄型MSにおいても同様に認められた。

3. 特定の有害事象あるいは臨床検査値異常が日本人MS患者において特異的に高率に発現するような傾向は認められなかった。

4. 再発抑制やMRI病巣増加抑制効果また有害事象の発現などの結果は、その数量的な結果や程度などが北米での臨床治験における結果と細部まで非常に類似しており、日本人MS患者と欧米人MS患者で従来は様々な相違点が強調されているが、インターフェロン β の効果発現に關与する遺伝的背景や病態が共通であることを示唆している。

5. IFN β -1b療法は、日本人MS患者においても有用であると考えられた。

文 献

1. IFN β Multiple Sclerosis Study Group.

Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind., placebo-controlled trial. *Neurology* 1993; 43: 662-667.

日本人多発性硬化症のオリゴクローナルバンドの解析

藤原一男¹⁾、中島一郎¹⁾、藤盛寿一¹⁾、三須建郎¹⁾、小野寺 宏¹⁾、
山本雅裕²⁾、山本直樹²⁾、糸山泰人¹⁾

目的

多発性硬化症(MS)において、髄液のオリゴクローナルバンド(OB)の出現やIgG indexの上昇は重要な検査所見であるが、従来日本人のMS患者ではOBの陽性率が低いことが指摘されてきた。本邦のMSにおけるOB及びIgG indexの意義を明らかにするため以下の(1)~(3)の検討を行った。(1)アガロースゲル電気泳動(AGE)及び等電点電気泳動(IEF)によるOBの陽性率とOB陰性症例の臨床解析、(2)免疫グロブリン産生に関わるサイトカイン(IL-6, IL-10)とIgG indexとの相関の検討、(3)髄液 oligoclonal IgG が認識するエピトープの検索と感染因子とのホモロジー解析

方法

(1)MS43例[通常型MS(C-MS)29例、視神経脊髄型MS(OS-MS)12例、脊髄型MS(S-MS)2例]の血清及び髄液を濃縮髄液を用いてAGEを施行、またこのうち40例(C-MS28例、OS-MS10例、S-MS2例)についてPhast System™(Amersham Pharmacia Biotech)を用いてIEFを施行した。銀染色により血清ではみられない明確なバンドが5本以上のものを陽性、5本以下を疑陽性とした。(2)MS23(C-MS18例、OS-MS5例)の再発時の血漿及び髄液中のIL-6及びIL-10濃度をELISA法[Quanti Glo™ human IL-6 immunoassay kit (R&D)、Cytoscreen™ hIL-10 US kit (BioSource International)]を用いて測定した。(3)OB陽性MS4例、OB陰性MS2例、OB陽性HAM1例の髄液IgGをprotein A-conjugated magnetic beads上に固着化した。次にランダムな配列の12merペプチドを提示するphage display library法(New England Biolab)を用いて、そのIgGに結合する複数のファージを単離したのち、30~32個のファージクローン上に提示されている12merのアミノ酸配列を決定し、その中から共通配列(配列の収束)がみられたものについて、そのアミノ酸配列をBLASTによりウイルス構成タンパクを中心にホモロジー検索を実施した。相同性のみられたタンパクのうちe value(期待値)が10万未満のものについて検討した。一部の症例ではホモロジー検索により推定されたタンパクを含むウイルス感染細胞破碎液と患者髄液中のIgGの反応の有無をウェスタンブロット法で確かめた。その後さらに同様の検討をMS14例で行った。

結果

(1)AGEでは43例中13例(30.2%)でOB陽性だった。C-MSでは29例中12例(41.4%)陽性だったのに対して、OS-MSでは12例中1例(8.3%)のみ陽性で、S-MS2例はいずれも陰性だった。IEFで陽性あるいは疑陽性となったのは21例(52.5%)だった。病型別ではC-MSでは28例中19例(67.9%)、OS-MSでは10例中1(10%)、S-MSでは2例中1例が疑陽性以上だった。AGE, IEFともに陰性だったC-MS8例は脳白質のびまん性病変や直経が数センチ以上の大病変を呈するものなど非典型的なものが多かった。(2)髄液IL-10値はIgG indexと有意な正の相関を示し、またOB陽性例でより高い傾向がみられた(図1)。

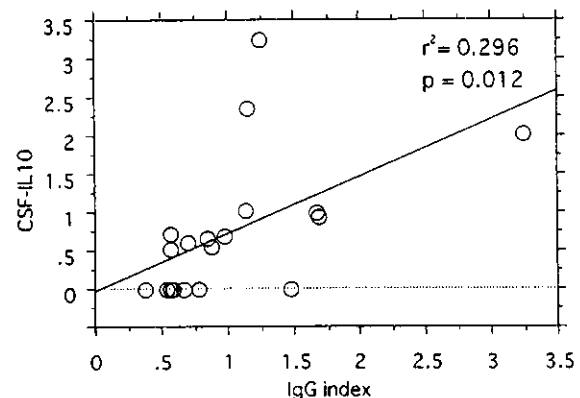


図1 髄液IL-10値はIgG indexと有意な正の相関

一方、血漿IL-10、血漿及び髄液IL-6値はいずれもIgG indexやOBとの相関がみられなかった。これらの結果はOS-MS症例を除いても不変であった。またdisease controlとして検討した感染性髄膜脳炎症例でも有意な相関はみられなかった。(3)OB陽性のMS4例及びHAM1例において12merペプチド配列において、個々の患者に特異的に配列の収束がみられた(表1)。OB陰性のMS2例では配列の収束はみられなかった。各々の患者から単離されたファージは他の患者の髄液中のIgGとは反応しなかった(図2)。単離されたファージのペプチド配列と相同性のあるアミノ酸の配列を持つ感染因子としてEB virus、herpes simplex virus-1 (HSV-1)、cytomegalovirus、vaccinia virus、papilloma virusなどのヘルペス属ウイルスを含む種々のウイルスが検出された(表2)。EB virus

1)東北大学大学院医学系研究科神経科学講座神経内科学分野

2)東京医科歯科大学大学院ウイルス制御学

表1 各症例の選択されたファージの提示するペプチドにおける共通配列

MS1	MS2	MS3	MS4
MS1-1 SGISNSPPKQHR DQGVMSSEKSNHL HDIPSSSEPLQH NPLHSERNQHYK SEVHQHRPMPF	MS2-1 QHTAPIFERPSP QTLETFERSSEPR TEETMNETHAVL APHLSEFERSEN WASEFESPSPHWR	MS3-1 NAIPYWEITWKT ATHTNATPMFEP NATPFYPPGPSL SATPLYPPFPAG WHDATPMYPSNP	MS4-1 APMSSVPAIIPH QYTSVSSVPAF GHNSEMSSSPAY VPTSSVSAALPW MS4-2 MPEPDWLKPTVQ SWSNPDWFLPT
MS1-2 HFKLDPEYQVERW GPYQDEPKPQTA DPYQLPEYSAGAL	VNDRTSEFHVSP EYWPDSFERRDP NHPRSEESNNE TEAPFESPSPHR	HAMI HAMI-1 FSTQWPELSLE DESPWNPCKPLE DMSLWDEASELE IQNRWPESSPLE EYWQWMPAWTLE TANTWLEPTQELE YMSPTSALPGLR	YTSQHWLSPDWL EHLWYQPDWIAQ TGAHIWTAPNWL
MS1-3 KHSPEYFYQYPS GPYLNQHPFTFL	MS2-2 ERMEYSMDPLHS EYSLSPAHHGR SEYWPDPSSHYN SEYTMDDPSHLSR		なお、MS5・6では共通配列は見られなかった。

表2 各患者より得られたファージ上の共通配列の相同性検索の結果

共通配列	感染因子	ホモロジー検索の結果	e-value (期待値)
(MS1)			
SPxxMH	EBV	CAPSID PROTEIN VP19C	61216
PYQxP	EBV	BZLF1 TRANS-ACTIVATOR PROTEIN (EB1)	7190
PYxxYQ	EBV	EBNA-6 NUCLEAR PROTEIN (EBNA-3C) (EBNA-4B)	46731
(MS2)			
TFFxxSP/SFFxxSP	VARV/VACCV	PROTEIN L1	20914
SFYxxQPSH	VARV/VACCV	PROTEIN D10	61584
(MS3)			
ATPxxPP	HSV-1	GLYCOPROTEIN D PRECURSOR	7102
(MS4)			
WxxPDWL	FPV/PAVCN	NONCAPSID PROTEIN NS-1	47012
PxSSVPA	HSV-1	HYPOTHETICAL GENE 67 PROTEIN	47012
	HCMVA	HYPOTHETICAL PROTEIN UL38	47012

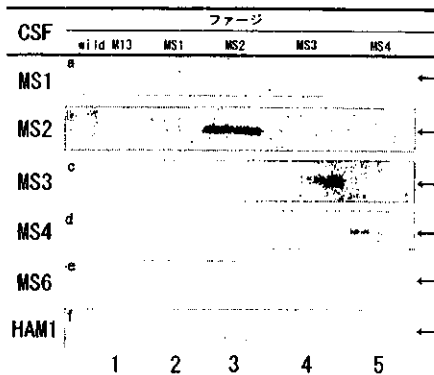


図2 各患者の選択されたファージは
その患者自身の髄液 IgG とのみ反応する

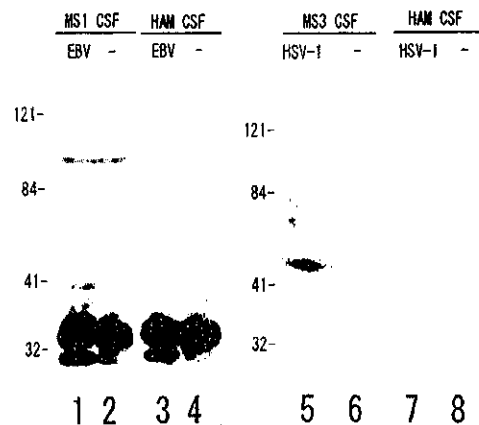


図3 MS1 と MS3 の髄液 IgG は各々、
EBV と HSV-1 の構造タンパクと結合する

あるいはHSV-1に相同性のあるファージが検出された2例の髄液IgGは、それぞれEB virus、HSV-1の構造タンパクに反応した。またそのバンドの分子量は、ホモロジー検索により選出されたウイルス構造タンパクの分子量に近似していた(図3)。その後さらに同様の検討を行った14例のうち12例では、やはりヘルペス属ウイルスをはじめ様々なウイルスや細菌と相同性を有する共通配列が認められた(表3)。症例6では異なる3時期(再発時及び寛解期)の髄液を検索したところ、EBVの3つのタンパクと相同な配列がいずれの髄液からも同様に検出された(表4)。EBVに相同な配列がみられた6例のうち3例ではWestern blotにてEBVの構造タンパクに反応がみられた。

