

## Ⅱ. 分 担 研 究 報 告

## 日本人多発性硬化症（MS）長期自然経過の特徴

分担研究者 斎田 孝彦

（国立療養所宇多野病院神経内科・臨床研究部）

### 研究要旨

日本人 MS 患者 232 例の長期臨床経過の特徴を検討した。進行モードによる分類の各病型の頻度は再発緩解型(RR)MS 85.3%、一次進行型(PP)MS 6%、二次進行型(SP)MS 8.6%であった。SPMS と PPMS の割合が欧米の 1/3～1/8 と少ない。病巣部位による分類の各病型の頻度は視神経脊髄(OS)型 19.3%、視神経脳幹脊髄(OBS)型 13.9%、古典型 66.8%であった。良性 MS 4.7%、悪性 MS 4.7%、MS による死亡例は 6.5%であった。日本人 MS の障害度の進行速度は欧米人と同様であり、従来日本人 MS の障害度の進行が速いと言われていた事と異なる。PPMS と SPMS は RRMS に比し有意に進行が速い。病巣部位による病型分類では、進行は OBS 型が一番速く、次は古典型、OS 型は比較的遅い。初発時に侵される Functional System の種類の多い患者群及び初発年令が高い患者群は速く進行する。

# 日本人多発性硬化症長期自然経過の特徴

斎田 孝彦<sup>1)</sup> Qi Hao<sup>1)</sup> 松井 真<sup>1)</sup> 小沢 恭子<sup>1)</sup>

小牟 礼修<sup>1)</sup> 小西 哲郎<sup>1)</sup> 大江田知子<sup>1)</sup> 斎田 恭子<sup>2)</sup>

## 目 的

日本では多発性硬化症 (MS) の多数例を長期に追跡し、病型を厳密に定義して、病型毎に臨床及びMRI 特徴や予後を解析した報告が存在しない。

本研究では国立宇多野病院を受診し、2 年以上観察されたMS患者232人を対象に、最新の診断基準を用い、病型、臨床経過、予後の特徴を検討した。

## 方 法

一つのMSセンター (国立宇多野病院) の専門医グループにより診断され、少なくとも2 年間以上観察され、MRIや免疫学的検査などの補助診断のされた、診断確度が高い232人のMS患者を対象として解析した。患者は1956～99 年に発症し、発症年齢は2～69歳、平均発症年齢は31.0歳。平均罹病期間は10.7年。男71名、女161名で、男女比は1:2.3。

MSの進行モードによる分類の定義: 再発寛解型MS (RRMS)とは明確な再発増悪と完全回復または後遺症を残す回復を示し、再発増悪の間の期間には進行しない。二次進行型MS (SPMS)とは初期に再発型であった後、1年以上の連続的進行を示す。一次進行型MS (PPMS)とは発症時より持続的な進行を示すと定義した。

病巣部位による分類の定義: 視神経脊髄型 (OS) とは視神経と脊髄が選択的に障害され、大脳・脳幹・小脳の神経学所見がなく、全経過中の脳MRIの最大病巣体積が1.5ml 以下である。視神経脳幹脊髄型 (OBS) とは、視神経、脳幹と脊髄が選択的に障害され、大脳・小脳の神経学所見がなく、全経過中の脳MRIの最大病巣体積が1.5ml 以下である。古典型 (classical) とは、大脳・小脳に病変を有するとした。

予後による分類の定義: 発症から15年以上経過して

も総合障害度 (EDSS) 3以下の症例は良性MS、5年以内に寝たきりの状態 (EDSS 8.5) となる症例は重症MSとした。

## 結果・考察

(1) 進行モードにより分類した各病型の臨床特徴: 各病型の頻度はRRMS 85.3%、PPMS 6%、SPMS 8.6%であった。欧米での大規模調査でPPMSは15～30%、SPMSは25～64%と報告されている。日本人MSのSPMSとPPMSの割合が欧米の1/3～1/8と極めて少ないことが明らかとなった。男女比はSPMSが1:1で、再発寛解型RRMSの1:2.6に比し有意に男性が多かった。(表1)