考 察

(1)本邦のOB陰性MS例はOS-MSが多いが、C-MSにもOB陰性例が存在し、典型例と異なる臨床及び画像所見を呈したことから、これらの症例はOB陽性例とは異なる病態が関わっている可能性も考えられる。(2)IL-10とIL-6はともにIgG産生に関わるサイトカインであるが、再発時のIgG indexと有意な正の相関を示したのは髄液IL-10であった。このIL-10の起源についてはヒト由来のもの以外に、EBVのviral IL-10が関与しているかどうか今後検討したい。(3)今回のphage library法を用いたOBの認識エピトープの解析では、protein A-beadsを用いてIgGを選択的にbeads表面に捕捉し、ファージの非特異的結合を排除した点が、欧米における同様の検討と異なる。その結果、ヘルペス属ウイルスをはじめ種々のウイルスや細菌などに相同な共通配列が検出されたが、中枢ミエリンタンパクとの相同性はほとんどみられなかった。今後は同定され

た抗原を用いたOBの吸収実験やそれらの微生物の中枢神経内での潜伏感染の有無などMSにおける病因的意義を検討する必要がある。

まとめ

(1)IEFにおけるOB陽性率はC-MSでは67.9%、OS-MSでは10%で有意差がみられた。またOB陰性C-MSの多くは非典型的な脳MRI所見を呈した。(2)再発時の髄液中におけるIgG産生に髄液IL-10が関わっていることが示唆された。(3)MS患者の髄液oligoclonal IgGは患者毎に異なる抗原エピトープを認識していることが示された。少なくとも一部の患者ではヘルペス属ウイルスのようなubiquitous virusの構造タンパクを認識しているものと考えられる。

文 献

- 1) Nakashima I, et al. Significant correlation between IL-10 levels and IgG indices in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 111; 64-7, 2000
- 2) Cortese I, et al. Identification of peptides specific for cerebrospinal fluid antibodies in multiple sclerosis by using phage libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93:11063-7, 1996.
- 3) Rand KH, et al. Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 (EBNA-1) associated oligoclonal bands in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci*, 173:32-9, 2000.

表3 MS14例における共通アミノ酸配列の
相同性検索結果

(相同性を認めたものを○、相同性のより高いものを◎で示す。)

症例	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
EBV	○◎					◎○				○				◎
HCMV	○◎				○	○	○					○	○	○
HSV-1	○					○	○		○	○		○		○
HSV-2						○								○
HHV-6														○
VZV					○									○
ADE						○	○		○					
HPV									○	○		◎		○
VACCV						○	○			○				○
E.coli	○	○			◎	◎	○	○	○	○	○	○	○	○
MYCTU	○	○			◎	○	○	○	◎	○	○	◎	○	○

表4 1症例(MS6)の異なる3病期の検体における共通アミノ酸配列

	(SPxxMH)	(DPYQxP)	(PYxxYQxP)
1999.12	SPPKMH	DPYQVP	PYEFYQYP
	SPKSMH	GPYQDP	PYLNYQHP
	SPPLMH	DPYQLP	
	SPRNMH		
	SPVHMH		
2000.1	SPRIDH	DPYQLP	PYTGYP
	SPPLMH	DPYQSL	PYAGYP
	SPGMH	DPYQVY	
		DQYQQP	
2000.10	SPYHSH	DYYQQH	PYSPYQLP
	SPRNMH	DPYQTA	PYNYLQTP
	SPGNMH	DPYQLP	TYGAYQLA
			PYAHYQPY

多発性硬化症患者における Heat shock protein 70 遺伝子及び $\beta 2$ adrenergic receptor 遺伝子多型についての検討

新野 正明¹⁾ 宮岸 隆司¹⁾ 菊地 誠志¹⁾ 深澤 俊行²⁾
奥水 修一¹⁾ 矢部 一郎¹⁾ 田代 邦雄¹⁾

目的

多発性硬化症 (MS) は、複数の遺伝的要因と後天的要因との相互作用によって発症に至る、多因子疾患であると考えられている。現在、多因子疾患の感受性遺伝子決定のためのアプローチとして用いられているのは、主として罹患同胞対 (affected sib-pair) 法を用いた連鎖解析 (linkage analysis) と、候補遺伝子 (candidate gene) を設定した association analysis である。前者の方法は、未知の遺伝子をも検討できる点が優れているが、検出感度が弱く、多数の罹患同胞対の解析が必要であることが難点であり、MS における全ゲノムスクリーニングの検索では、HLA 領域との連鎖を証明したのみで十分な成果をあげているとは言い難い。一方、後者の方法では、既知の遺伝子から候補遺伝子を設定し、その変異と疾患との関連を解析するもので、検出感度が高く、弱い寄与の感受性遺伝子も検出することができる。多因子疾患である MS では、遺伝的因子についてもいくつかあることが推測され、我々が用いている case-control study は MS の病因に迫る上で大変有用な方法と考えられる。これまで我々は、vitamin D 受容体遺伝子多型及び estrogen 受容体遺伝子多型についての検討を行い、その関連性を研究してきた^{1) 2)}。遺伝子多型については、人種差によるものも考えられ、日本人における多型についての検討が是非必要と思われる。

Heat shock protein (HSP) 70 は、最近、MS 患者末梢血 T cell において、recombinant HSP 70 に対する proliferation が亢進していたと報告された³⁾。また、その遺伝子は HLA class III 領域に存在することが最近明らかにされ、その多型と自己免疫疾患との関連が推測され、検討されてきている。一方、 $\beta 2$ adrenergic receptor は、正常白質の astrocyte においては発現しているのに対し、MS 患者の白質の astrocyte において発現していないことが最近報告され、その発現が MS に影響がある可能性が考えられている⁴⁾。以上のことから、それぞれの遺伝子多型が MS に影響を及ぼしている可能性を考え、今回、我々は、HSP 70 遺伝子及び $\beta 2$ adrenergic receptor 遺伝子の多型を MS 患者-健常対照群で比較し、MS の発症及び臨床症状への影響などを検討した。

対象・方法

対象は最低 1 年以上経過している臨床的に診断確実な通常型 MS (C-MS) 患者および健常対照者である。HSP 70 遺伝子多型の検討症例は患者 107 例、対照 82 例であった。末梢血より得られた DNA を用い PCR-RFLP 解析を行い、HSP70-1, -2, -hom においてはそれぞれ制限酵素 Bsr BI, Pst I, Nco I にてそれぞれの遺伝子多型を得、それぞれの多型を患者-対照間で比較検討した。また、臨床像、HLA 背景などとの関連を検討した。一方、 $\beta 2$ adrenergic receptor においては、C-MS 患者 97 例、健常対照者 94 例で解析を行った。方法は nucleotide 46 (Arg 16 to Gly) について、野生型あるいは変異型のセンスプライマーにアンチセンスプライマーを加え、PCR にて増幅し、wild type の homozygote, heterozygote, mutant type の homozygote を得た。こちらも同様に臨床像、HLA 背景などとの関連を検討した。

結果

MS 患者及び健常対照者の HSP70 遺伝子多型の分布を Table 1 に示す。genotype 及び allele frequency の検討では、MS 患者-健常対照者に差はなかった。更に、MS 患者群において、臨床像、経過および MRI 所見と HSP70 遺伝子多型との間に関連はなかった。また、 $\beta 2$ adrenergic receptor 遺伝子多型の分布については、Table 2 に示す。こちらの多型も MS 患者-健常対照者に差はなく、MS 患者群において、臨床像、経過および MRI 所見と HSP70 遺伝子多型との間に関連はなかった。

考察

今回我々が検討した、HSP70 遺伝子多型と MS については、これまで、HSP70-2, -hom については、Canada からの報告がある⁵⁾。その結果、MS 患者-健常対照者で genotype 等に有意な差はなく、HLA-DR2 を match させた検討でも特に差はなかったと報告されている。その他、今回我々が検討していない promoter region の多型についての検討が、Italy から報告されているが、こちらも susceptibility gene の可能性は少ないと結論づけている⁶⁾。今回我々は、今まで報告に報告のある HSP70-2, -hom

1) 北海道大学神経内科
2) 北祐会神経内科病院

に加え、HSP70-1についても検討したが、日本人のデータでもこれらHSP70遺伝子多型はsusceptibility geneとしての可能性や、臨床症状への影響の可能性は低いと考えられた。また、 β 2 adrenergic receptor 遺伝子多型についても、nucleotide 46の部位についてはMSへの関与は低いと考えられた。しかしながら、Table 3に示すように、同じHSP 70-2, -homの遺伝子多型が、ethnicityにより大きく異なっており、他の遺伝子多型においてもethnicityによる違いが十分考えられる。以上より、欧米において報告されている遺伝子多型でも、日本人においての検討が是非必要と思われる。

まとめ

MSの発症や臨床症状にHSP 70 遺伝子多型及び β 2 adrenergic receptor 遺伝子多型が関係している可能性は低いと考えられる。

文献

- 1) Fukazawa T. et al. Association of vitamin D receptor gene polymorphism with multiple sclerosis in Japanese. *J Neurol Sci* 166: 47-52, 1999.
- 2) Niino M. et al. Vitamin D receptor gene polymorphism in multiple sclerosis and the association with HLA class II alleles. *J Neurol Sci* 177: 65-71, 2000.
- 3) Niino M. et al. Estrogen receptor gene polymorphism in Japanese patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 179: :70-75, 2000.
- 4) Salvetti M. et al. T-lymphocyte reactivity to the recombinant mycobacterial 65- and 70-kDa heat shock proteins in multiple sclerosis. *J Autoimmun* 5: 691-702, 1992.
- 5) Keyser J. et al. Astrocytes in multiple sclerosis lack beta-2 adrenergic receptors. *Neurology* 53: 1628-1633, 1999.
- 6) Ramachandran S and Bell RB. Heat shock protein 70 gene polymorphisms and multiple sclerosis. *Tissue Antigens* 46: 140-141, 1995.
- 7) Cascino I. et al. HSP70-1 promoter region polymorphism tested in three autoimmune diseases. *Immunogenetics* 39: 291-293, 1994.