各群の臨床特徴

	進行モードによる分類			
	Total	RR	SP	PP
	n=232	n=198	n=20	n=14
頻度	100%	85.3%	8.6%	6.0%
男: 女	1:2.3	1:2.6*	1:1	1:1.3
平均発症年齢(歳)	31.0	31.2	26.6	33.1
平均罹病期間(年)	10.7	10.1	15.9	10.7
最初一年間の増悪の回数	2.0	2.0	1.3*	

\*  $P<0.05$

(2) 病巣部位により分類した各病型の臨床特徴: OS型19.3%、OBS型13.9%で、OS型とOBS型合わせて33%であった。男女比はOS型が1:6.2と非常に女性が多く、classical型の1:1.7に比し有意に女性が多い。平均発症年齢はOS型39歳、OBS型35歳で共に高い。最初の一年間の増悪の回数はOBS型で2.3回とclassical型及びOS型に比し有意に多かった。OS型ではSPMSは0%で、Classical型の11.4%に比し、有意に少ない。一方、OBS型ではSPMSが6.5%存在する。(表2)

1) 国立療養所宇多野病院神経内科・臨床研究部

2) 京都市立病院神経内科

各群の臨床特徴

	病巣部位による分類			
	Total	OS	OBS	classical
	n=223	n=43	n=31	n=149
頻度	100%	19.3%	13.9%	66.8%
男：女	1：2.3	<u>1：6.2**</u>	1：2.9	1：1.7
平均発症年齢(歳)	31.0	<u>39.0***</u>	<u>35.3**</u>	<u>27.4</u>
平均罹病期間(年)	10.7	11.4	11.9	9.6
最初一年間の増悪の回数	2.0	<u>1.8</u>	<u>2.3*</u>	<u>1.9</u>

\*\*\* $p<0.0001$ , \*\* $p<0.01$ , \* $p<0.05$

(3) 予後によって分類した各群の臨床特徴：良性MS 4.7%、悪性MS 4.7%、MSによる死亡例は6.5%であった。平均発症年齢は悪性型が37.3才で、良性型の27.5才より有意に高かった。(表3)

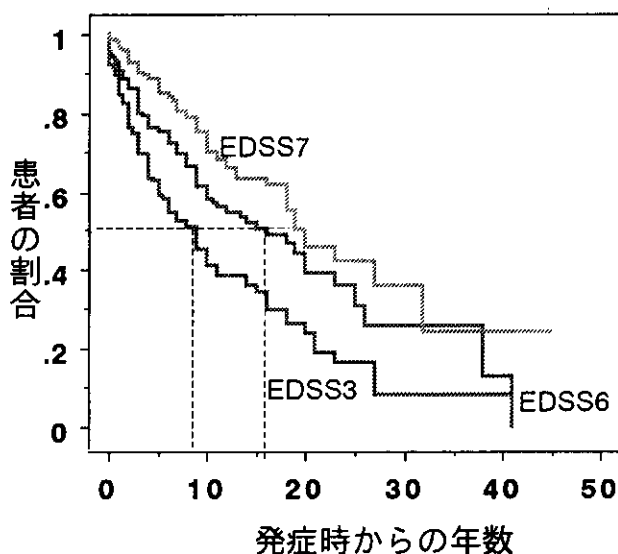
各群の臨床特徴

	予後による分類			
	Total	良性	悪性	MSによる死亡
	n=223	n=11	n=11	n=15
頻度	100%	4.7%	4.7%	6.5%
男：女	1：2.3	1：1.8	1：4.5	1：1.5
平均発症年齢(歳)	31.0	<u>27.5</u>	<u>37.3*</u>	34.8
平均罹病期間(年)	10.7	20.9	9.0	12.4
最初一年間のattackの回数	2.0	1.5	2.0	2.1

\* $p<0.05$

(4) 障害度の進行速度：図に示すように50%の患者がEDSS3になるまでにかかった年数は約9年、EDSS6になるまでにかかった年数は約16年であった。欧米人のデータと非常に類似しており、従来日本人のMSの障害度の進行が速いと言われていたことと異なる。進行モードにより分類した病型の障害度の進行速度では、PPMSとSPMS群はRRMS群に比し有意に進行が速い。病巣部位により分類した病型では、OBS型の進行がclassical型とOS型に比し有意に速い。初発時に侵されるFunctional Systemの種類が多い患者群は速く進行する。初発年齢が高い患者群は速く進行します。性別は進行速度に影響しない。

障害度の進行速度



## 結 論

日本人MSの新しい特徴として(1)慢性進行型のSPMSとPPMSの割合が欧米の1/3～1/8と少ない、(2)視神経脊髄型MSはSPMSにならないが、視神経脳幹脊髄型はSPMSになりうる事が明らかとなった。良性MSは4.7%、悪性MSは4.7%、MSによる死亡は6.5%である。

日本人MSの障害度の進行速度は欧米人と同様。進行モードによる病型分類では、PPMSとSPMSはRRMSに比し有意に進行が速い。病巣部位による病型分類では、進行は視神経脳幹脊髄型が一番速く、次は古典型、視神経脊髄型は比較的遅い。

## 文 献

1. McDonald WI, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. Ann Neurol. 2001 Jul;50(1):121-7.
2. Thompson AJ, et al. Diagnostic criteria for primary progressive multiple sclerosis: a position paper. Ann Neurol. 2000 Jun;47(6):831-5.
3. Weinshenker BG, et al. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. I. Clinical course and disability. Brain. 1989 Feb;112 (Pt 1):133-46.
4. Confavreux C, et al. Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. N Engl J Med. 2000 Nov 16;343(20):1430-8.

## 北海道十勝地区における多発性硬化症の疫学調査

分担研究者 菊地 誠志  
(北海道大学大学院医学研究科脳科学専攻  
神経病態学講座神経内科学分野)

### 研究要旨

本邦における多発性硬化症(MS)患者の疫学調査は、1970年代から1980年代にかけて行われたのを最後に施行されていない。当時の調査において有病率に関しては北海道を除き南北差を有する傾向があったものの、北海道では札幌市 1.6 人/10 万人(1958 年)、旭川市 2.5 人/10 万人(1975 年)と低値であった。欧米での疫学調査では高緯度の寒冷地では有病率が高いといわれており、北海道における私たちの経験でも MS は決して少なくはないと推測しており、それが裏付けられるか北海道十勝地区での有病率を調査し、併せてその臨床像の検討を行った。その結果、北海道における MS 疫学調査を施行し、Poser らの診断基準に合致する確実例は 31 名(2001 年 3 月末時点)で、時点有病率は 8.57 人/100,000 人(粗有病率)であった。この数値は過去の本邦での調査と比較して最も高値であった。また、OS-MS の割合は 16%であり、それほど多くはなかった。

# 北海道十勝地区における多発性硬化症の疫学調査

保前 英希<sup>1)</sup> 菊地 誠志<sup>2)</sup>

深澤 俊行<sup>3)</sup> 松本博之<sup>4)</sup> 田代 邦雄<sup>2)</sup>

## 目的

本邦における多発性硬化症 (MS) 患者の疫学調査は、1970 年代から 1980 年代にかけて行われたのを最後に施行されていない。当時の調査において有病率<sup>1)</sup>に関しては北海道を除き南北差を有する傾向があったものの、北海道では札幌市 1.6 人/10 万人 (1958 年)、旭川市 2.5 人/10 万人 (1975 年) と低値であった。欧米での疫学調査<sup>2)</sup>では高緯度の寒冷地で有病率が高いといわれており、北海道における私たちの経験でも MS は決して少なくはないと推測しており、それが裏付けられるか北海道十勝地区での有病率を調査し、併せてその臨床像の検討を行った。