Table 1. Distribution of HSP70 genotype in MS patients and healthy controls

Genotype	Patients n=107 (%)	Controls n=82 (%)
HSP70-1		
*b1/*b1	82 (76.6%)	53 (64.6%)
*b1/*b2	21 (19.6%)	26 (31.7%)
*b2/*b2	4 (3.7%)	3 (3.7%)
HSP70-2		
1/1	13 (12.1%)	10 (12.2%)
1/2	66 (61.7%)	45 (54.9%)
2/2	28 (26.2%)	27 (32.9%)
HSP70-hom		
1/1	61 (57.0%)	56 (68.3%)
1/2	44 (41.1%)	26 (31.7%)
2/2	2 (1.9%)	0 (0.0%)

No significant differences were detected (P>0.05).

Table 2. Distribution of β 2 adrenergic receptor genotype in MS patients and healthy controls

Genotype	Patients n=97 (%)	Controls n=94 (%)
Genotype frequencies		
W / W	22 (22.7%)	26 (27.7%)
W / M	47 (48.5%)	48 (51.1%)
M / M	28 (28.9%)	20 (21.3%)
Allele frequencies		
W	91 (46.9%)	100 (53.2%)
M	103 (53.1%)	88 (46.8%)

W=wild type, M=mutant type

No significant differences were detected (P>0.05).

Table 3. HSP 70-2 and -hom gene polymorphisms

		Ramachandran S et al. Tissue Antigens 1995; 46: 140-141.		Our cases	
		MS patients	Controls	MS patients	Controls
HSP 70-2 (Genotype frequencies)					
1/1	26 (40.0%)	29 (48.3%)	13 (12.1%)	10 (12.2%)	
1/2	31 (47.7%)	25 (41.7%)	66 (61.7%)	45 (54.9%)	
2/2	8 (12.3%)	6 (10.0%)	28 (26.2%)	27 (32.9%)	
HSP 70-hom (Genotype frequencies)					
1/1	1 (1.7%)	4 (6.5%)	61 (57.0%)	56 (68.3%)	
1/2	28 (47.5%)	32 (38.7%)	44 (41.1%)	26 (31.7%)	
2/2	30 (50.8%)	35 (54.8%)	2 (1.9%)	0 (0.0%)	

多発性硬化症の寛解維持には type 2 cytokine 産生 NK 細胞(NK2)が関与する

高橋 和也¹⁾ 三宅 幸子¹⁾ 近藤 誉之¹⁾ 山村 隆¹⁾

目的

多発性硬化症(MS)は人の中枢神経をターゲットとする自己免疫疾患の1つで、寛解再発を繰り返すことがその臨床的特徴の一つにあげられる。MSの動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)ではnatural killer (NK)細胞が疾患抑制的に働くことを我々は証明してきた(1)。しかし、実際のMSでのNK細胞の役割は依然明確にはなっていない。

一方で、近年NK細胞にはサイトカインの分泌パターンからIFN γ を大量に産生するNK1、IL-5、IL-13を主として産生するNK2と、T細胞様のサブセットの存在が考えられるようになってきた(2)。

今回、我々は西洋型寛解再発多発性硬化症の寛解期でステロイドや免疫抑制剤の未投与の患者を対象にし、NK細胞の機能をサイトカインの分泌を中心に健常人と比較検討したところ、寛解期MSではNK細胞のIL-5分泌能が増加し再発時には低下していることを見出した。またIL-5分泌能の亢進しているNK2細胞がT細胞のIFN γ 産生を抑制することも見出した(3)。これらのことによりMS寛解期にNK細胞がNK2に偏倚し自己免疫性T細胞を抑制している可能性が示唆されたので報告する。

方法

1.subjects

臨床的に3ヶ月以上症状に変化がなく免疫抑制剤等の投与を受けていない患者。

2. purification of NK cells and generation of NK subset

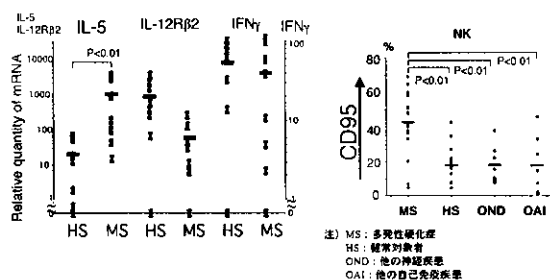
末梢血NK細胞およびT細胞は磁気ビーズによるnegative selection法で得た。NK1,NK2細胞はPerittらの方法(2)に準拠して誘導した。誘導されたNK1,NK2細胞はT細胞とPMA/ionomycin存在下に共培養された。

3.flowcytometry

表面抗原の染色に抗CD3, 抗CD56, 抗CD95の各蛍光抗体を使用した。

細胞内染色のためにPMA/ionomycin刺激3時間後に

図1 MSではNK細胞のIL-5の産生能及びCD95陽性NK細胞が増加している



brefeldin Aを添加、さらに3時間培養後細胞を固定及び透過処理を行いサイトカインの染色を行った。

4.RT-PCR for cytokine measurement

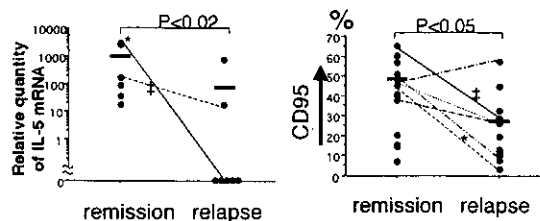
IFN γ , IL-5, IL12R β 2の定量的RT-PCRのために各cDNAは β -actinで補正され、SYBR-Gを用いたLightCyclerシステムで定量された。

結果および考察

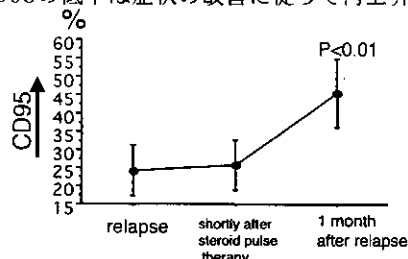
1. 寛解期多発性硬化症患者末梢血NK細胞は健常人と比しIL-5産生能が増加しておりCD95弱陽性細胞も増加していた。これはPerittらの

図2

a) IL-5及びCD95は再発時に低下する

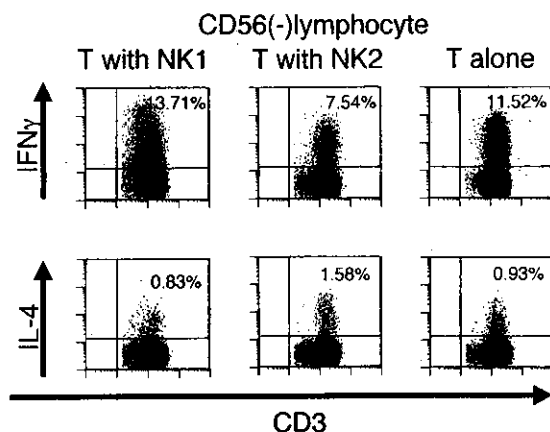


b) CD95の低下は症状の改善に従って再上昇する



¹⁾国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部

図3 NK2細胞はT細胞のIFN γ 産生を抑制している



提唱するNK2細胞優位になっていることを示唆する。
(図1)

2.増悪期には末梢血NK細胞IL-5産生能、CD95弱陽性細胞ともに減少していた。(図2)

3.NK2細胞はT細胞のIFN γ 産生を抑制した。(図3)

以上のことからMSの寛解期にNK2偏倚したNK細胞は調節細胞として自己免疫性T細胞を抑制しており、なんらかの原因でNK2細胞が減少したことにより、自己免疫性T細胞が活性化されやすくなりMSが再発するというモデルが考えられる。しかしNK2細胞の減少が再発前か再発後かは現在のところ不明である。もし、再発前より低下がみられるのであれば症状の悪化の予知という意味で重要であり、治療面でも予防的ステロイドパルス療法の可能性が考えられ、今後この点を調べていく必要がある。

まとめ

多発性硬化症寛解期の維持にNK2偏倚したNK細胞が自己免疫性T細胞を抑制する調節細胞として働いている可能性が考えられた。

文献

1) Zhang B et al: Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by natural killer (NK) cells. *J Exp Med* 186: 1677-1687, 1997

2) Peritt D et al: Differentiation of human NK cells into NK1 and NK2 subsets. *J Immunol* 161: 5821-5824, 1998

3) Takahashi K et al: Natural killer type 2 (NK2) bias in remission of multiple sclerosis. *J Clin Invest* 107: in press, 2001

フォスフォジエステラーゼ阻害薬による多発性硬化症の治療

—臨床治験にむけて—

錫村明生¹⁾ 佐古田三郎²⁾ 藤原一男³⁾ 深浦彦彰⁴⁾ 菊地誠志⁴⁾
湯浅龍彦⁵⁾ 松井 真⁶⁾

目 的

昨年度までの当班会議においてフォスフォジエステラーゼ阻害薬 (PDEI) がグリア細胞の TNF α や NO の産生を抑制し、抑制性サイトカインである IL-10 を誘導することから MS における炎症性脱髄の治療薬の候補になりうること、異なった 3 種類の PDEI が相乗的に働き通常容量でも EAE やヒトの MS の抑制に働くことを示してきた¹⁻⁴⁾。MS における Open Trial では、PDEI 療法が末梢血のヘルパー T 細胞を Th1 優位から Th2 優位に変化させることも明らかにしてきた。この PDEI の 3 種混合療法は安全かつ有用と考えられるが、3 種類の薬剤を用いることから Controlled Study が難しい。

今年度より PDEI の臨床応用に向けて、2 つの別のアプローチが始まっている。ひとつは阪大、東北大、北大と当施設の共同研究で、もうひとつは平成 12 年度精神神経疾患研究委託費・神経臨床研究班 (湯浅班) の国立病院ネットワークを中心とした共同研究である。前者は臨床応用に先駆けて臨床免疫学的に PDEI の有用性のエビダンスを蓄積しようとする試みであり、後者はより多くの症例を用いて臨床治験を目指している。

今回はこの 2 つの試みの現在までの進行状況を示し、今後の研究の進め方について討論したい。

方 法

(1) 二重盲検試験を円滑に行なうために 1 種類の PDEI を選択し、臨床治験の前段階として、再発寛解型 MS における PDEI の作用機序を検索する。PDEI としてイブジラスト (ケタス) をもちい、これを短期間投与し、投与前後の免疫能の変化を解析する。

(2) 国立病院ネットワークを利用し、パイロットスタディーの終了している PDEI 3 種混合療法の臨床治験の道を探る。対象は過去一年間に 1 回以上の再発を認めた再発寛解型 MS 患者 30 名で、趣旨を理解し文書による同意を得た患者。プロトコール: イブジラスト (60mg/日、分 3) 投与前 (8 週間)、投与中 (8 週間)、投与後 8 週間) の各時期におのおの 2 回ずつへパリン加末梢血 15ml、血清 5ml を採血。速やかに指定の宅急便業者で東北大神経内科へ送る。

末梢血リンパ球をさらに磁気細胞分離システム (autoMACS、第一化学) を用いて、CD4 陽性細胞、CD4 陰性細胞、NK-T 細胞陽性細胞に分離、冷凍保存。

検査項目:

(1) Th1/Th2 バランス

分離細胞より RNA を抽出、RT-PCR 法にて、Th1、Th2 サイトカイン (IFN γ 、IL-2、IL-4、IL-10、TNF α) の mRNA の表現を検索する。

(2) TCR レパトア

TCRV β 領域を CDR3 spectratyping 法にて解析

1) 名古屋大学環境医学研究所

2) 大阪大学神経内科

3) 東北大学神経内科

4) 北海道大学神経内科

5) 国立精神神経センター国府台病院

6) 国立療養所宇多野病院

し、特定の TCR をもつ T 細胞の増殖の有無を検討する。

(3) NT-T 細胞サブセット

NT-T 細胞分画より RNA を抽出し Th1、Th2 サイトカインの mRNA の表現を検討する。

(4) matrix metalloproteinase およびその inhibitor の量的解析

血清、一部は髄液中のレベルを ELISA によって検討する。

結果

予備実験として、他施設から東北大学への輸送にともなう細胞の組成、細胞収穫率の変化を検討した。すべてのケースで発送翌日には到着し、15ml の採血で、単核細胞数および CD4 陽性細胞の収穫量はそれぞれ $5 \sim 10 \times 10^6$ 、 $2 \sim 4 \times 10^6$ で、CD4 陽性細胞の純度は 97~99% であった(図 1)。現在までのところ各施設倫理委員会で承認を得て 6 人の患者を登録し、プロトコールにしたがって薬剤投与、採血検査が進行中である。

国立病院ネットワークの研究は準備委員会が作成され、3 種混合療法に向けた検討に入っている。

考察

我々は昨年度までに PDEI が MS の治療薬の有効な候補であることを示してきたが、同時に企業主導ではない、研究者主体の臨床試験の困難さも指摘してきた。現在本研究は進行中ではあるが、PDEI 使用(適応外使用)に対し学術的裏付けをつける目的は達成できると考えられる。本研究とそれに引続く多施設による二重盲検試験により、さらに本療法の有効性を明らかにできると考えられる。

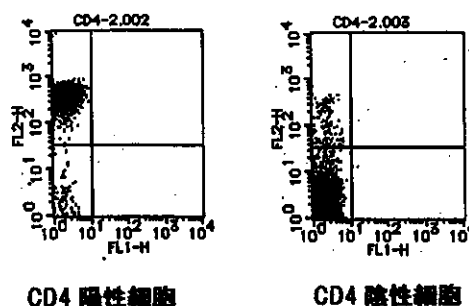
本研究は二重盲検試験とそれに引続く適応申請を視野に入れ、PDEI を 1 剤で投与するプロトコールを採用したが、昨年度までの報告で示したごとく、異なった 3 種の PDEI は協調性に働き、より有効に MS の再発を予防できると考えられる。その意味で、今回、平成 12 年度精神・神経疾患研究委託費「神経疾患臨床研究」班(湯浅班)で PDEI の 3 種混合療法の臨床試験にむけた検討が始まったことは意義深い。この 2 つの研究を協力しながら進め

ることにより、近い将来、研究者主体の臨床研究から新しい治療法の開発も可能となると考えられる。

まとめ

PDEI は現在幅広く安全に使われている薬剤であり、従来いくつかの知見から多発性硬化症の再発予防薬として期待されている⁵⁾。今回 MS への適応拡大にむけた研究者主体の 2 つのプロジェクトがスタートし、MS 治療の新しい選択肢ができる可能性が期待される。

図1. CD4 陽性細胞の純度(autoMACS 一回処理後)



文献

1. Suzumura, A., et al. Drop in relapse rate of multiple sclerosis patients using combination therapy of three different phosphodiesterase inhibitors. *Multiple Scler.* 6: 56-58, 2000.
2. Suzumura, A., et al. Ibudilast Suppresses TNF α Production by Glial Cells Functioning Mainly as Type III Phosphodiesterase Inhibitor in the CNS. *Brain Res.* 837: 203-212, 1999.
3. Suzumura, A. and Sawada, M. Effects of vesnarinone on activation of murine microglia. *Life Science* 64: 1197-1203, 1999.
4. Suzumura, A., 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.
5. Dinter, H. et al. Phosphodiesterase type IV inhibitors in the treatment of multiple sclerosis. *J. Mol. Med.* 75: 95-102, 1997.

インターフェロン治療による鬱の発症機序に関する研究

錫村明生¹⁾ 伊藤由里²⁾ 鈴木樹理³⁾

目的

インターフェロン (IFN) 治療により高率に鬱が発症することが知られている^{1)~3)}。本邦でも今後多発性硬化症における IFN 治療が主流となると考えられ、鬱の発症機序の検索とその対策は急務と考えられる。今回はこの機序を探索する目的で、アカゲザルにインターフェロン α を投与し、髄液中のサイトカイン、モノアミンおよびその代謝産物を検索し、鬱状態の発症機序にアプローチした。

方法

アカゲザル10頭をもちい、無治療群と IFN 治療群に分けた。IFN 群は30万単位/頭のインターフェロン α を10日間筋注、ついで、週3回のわりで7週間注射し、対照群は同時期に生食を注射した。前、1~12週目に麻酔下で血液、髄液を採取し、血清、髄液中のサイトカイン(IL-1, 2, 3, 5, 6, TNF α , IFN γ)、モノアミンおよびその代謝産物を測定した。サイトカインの測定は既報の Bioassay⁴⁾およびヒトサイトカイン用の ELISA キットを用いて行い、モノアミンと代謝産物の測定は高速液体クロマトグラフィーを用いて tyrosin (Try)、homovanilic acid (HVA)、tryptophan (Trp)、5HIAA、MHPG を測定した。鬱の指標として体重の変化、食餌摂取量の経時的観察とともに、ビデオモニターを用いて行動観察を行った。

結果

血清、髄液中のサイトカインには有意な上昇は見ら

れなかった。インターフェロン注射群で1週目から髄液中の tyrosin、tryptophan、MHPG の有意な低下を認めた。これらの低下は注射終了後4週目でも有意であった(図)。体重の変化は両群に差異はなく、明らかな食欲低下も見られなかった。IFN 投与群で1例に攻撃性の低下が認められたが、行動量の減少も認められなかった。ビデオモニターの結果は現在検討中である。

考察

鬱状態などの精神障害、気分の変調などの発症機序は不明であるが、これらが後遺症を残さず治りうることを考えると、脳の機質的な変化よりも一時的な機能調節障害と考えられる。今回のモデルはサイトカインである IFN を投与することによって鬱を惹起するものであり、IFN が他のサイトカインの産生誘導を介してモノアミンニューロンに作用する可能性が考えられる。IFN によって誘導されるサイトカインの代表は IL-1 と TNF であるが、今回はこのどちらの上昇も認められなかった。したがって IFN がどのような経路でモノアミンニューロンに作用するかは明らかにすることができなかったが、サイトカインがモノアミンニューロンの活動を低下させることは明らかになった。鬱のモノアミン仮説が提唱されるようになった契機はノルアドレナリンやセロトニンを枯渇させるレセルピンの抑鬱症状惹起作用の発見である⁵⁾。以後、ノルアドレナリンやセロトニンの欠乏説が中心であったが、1970年代に入り、鬱病患者でドパミンの最終代謝産物であるホモバニリン酸(HVA)の髄液中濃度が低下していることが示され、ドパミンの低下が鬱の発症に