## 対象・方法

北海道十勝地区は帯広市を中心にその周辺に 19 町村を有し、全面積 10,831 km<sup>2</sup>、北緯 42° 17' ~ 43° 28' に位置している。2001 年 3 月末での全人口は 361,726 人 (男 175,009 人、女 186,717 人; 住民基本台帳より) で過去 40 年間ほとんど増減なく推移している。また他地域との人口流入出が少ないことも特徴である。

調査を開始するにあたり、過去 5 年間の MS 特定疾患受給者の動向を調べた。これを参考に、十勝地区の医療機関のうち神経内科・脳神経外科・眼科・耳鼻科を有する医療機関 (8 施設) ならびに当地区に近接し神経内科を有する医療機関 (4 施設) の計 12 施設に対して調査の協力を依頼した (2001 年 3 月)。また、医療機関以外の療養施設 (1 施設) にも訪問し、当該患者の有無を調べた。調査項目は、居住地・出生地・発病地・診断分類 (Poser)・家族内発症・初発年齢・初発症状・臨床病果・MRI 病果・進行様式・EDSS<sup>3)</sup>などである。Poser らの診断基準<sup>4)</sup>にて MS またはその疑いのある患者のうち 2001 年 3 月 31

日時点で十勝地区に在住する患者に関して調査票の記入を行い、全医療機関より回答をもらった (2001 年 5 月)。重複症例を除外し、可能な限り患者の診察・電話インタビュー等にて診断確度を高めた。



## 結果

### (1) 時点有病率

Poser らの診断基準を用いた分類では、clinically definite MS が 27 名 (A<sub>1</sub>: 20 名、A<sub>2</sub>: 7 名)、Labo-supported definite MS が 4 名 (B<sub>2</sub>: 1 名、B<sub>3</sub>: 3 名) で合計 31 名の MS 患者の存在が確認された。粗有病率は 8.57/100,000 (95% CI: 5.82~12.17)。北海道の人口 (5,675,309 人) を用いた標準化有病率は 8.80/100,000、日本の人口を用いた標準化有病率は 8.77/100,000 であった。

1) 帯広厚生病院神経内科  
2) 北海道大学神経内科  
3) 北祐会神経内科病院  
4) 札幌医科大学神経内科

## (2) 患者背景

男：女＝1：2.9（8名：23名）、家族内発症者なし、  
平均年齢；39.3 ± 14.2歳（16～75歳）  
平均発症年齢；29.1±14.2歳（7～60歳）、平均罹病年数；  
10.3±9.7歳（1～43年）、平均EDSS；3.1（0～9.0）  
出生地では26名(84%)が、発病時住所では27名(87%)が  
十勝地区であった。

## (3) 初発症状

感覚障害 42%、麻痺 35%、視力障害 16%、歩行障害 16%、  
複視 10%、運動失調 3%

## (4) 病巣分布（全経過）

	視神経	大脳	脳幹	小脳	脊髄
臨床病巣	39%	45%	58%	16%	77%
MRI病巣	25%	83%	41%	19%	65%

## (5) 進行様式

再発寛解型 58%、2次性進行型 29%、単峰型 10%、  
1次性進行型 3%

## (6) 病型分類

視神経脊髄型MS（OS-MS）を“臨床症候から推定される病変が視神経と脊髄に局限する病型、軽微な一過性の眼振などの存在は許容する”と定義したところ、5名（16%）がOS-MSであった。OS-MSと通常型MSの2群間で、発症年齢・出生年代・発症年代・罹病期間・EDSSに有意な差はなかった。しかし、OS-MS群にはMRIにて脳幹・小脳病巣を有した患者はいなかった。

## 考察

北海道における過去のMS疫学調査はいずれもアンケート調査のみに頼り、患者数の把握が不十分であった。今回、十勝地区というコホートにおいて可能な限りの実態調査を試みた。その結果、過去の北海道での調査に比べ明らかに有病率は増加していた。これは、調査法の相違ならびにMRIの普及にともなう診断技術の向上が寄与したものと考えられた。今回は時点有病率の算出を主眼としたため、発症率に関しては詳細に調査していない。このため、MSの発症が増加しているかは不明である。