¹⁾ 名古屋大学環境医学研究所

²⁾ 藤田保健衛生大学医学部神経内科

³⁾ 京都大学霊長類研究所

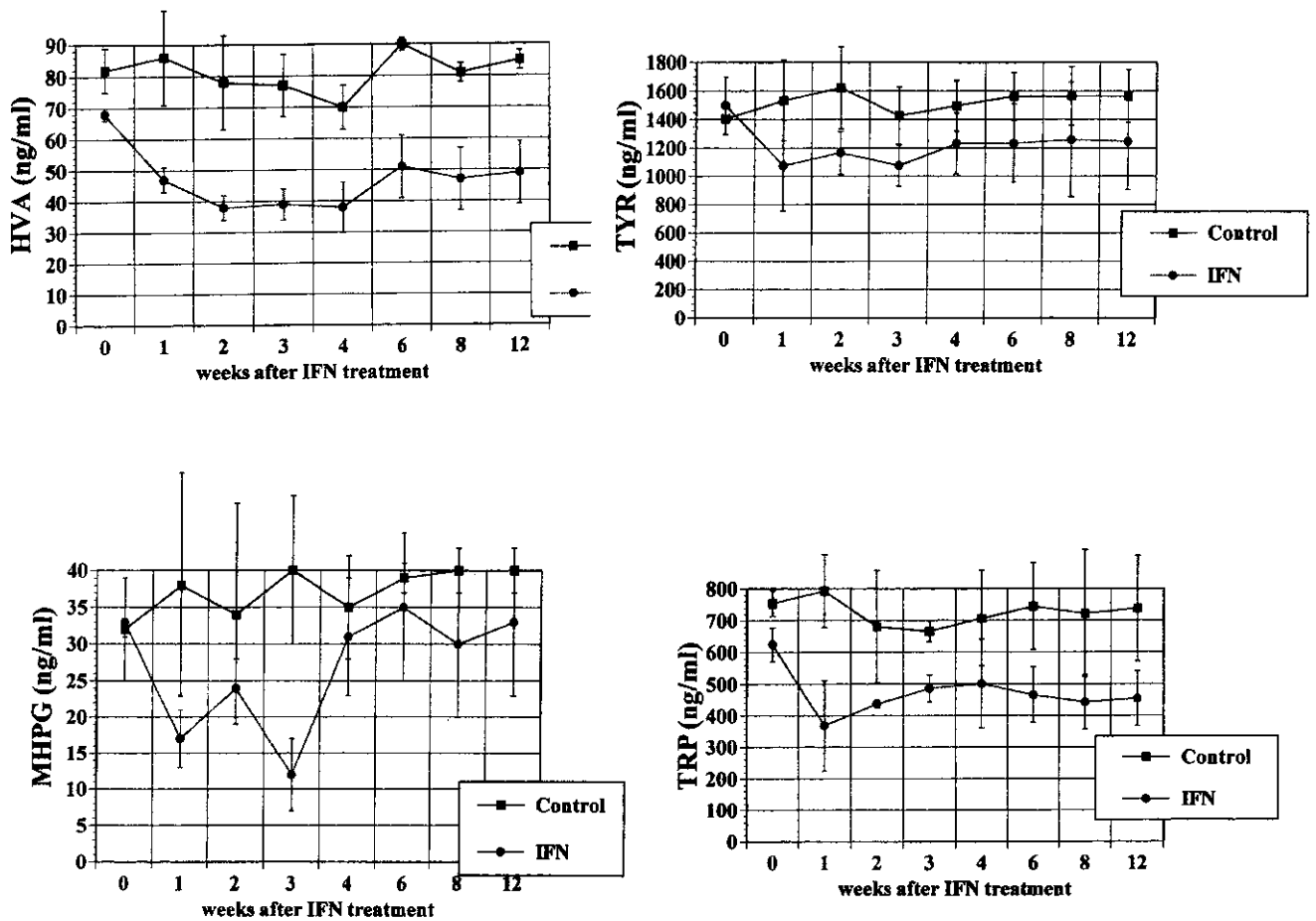


図1. 髄液中モノアミン代謝産物の推移

関与していることが推測されている⁶⁾。

今回の成績から、IFN が直接または今回検出されなかった他のサイトカインを介して、ドパミン系、ノルアドレナリン系の神経を抑制している可能性が考えられた。

まとめ

インターフェロン療法が鬱を惹起する機序を探索する目的で、アカゲサル 10 頭をもちいて INF 投与後の血清、髄液中のサイトカイン、モノアミン代謝産物の測定を行なった。この結果 IFN がモノアミンニューロンを抑制することが明らかになった。この抑制は中止後 4 週間以上持続した。

文 献

1) Okanoue, T. et al.: Side effects of high-dose interferon therapy for chronic hepatitis C. *J. Hepatol.* 25: 283-291,

1996.

2) Juengling, F.D., et al.: Prefrontal hypometabolism during low-dose interferon α treatment. *Psycho-pharmacol.* 152: 383-389, 2000.

3) Feinstein A.: Multiple sclerosis, disease modifying treatments and depression; a critical methodological review. *Mult Scler.* 6: 343-348, 2000.

4) Suzumura, A. et al.: Selective induction of interleukin-6 in mouse microglia by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Brain Res.* 713:192-198, 1996.

5) Wilner, P.: Dopamine and depression; a review of recent evidence. *Brain Res Rev* 6:211-225, 1983

6) 小山 司: うつ病とモノアミン。神経精神薬理。11:311-316. 1989

リンパ球細胞内サイトカイン検索と膜表面抗原解析結果の相関について

齋田 孝彦¹⁾ 松井 真 荒谷信一 王 会雲

目 的

再発・寛解型の多発性硬化症 (MS) では、再発予防を目的に様々な免疫修飾療法が試みられている。これらの治療の効果判定には、臨床的な指標に加え、正確に疾患活動性を評価し得る客観的な免疫学的指標を使用することが望ましい。われわれは、中枢神経ミエリンに対するTh1介在性の自己免疫機序が想定されているMSの疾患活動性の指標として、末梢血リンパ球の細胞内サイトカイン検索が有用であることを既に報告してきた。一方、表面抗原としてのケモカイン受容体検索は、Th1/Th2バランスの解析に有用であると指摘されている。今回、両者のパラメータ間の相互関係を明らかにすることで、これらの検査による免疫学的モニタリングの意義をより明確にすることを試みた。さらに、従来より便宜的に使用されてきた、ヘルパーT細胞やサブプレッサー・細胞傷害性T細胞などのフローサイトメトリーによる解析の意義も併せて検討した。

対 象

健康成人11名 (38±6.2歳) について以下の検索を行った。

方 法

a) 細胞内サイトカイン検索

(1) IFN- γ とIL-2をTh1側の、IL-4をTh2側のサイトカインとして設定し、中枢神経系の脱髄への関与が示唆されているTNF- α も検索対象とした。

(2) 一人につき8~16 mlの採血を行い、型通りFicoll-Paque比重遠沈法により末梢血単核球を取り出した後、 $0.2\sim 1.0 \times 10^6/\text{ml}$ に調整し、Brefeldin A (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) と Monensin (1 μM) の存在下で培養した。刺激は最終濃度20ng/mlのPMAと2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のIonomycinにより、4時間かけて行った。

(3) 上記の培養の後、PE標識抗CD4および抗CD8抗体を用いて摂氏4度下30分間で表面抗原を染色した。さらに、市販の試薬を使用して膜表面の固定に引き続いて permealizationを行った後、FITC標識抗IFN- γ 、抗IL-2、抗IL-4抗および抗TNF- α 抗体を加えて摂氏4度下で45分間、細胞内のサイトカインを染色した。

b) 膜表面抗原の解析

(1) ヘルパーT細胞のうち、Th1細胞の指標として知られるCCR5およびCXCR3に加えて、Th2細胞の指標として知られるCCR3とCCR4の4種のケモカイン受容体を解析対象とした。さらに、いわゆるhelper inducer T細胞として分類されるCD4+CD29+細胞、suppressor inducer T細胞として位置づけられるCD4+CD45RA+細胞、CD11a陽性で細胞傷害性T細胞と考えられるCD8細胞、CD11a陰性で抑制性の機能的リンパ球集団を含むCD8細胞などの分画も検索対象とした。

(2) 末梢血より取り出した単核球は、染色1項目あたり50 μl の2.5%FCS添加PBSに浮遊させた。

以下のようなFITCおよびPE標識抗体の組み合わせにより二重染色を行った。CD4/CCR3, CCR4/CD4, CD4/CCR5, CD8/CCR5, CXCR3/CD4, CXCR3/CD8, CD4/CD29, CD4/CD45RA, CD8/CD11a。

各項目の二重染色はいずれも4°Cで45分間行い、フローサイトメトリーにより蛍光陽性細胞を算定した。

結 果

1) 健康人11名におけるリンパ球細胞内サイトカインの検索結果を表1に、リンパ球膜表面抗原の解析結果を表2に示した。末梢血におけるIFN- γ 産生はCD8細胞優位に認められ、大部分のIL-2はCD4細胞により産生されていた。

2) 細胞内サイトカインと膜表面ケモカイン受容体の関係では、IFN- γ 産生細胞 ($p < 0.01$) およびTNF- α 産生細胞 ($p < 0.01$) がCD8+CXCR3+細胞存在率と有意の相関を示した (図1aおよび図1b)。IL-4産生細胞は、CD4+CXCR3+細胞存在率と有意の負の相関を示した ($p < 0.04$ by Kendall's analysis; 図2)。IL-2産生細胞は、全CCR5陽性リンパ球と負の相関を示した ($p < 0.05$)。

3) 細胞内サイトカインと機能的リンパ球亜分画の関係では、IFN- γ 産生細胞はCD4+CD45RA+細胞と ($r = -0.72, p < 0.01$)、IL-2産生細胞はCD8+CD11a+細胞と ($r = -0.6, p < 0.05$) 有意の負の相関を示した。さらにTNF- α 陽性細胞は、CD4+CD29+細胞と有意の正相関を ($r = 0.68, p < 0.02$)、CD4+CD45RA+細胞とは有意の負の相関を示した ($r = -0.71, p < 0.02$)。

¹⁾ 国立療養所宇多野病院神経内科

表1：健康成人におけるリンパ球細胞内サイトカイン

	(mean %)
CD4+IFN- γ +	12.3
CD8+IFN- γ +	19.9
IFN- γ +	43.9
CD4+IL-2+	15.6
CD8+IL-2+	3.4
IL-2+	19.3
CD4+TNF- α +	13.9
CD8+TNF- α +	9.0
TNF- α +	27.0
CD4+IL-4+	1.8
CD8+IL-4+	0.3
IL-4+	2.2

表2：健康成人におけるリンパ球膜表面抗原

	(mean %)
ケモカイン受容体陽性細胞	
CCR3+	3.0
CD4+CCR3+	1.1
CCR4+	11.1
CD4+CCR4+	6.8
CCR5+	5.7
CD4+CCR5+	1.4
CD8+CCR5+	2.7
CXCR3+	35.8
CD4+CXCR3+	12.3
CD8+CXCR3+	15.6
機能的亜分画	
CD4+CD29+	18.4
CD4+CD45RA+	22.2
CD8+CD11a+	12.4
CD8+CD11a-	4.8

図1. CD8+CXCR3+細胞と細胞内サイトカイン陽性細胞の相関

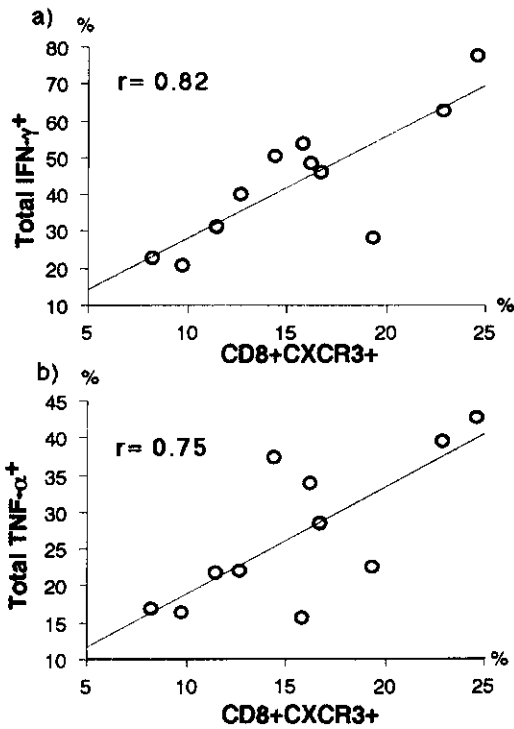
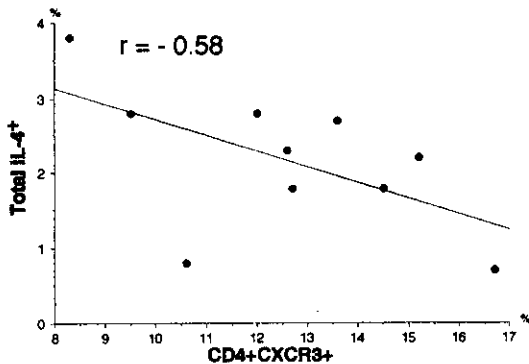


図2. CD4+CXCR3+細胞とIL-4産生細胞の相関



考察とまとめ

1) CXCR3については、CD4側ではなくCD8陽性のTc1とも表示すべきリンパ球がIFN- γ やTNF- α 産生細胞数と相関していた事実、およびCD4+CXCR3+細胞存在率とIL-4産生細胞は負の相関が認められた両者の結果から、CXCR3をTh1型サイトカイン産生細胞の指標とみなすことは妥当である。ところが、CCR5陽性細胞とIL-2産生細胞の負の相関は、CCR5陽性ヘルパーT細胞の位置づけについて今後の慎重な検討が必要であることを示している。

2) CD4+CD45RA+細胞は従来 suppressor inducer Tと位置づけられてきたが、IFN- γ やTNF- α 産生細胞と負の相関を示し、実際に免疫制御性の機能を担っている可能性が示唆された。一方、CD4+CD29+細胞は helper inducer T細胞としての機能を担っていることが知られているが、MSの脱髄巣にも多く存在することが確認されている。この細胞の存在率がTNF- α 産生細胞と正の相関を示したことから、同細胞集団はMSの病因形成に重要な役割を果たしていることを示唆しており、例えば髄液に存在する同分画を測定する際の免疫病理学的意義を支持する結果と考えられた。

文献

- 1) 王 会雲, 他: 多発性硬化症髄液リンパ球サブセットの解析およびMRI所見との関連についての検討. *Neuroimmunology* 7: 60-61, 1999
- 2) 王 会雲, 他: 多発性硬化症患者におけるケモカイン受容体陽性細胞解析の意義. *Neuroimmunology* 8: 38-39, 2000

アストロサイト由来の自己反応性 T 細胞抑制因子 の解明と遺伝子クローニング

原 英夫、Gyorgy Fazekas、田平 武¹⁾

概 要

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 (EAE) は自己ミエリン抗原反応性 T 細胞により引き起こされ、中枢神経系の脱髄性脳炎を特徴とする。EAE の自然経過は一般に急性単相性で、急性期の炎症は自然に消退する。このとき、浸潤する T 細胞は多数がアポトーシスに陥っており、この機序が寛解につながると考えられる。そこで、マウスアストロサイト株をインターフェロン γ で刺激したものとしらないもの間でディファレンシャルディスプレイを行い、自己反応性 T 細胞のアポトーシスを誘導する因子を探索した。その結果、SPARC/osteonectin とホモロジーを示す物質と新規物質 G-7 を見出し、遺伝子をクローニングした。これらの遺伝子を CHO 細胞に強発現すると、自己反応性 T 細胞に比較的特異的にアポトーシスを誘導した。今後、これらのヒト遺伝子をクローニングし、MS の新規治療法を開発する考えである。

目 的

多発性硬化症 (MS) は中枢神経の脱髄疾患であり、自己ミエリン抗原反応性 T 細胞により引き起こされると考えられている。病気は一般に急性発症し、再発・寛解をくりかえす。その動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) はミエリン塩基性蛋白 (MBP) やプロテオリピッドプロテイン (PLP) 反応性 T 細胞により引き起こされ、中枢神経系に炎症性脱髄がおこる。EAE でも急性発症した病変は自然寛解し、動物が死亡をまぬがれた場合は、中枢神経系の炎症は終焉する。このとき、中枢神経系に浸潤した T 細胞の 50~60% がアポトーシスを起していることが報告されており (1)、T 細胞のアポトーシスが病気の回復にからんでいると考えられる。このとき、抗原を注射することでより強くアポトーシスを誘導できる (2)。しかし、T 細胞にアポトーシスを引き起こす細胞が何かは未だ明らかでない。その一つは抗原提示細胞であり、またアストロサイトの関与

も報告されている (3)。そこで、炎症病巣のアストロサイト、即ち炎症性サイトロカインであるインターフェロン γ に暴露されたアストロサイトの培養上澄を PLP 反応性 T 細胞に加えたところ、アポトーシスが誘導されることが分った。本研究はアストロサイト由来自己反応性 T 細胞のアポトーシス誘導因子を同定し、その遺伝子をクローニングすることを目的とする。

方 法

マウスアストロサイト細胞株 G26-24 にインターフェロン γ をかけたものとかけないものから mRNA を抽出し、cDNA に変換した。インターフェロン γ 処理細胞由来 cDNA にビオチンラベルしたインターフェロン γ 非処理細胞由来 cDNA を大過剰に加え、subtracted cDNA ライブラリーを作製し、シークエンスした。そのうち、未知の cDNA を中心に発現ベクターに組み込み、CHO 細胞に遺伝子導入し、蛋白質を発現させた。この CHO 細胞に PLP 反応性 T 細胞を加え共培養し、24 時間後に細胞を回収し、Annexin-V-FITC、PI、CD₄PE で染色し、アポトーシスが誘導された T 細胞の比率を flow cytometry で計測した。そして、アポトーシスを誘導した cDNA クローンの全長遺伝子を解析した。

結 果

subtracted cDNA 100 クローンのシークエンスを行い、GeneBank で homology 解析を行った。その中には既知遺伝子が多数認められ、未知遺伝子も約半数に上った。未知の遺伝子を中心に 50 クローンを CHO 細胞に各々遺伝子導入したところ、2 個の cDNA に PLP 反応性 T 細胞のアポトーシス誘導作用が見られた (図 1)。2 個の遺伝子とも PLP 反応性 T 細胞に比較的特異的にアポトーシスを誘導し、ConA 刺激脾細胞由来 CD₄⁺T、CD₈⁺T、B 細胞に対してはアポトーシスを誘導せず、OVA 反応性 T 細胞に対するアポトーシス誘導作用は弱かった。第一のクローンは 726bp からなる新規遺伝子で、DUF143 ドメインをもつ 228 アミノ酸をコードし、

1) 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第 6 部

hydrophobicity 解析から分泌蛋白であると考えられた。第二のクローンは細胞外マトリックスに分泌される多機能な cystein rich protein (SPARC/osteonectin) と高い homology を示した。前者は中枢神経系と骨格筋に主に発現し、後者は各組織とくに骨で発現が強く、脳ではシナプスの豊富な部位に発現している。