男女比では女性が男性の約3倍で性差は明らかであった。過去に日本人に多いと言われていたOS-MSは今回の調査では16%と比較的少なかった。また、全経過を通じた臨床病巣でも、視神経病変は39%の患者に認めるの

みで好発部位とは言い難かった。

## 結論

（1）北海道におけるMS疫学調査を施行し、Poserらの診断基準に合致する確実例は31名（2001年3月末時点）で、時点有病率は8.57人/100,000人（粗有病率）であった。この数値は過去の本邦での調査と比較して最も高値であった。

（2）OS-MSの割合は16%であり、それほど多くはなかった。

## 文献

- 1) Kuroiwa Y et al. Prevalence of MS and North-South gradient in Japan. Neuroepidemiology 2: 62-69, 1983.
- 2) Poser CM The epidemiology of multiple sclerosis: A general overview. Ann. Neurol. 36: s180-s193, 1994.
- 3) Kurtzke JF Rating neurologic impairment in multiple sclerosis - EDSS. Neurology 33: 1444-1452, 1983.
- 4) Poser CM et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis. Ann. Neurol. 13: 227-231, 1983.

## 調査協力医療機関

帯広厚生病院  
帯広第一病院  
帯広協会病院  
帯広北斗病院  
帯広脳神経外科病院  
帯広黒澤病院  
士幌町国保病院  
芽室町立病院  
釧路労災病院  
北祐会神経内科病院  
北大附属病院  
札幌大附属病院

## 寛解再発型多発性硬化症に対する免疫吸着療法

分担研究者 大野 良三  
(埼玉医科大学神経内科)

### 研究要旨

寛解再発型の多発性硬化症 (MS)、中でも頻回の再発をくり返す MS 患者において定期的に免疫吸着 (IAPP) 療法を施行し、IAPP による再発予防効果、IAPP 処置前後の末梢血リンパ球サブセットを検討した。

IAPP を施行した MS 患者の平均観察期間は 10.5 月であった。IAPP 施行前の平均年間の再発頻度は 2.0 ( $n=7$ ) であったが、定期的な IAPP 施行後には 0.6 と明らかに低下した ( $p<0.005$ )。末梢血リンパ球サブセット検討では、IAPP 施行後に活性化 CD4 (CD4+CD25+) 細胞ならびに helper-inducer (CD4+CD29+) 細胞は施行前に比べ有意に低下し ( $p<0.001$ ,  $p<0.005$ )、NK (CD3-CD16/56+) 細胞は明らかに上昇を示した ( $p<0.005$ )。以上より、IAPP 療法は MS の再発予防効果を有することが示唆された。



# 寛解再発型多発性硬化症に対する免疫吸着療法

野村 恭一<sup>1)</sup> 三井 隆男 高濱 美里 高砂子由佳子 柴木 謙次  
滝澤 功一 大貫 学 富岳 亮 大野 良三

## 目 的

寛解再発型の多発性硬化症（RR-MS），中でも頻回の再発をくり返すRR-MS患者において，定期的に免疫吸着（IAPP）療法を施行し，IAPP療法によるMSの再発予防効果について検討した．さらに，IAPP処置前後における末梢血リンパ球サブセットを解析し，IAPP療法によるリンパ球サブセットに与える影響を検討した．

## 対象・方法

治療開始前6か月間の再発回数が2回以上，あるいは年間再発回数が1.2以上の寛解再発型のRR-MS 8例（男女比 1：7，平均年齢 38歳，平均罹病期間 5.4年）に対してIAPP療法を施行し，治療前後での年間再発頻度を比較した．

IAPP療法の施行期間は2000年1月からの1年間を目標とした．IAPPは，原則として2日間連続（一部は3日間）を1クールとし，12～16週ごとに施行した（5日間の入院治療を原則）．IAPPは，血漿分離器はP506（クラレ），吸着膜はTR-350（旭メディカル），抗凝固剤としてヘパリンを使用，処理血漿は $2460 \pm 243.4$ mlであった．