考 察

以上、我々はインターフェロン γ 処理アストロサイトから産生分泌され、自己反応性 T 細胞にアポトーシスを誘導する新規物質を見出し、その遺伝子をクローニングした。このような因子を発現誘導する薬剤あるいはこれらそのものを薬剤として開発すれば、MS を早期に治療できると期待される。今日、MS の急性期の治療はスラロイドしかなく、新しい角度からの治療法が開発されると期待される。

ま と め

アストロサイトから産生・分泌され、自己反応性 T 細胞にアポトーシスを誘導する新規物質を見出し、その遺伝子をクローニングした。

文 献

- 1) Pender MP: Activation-induced apoptosis of autoreactive and alloreactive T lymphocytes in the target organ as a major mechanism of tolerance. *Immunol Cell Biol* 77(3): 216-223, 1999
- 2) McFarland HI, Critchfield JM, Racke MK, Mueller JP, Nye SH, Boehme SA, Lenardo MJ : Amelioration of autoimmune reactions by antigen-induced apoptosis of T cells. *Adv Exp Med Biol*. 383: 157-166, 1995
- 3) Gold R, Schmied M, Tontsch U, Hartung HP, Wekerle H, Toyka KV, Lassmann H, Antigen presentation by astrocytes primes rat T lymphocytes for apoptotic cell death. A model for T-cell apoptosis in vivo. *Brain* 119 (Pt 2): 651-659, 1996

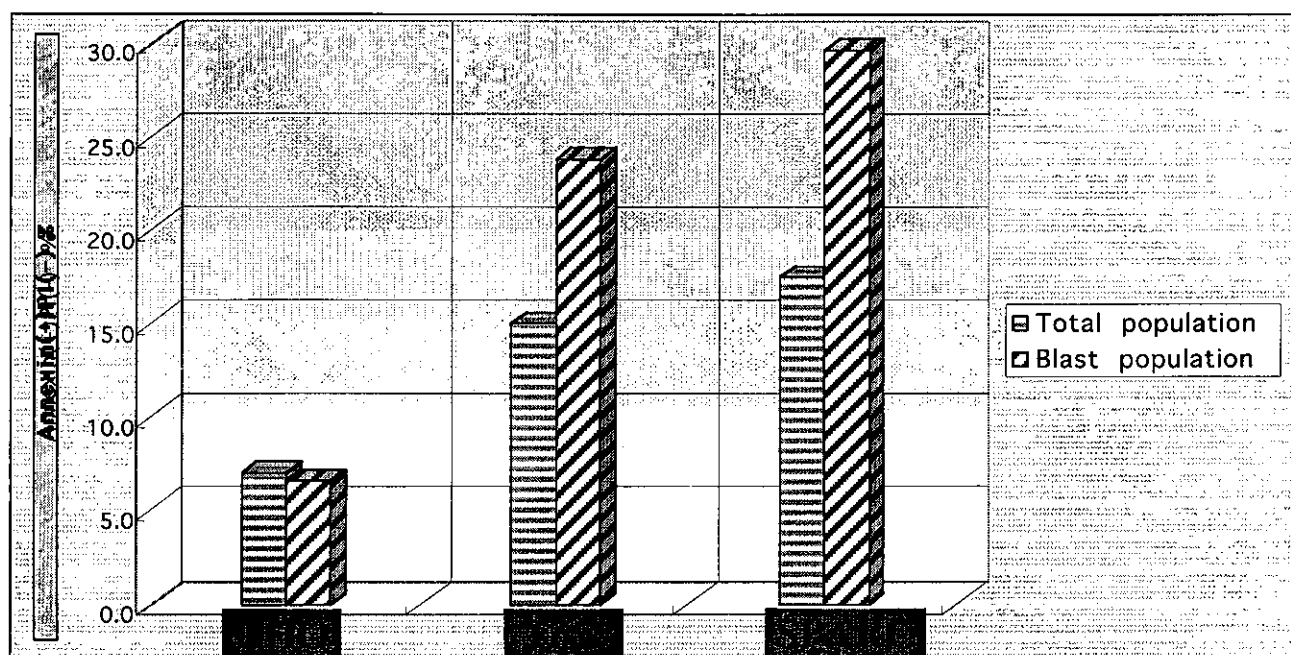


図1. Apoptosis of PLP-reactive T-cell lines.

アトピー性脊髄炎全国疫学調査報告： アトピー性脊髄炎とブタ回虫性脊髄炎の存在

小副川学¹⁾ 越智博文¹⁾ 名和行文²⁾ 吉良潤一¹⁾

目 的

これまでに我々は、アトピー性皮膚炎(atopic dermatitis; AD)に伴い頸髄炎が発症することや、AD の合併がなくても高IgE血症とダニ特異的IgE抗体が陽性である脊髄炎の存在を報告し、アトピー性脊髄炎(atopic myelitis; AM)との病名を提唱してきた¹⁾²⁾。さらにAMの脊髄病理所見が好酸球性炎症であることを報告してきた³⁾。今回我々は免疫性神経疾患調査研究班としてなされた全国疫学調査により集積された症例の臨床免疫学的検討を行うことを第1の目的とした。また生検で好酸球浸潤を伴う脊髄炎と確認された7症例の免疫学的・病理学的特徴を明らかにすることを第2の目的とした。

また我々は最近ブタ回虫幼虫移行症により脊髄炎のみを呈した2症例を経験し、その存在を世界で初めて報告した⁴⁾。そこでブタ回虫性脊髄炎とAMとの臨床免疫学的な相違を明らかにすることを第3の目的とした。

一方、名和らはブタ回虫抗体陽性者群ではダニやスギ花粉に対するIgE抗体保有率がブタ回虫抗体陰性者群の3-4倍の高値であることから、寄生虫感染がアトピー疾患の増悪因子となり得る可能性を指摘している。さらにADにおいても黄色ブドウ球菌エンテロトキシン(staphylococcal enterotoxin; SE)が、ADの増悪因子とされ、AD患者の約80%はSE特異的IgE陽性とされる。そこでAMでもSEやブタ回虫に対する抗体応答を検索し、これらの感染性因子が増悪因子として作用している可能性があるか明らかにすることを第4の目的とした。

対 象 ・ 方 法

1)全国疫学調査の検討

神経内科 364 施設、脳外科・脊髄外科 104 施設にアンケート調査を施行し、集積した症例について臨床免疫学的検討を行い、九大で経験した55症例と比較した。

2)好酸球性脊髄炎生検例における検索

対象は全国疫学調査にて当科に紹介された7症例(表)。いずれも脊髄腫瘍を疑って生検された。この生検組織(ホルマリン固定、パラフィン包埋標本)の免疫染色を含む病理学的検査を施行した。また全IgE、アレルギー特異的IgE、血清ブ

タおよびイヌ回虫に対するIgG抗体を測定した。

3)ブタ回虫幼虫移行症による脊髄炎における検索

臨床的・画像的検索、免疫アレルギー学的検索、寄生虫学的検索を行った。

4)SEA/SEB特異的IgE、ブタ回虫抗IgG、IgE抗体の測定

AM 24例(AD合併11例、非合併例13例)、正IgE血症性脊髄炎(normolIgEaemic myelitis; NM)12例、Poserらの基準により臨床的に確実な多発性硬化症(MS)28例(高IgE血症群4例、正IgE血症群24例)、健常対照(HC)34例(高IgE血症群11例、正IgE血症群23例)を対象にAlaSTAT法によりSEA及びSEBに対する血清特異的IgE抗体を測定した。AM 23例(AD合併11例、非合併12例)、NM12例、MS28例(高IgE血症群4例、正IgE血症群24例)、HC21例(高IgE血症群10例、正IgE血症群11例)を対象にELISA法、AlaSTAT法によりブタ回虫特異的IgG、IgE抗体を測定した。

結 果

1) 神経内科 192 施設(52.7%)、脳外科・脊髄外科 53 施設(51.0%)より回答をいただいた。症例の報告をそれぞれ21施設・26症例、4施設・4症例得た。合計30症例は全国的に及んでいることが明らかとなった。この30症例とこれまでに九大で経験した55症例と比較したが、症状、病変部位、血液および髄液データはほぼ同一であった。

2) 平均40.0歳(26-53歳)、全例男性。うち1例が8-32歳までアトピー性皮膚炎の既往があり、現在アレルギー性結膜炎、アレルギー性鼻炎に罹患。もう1例が花粉症に罹患。他の5例には明らかなアレルギー疾患の既往はなかった。血清ブタ回虫IgG抗体は測定しえた5例中2例(症例1、6)で陽性であったが、ブタ回虫幼虫移行症に比べると低値であり、そのうち症例1にてAlbendazoleによる治療を行ったが、臨床症状の改善を認めなかった。血清イヌ回虫IgG抗体は測定しえた5例中1例で陽性であった(抗体値は測定中)。症例5、7を除く5例全例で高IgE血症とダニ特異的IgEを認めた。7症例ともに生検脊髄病巣は好酸球浸潤を伴った炎症で、髄鞘及び軸索の脱落を認めた。血管周囲、実質ともにTリンパ球の浸潤が目立ち、CD4、CD8の免疫染色を行いえた症例1、2ではいずれも血管周囲にはCD8陽性T細胞を主に、CD4陽性T細胞とごく少量のB細胞浸潤を認め、実質内にはCD8陽性T細胞のみを多数認めた。症例6のみで好酸球浸潤を

¹⁾九州大学神経内科

²⁾宮崎医科大学寄生虫学

表 生検にて好酸球性脊髄炎であった7例の特徴

症例	1	2	3	4	5	6	7
年齢/性	37/M	44/M	39/M	26/M	37/M	53/M	44/M
アトピー性疾患	なし	アトピー性皮膚炎(8-32歳) アレルギー性結膜炎、鼻炎(現在)	なし	花粉症(現在)	なし	なし	なし
血清全IgE(U/ml)	782	647	550	690	200	760	57
ダニ特異的IgE	+	+	+	+	-	+	-
血清ブタ回虫IgG抗体	+	未施行	-	未施行	-	+	-
血清イヌ回虫IgG抗体	-	未施行	-	未施行	+	-	-
末梢血好酸球	3.0%	1.0%	1022/ μ l	12.4%	2.0%	12.5%	0.2%
初発症状	右胸部から 前胸部にかけての痛み	胸部以下の異常感覚	Th6-7レベルの 異常感覚	左上肢の 異常感覚	両上肢の疼痛	胸部以下の 異常感覚	歩行困難
病変部位(MRI)	C1-4	Th4-5	Th7	C8	C1-2	C4-5	Th4-8
神経病理所見							
好酸球浸潤	+	+++	+	+	+++	+++	+
髄鞘の脱落	+	+	+	+	+	+	+
軸索脱落	+	+	+	+	+	+	+
肉芽腫形成	-	-	-	-	-	+	-
病因	アトピー	アトピー	アトピー	アトピー	イヌ回虫?	アトピー	不明

伴う肉芽腫の形成を認めた。

3) 症例1は22歳男性、症例2は27歳女性。いずれも牛レバ刺しの生食を好む。症例1は平成11年8月頃右上肢の腫脹と熱感出現し、10月頃より右胸部以下の温痛覚低下を自覚。温痛覚低下は12月頃より改善し、当科初診時(平成12年1月)は神経学的にはLhermitte徴候陽性のみであった。症例2はまた神経学的にLhermitte徴候のみを認めたのみであった。MRI上、症例1はC7-Th1に、症例2は延髄下部-C4にT2高信号域を認め、ガドリニウム増強効果を認めた。血液検査上、症例1では白血球6720/mm³、好酸球7%、IgE155IU/mlで、症例2では白血球5740/mm³、好酸球16.0%、IgE405IU/mlであった。髄液は症例1は細胞数7/mm³で好酸球10%、蛋白65mg/dlであり、症例2は細胞数7/mm³で好酸球10%、蛋白34mg/dlであった。症例1、2とも便中に虫卵を認めず、血清および髄液中にブタ回虫抗体(IgG)高値(いずれもO.D.値1.0以上)を認め、ブタ回虫幼虫移行に伴う脊髄炎と診断した。症例1、2ともにAlbendazole投与を行い、症状、抗体値及びMRIの改善を認めた。

4) AM群では、SEAおよびSEB特異的IgE抗体価および抗体陽性率がHC、MS、そしてNM群に比し有意に高値であった(いずれもp<0.01)。AMでは血清全IgE値とSEA/SEB特異的IgE値の間に有意な相関を認めたが、ダニ特異的IgE値とSEA/SEB特異的IgE値の間に有意な相関を認めなかった。ブタ回虫IgG/IgE抗体陽性率はAM群39.1%/73.6%、NM群8.3%/0.0%、MS群17.9%/7.1%、HC群4.8%/14.3%とAM群でのみHC群より有意に抗ブタ回虫IgG、IgE抗体陽性率が高値であった(p<0.05 / p<0.01)。しかし、IgG抗体値は前述の幼虫移行症例に比し低値であり、抗体値の比較的高かった3例でAlbendazoleの投与を行ったが、臨床症候の改善はなかつた。

た。

考 察

全国疫学調査上、ほぼ同一の臨床的特徴を有するアトピー性脊髄炎が全国的に存在することが示唆された。生検上、好酸球性脊髄炎を認めた7例中5例にてアトピー素因の関与が示唆された。またアトピー性脊髄炎の増悪因子としてエンテロトキシン、ブタ回虫抗原への暴露が考えられた。一方、ブタ回虫に汚染された牛レバー生食によりブタ回虫幼虫移行症による脊髄炎のみを呈する症例の存在が明らかとなった。このような例では、血清IgEは必ずしも高値とならず、むしろ末血と髄液にて好酸球増多を認め、ブタ回虫IgG抗体が高値となるのが特徴である。

結 論

原因不明の脊髄炎の中に、アトピー性脊髄炎とブタ回虫性脊髄炎が存在する。

謝 辞

貴重な生検標本を御提供いただきました諸先生方に深謝いたします。

文 献

- 1) Kira et al. J Neurol Sci 148:199-203, 1997.
- 2) Kira et al. J Neuro Neurosurg Psychiatry 64: 676-679, 1998.
- 3) Kikuchi et al. J Neurol Sci 2000 (in press).
- 4) Osoegawa et al. J Neurol Neurosurg Psychiatry 70: 265-266, 2000.

先行するアトピー性疾患と脊髄炎発症時の脊髄障害パターン・免疫機能異常との関連：平山病アレルギー背景因子説の提唱

越智博文¹⁾、小副川学、吉良潤一

目 的

私どもはアトピー性皮膚炎 (atopic dermatitis: AD) が先行し、後に脊髄炎を発症する病態の存在を指摘し、アトピー性脊髄炎 (atopic myelitis: AM) という新たな疾患単位を提唱している¹⁾²⁾。AM では頸髄後索が障害され易いのが特徴である。一方、小児では稀に気管支喘息 (bronchial asthma: BA) の発作後に急性発症の弛緩性運動麻痺を呈するポリオ (脊髄灰白質炎) 様の病態が、asthmatic amyotrophy (Hopkins 症候群) として知られている。私どもは本症候群の成人例 2 症例を初めて報告した³⁾。このことは先行するアトピー性疾患の種類により脊髄障害のパターンが異なる可能性を示唆する。そこで私どもは、高 IgE 血症とアレルギー特異的 IgE を伴う脊髄炎自験 51 例について先行するアトピー性疾患と脊髄障害パターン・免疫機能異常との関連を明らかにすることを第一の目的とした。

一方、平山病は思春期男性に好発する一側上肢遠位筋を侵す脊髄症であり、Hopkins 症候群同様、脊髄前角運動ニューロンが障害される。MRI 上、頸部前屈時に硬膜管の前方移動と下部頸髄の圧迫が認められることから、機械的因子の関与が考えられている。剖検例の病理所見からは微小循環障害が推測されているが、典型的な脊髄梗塞の所見とは異なっており、その正確な発症機序は不明である。そこで私どもは、本症の微小循環障害に免疫アレルギー学的機序が関与する可能性を考え、最近経験した平山病連続 6 例についてアトピー素因の関与を明らかにすることを第二の目的とした³⁾。

対 象 ・ 方 法

1) 高 IgE 血症性脊髄炎における検討

対象は高 IgE 血症とアレルギー特異的 IgE を伴う脊髄炎自験 51 例。先行するアトピー性疾患の種類により群分けし、神経学的所見、画像所見、電気生理学的所見から推定される病巣の拡がりを χ^2 検定により比較検討した。

2) 平山病における検討

1998 年 9 月から 2001 年 1 月までに当科で経験した平山病連続例 6 例を対象とし、アレルギーの既往歴とその家族歴について問診した。対照として、同時期に当科外来を受診し神経学的に正常であった 81 例を用いた。上記平山病患者 6 例

について、ELISA 法にて血清全 IgE 値を、AlaSTAT 法にてアレルギー特異的 IgE 値を測定し、健常対照 82 例と比較検討した。また、現在も当科外来通院中の平山病 5 例について、血小板上の低親和性 IgE 受容体 (CD23) 発現量をフローサイトメトリー法にて測定するとともに、抗神経抗体、抗ガングリオシド抗体の有無についても検討した。

結 果

1) 高 IgE 血症性脊髄炎における検討 (表 1)

AD 先行群は、気道アレルギー (BA やアレルギー性鼻炎 allergic rhinitis: AR) 先行群に比し、異常感覚 ($p<0.05$) の頻度が有意に高く、感覚鈍麻 ($p<0.05$)、運動麻痺 ($p<0.01$)、膀胱直腸障害 ($p<0.05$) の頻度は有意に低かった。BA 先行群は AD 先行群に比し、腰・仙髄病変の頻度が有意に高かった ($p<0.01$)。先行するアレルギー疾患を認めない群は AD 先行群に比し、感覚鈍麻 ($p<0.05$)、膀胱直腸障害 ($p<0.01$) の頻度が有意に高く、また病巣は、頸髄 ($p<0.01$) が有意に少なく、胸髄 ($p<0.01$) が有意に多かった。

2) 平山病における検討 (表 2)

平山病は対照群に比し、AR (67%対 13.6%、 $p<0.01$) と BA (33.6%対 4.9%、 $p<0.05$) の既往歴 (発症時の合併を含む) の頻度が有意に高かった。また、アレルギー疾患の家族歴も平山病では対照群に比し有意に高かった (83%対 17.3%、 $p<0.001$)。平山病では健常対照に比し、ヤケヒョウヒダニ特異的 IgE 陽性率 (100%対 31.7%、 $p<0.01$) とコナヒョウヒダニ特異的 IgE 陽性率 (100%対 30.5%、 $p<0.01$) が有意に高く、また、高 IgE 血症の頻度が高い傾向にあった (50%対 20.7%、 $p=0.0987$)。検索し得た平山病 5 例において血小板上の CD23 発現量 ($17.7\pm 9.0\%$) は、健常対照 ($n=10$: $7.7\pm 2.0\%$) や他の神経疾患患者 ($n=21$: $8.3\pm 5.2\%$) に比し有意に高値であった (それぞれ $p<0.01$ 、 $p<0.01$)。抗神経抗体は検索し得た 5 例全例で陰性、抗ガングリオシド抗体も 1 例で IgM 型抗 GM1 抗体を認めたのみであった。

考 察

AD が先行後の脊髄炎は、頸髄後索障害を主徴とし、錐体路障害としての運動麻痺はあっても軽度で、腱反射亢進のみを呈するものが大部分であった。一方、BA や AR のような気道アレルギーが先行する脊髄炎では、錐体路障害による運

¹⁾ 九州大学神経内科