さらに，IAPP施行前およびIAPP施行後4～6週において末梢血リンパ球サブセットを測定した．モノクローナル抗体はBecton Dickinson社製のCD4，CD8，CD25，CD11b，CD45RA，CD29，CD3，CD16/CD56を用い，二重フローサイトメトリー法で解析した．各抗体によりCD4系細胞，CD8系細胞，NK/CTL細胞の3群に分け，CD4系細胞はCD25，CD45RA，CD29により3サブセット，CD8系細胞はCD25，CD11bにより3サブセットに分け検討した．なお，各サブセットはそれぞれ $1 \times 10^4$ 個の細胞を測定し，CELL Questシステムを用いて解析した．

## 結果・考察

近年，MSの再発予防薬としてINF-1bが用いられているが，視力障害，筋力低下，運動失調などの症候を有する患者では，INF-1bの自己注射が出来ないことをしばしば認め，このような症例ではINF-1b以外の再発予防治療が望まれていた．従来，MSの治療法としては副腎皮質ステロイド療法，血液浄化療法が用いられ，その有効性が確かめられている<sup>1,2,3)</sup>．我々は，活動期MS患者にIAPP療法を施行することにより活性化CD4細胞が低下することを確認していた．

今回我々は，血液浄化療法を定期的に施行することにより，MSの再発を予防できるのではと考え，全ての患者にインフォームドコンセントを得たうえでIAPP療法を施行した．

IAPP療法を施行したMS患者の平均観察期間は10.5月（ $n=8$ ）であった．IAPP施行前の平均年間再発頻度は2.0（ $n=7$ ）であったが，1年間の定期的なIAPP療法の施行により年間再発率は0.6と明らかに低下した（図1， $p<0.005$ ）．なお，1例はIAPP施行後の穿刺部位からの出血により他治療に変更した．今回の少数例，非対照試験の検討では，IAPP療法によりMSの再発を抑制するまでの結論は出せないが，これら処置群での再発回数は明らかに低下していた．

末梢血リンパ球サブセットの検討では，IAPP施行後には活性化CD4（CD4+CD25+）細胞，ならびにhelper-inducer細胞（CD4+CD29+）細胞は施行前に比べ有意に低下し（表1， $p<0.001$ ， $p<0.005$ ，paired t-test），一方，NK細胞（CD3-CD16/56+）細胞は明らかに上昇を示した（表1， $p<0.005$ ，paired t-test）．

免疫性神経疾患における血液浄化療法のメカニズムは十分に理解されていない．自己抗体の除去<sup>4)</sup>，免疫複合

<sup>1)</sup> 埼玉医科大学神経内科

# 文 献

- 1) Schaef CL et al : Concerning the application of plasmapheresis to multiple sclerosis. Plasma Ther 1:33, 1979
- 2) Weiner HL et al : Double-blind study of true vs. sham plasma exchange in patients with immunosuppression for acute attacks of multiple sclerosis. Neurology 39: 1143, 1989
- 3) Schmitt E et al : Immunoabsorption (IA) versus plasma exchange (PE) in multiple sclerosis - first trial of a double blind controlled trial. " Apheresis" 1990, p293, Alan R Liss, New York
- 4) Glassman AB : Immune responses : the rationale for plasmapheresis. Plasma Ther 1: 13, 1979
- 5) 渋谷統寿 : Guillain-Barre症候群, Miller Fisher症候群, 神経内科 42 : 487, 1995
- 6) Kanazawa H et al : Immunoabsorption therapy and cellular immunity. Therapeutic Plasmapheresis 8: 249, 1991

体の処理, サイトカインの調節<sup>9)</sup>による細胞性免疫に影響を及ぼす<sup>6)</sup>などがあるが, その詳細は不明である. 今回のIAPP処置前後での検討では, Th1系に属する活性化CD4細胞, Helper-inducer細胞の低下しており, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ などの炎症性サイトカイン調節によるものと推測している. NK細胞の上昇に関しても同様にIL-4などサイトカインによる調節機序が想定された.

# ま と め

寛解再発型の多発性硬化症患者に対して定期的な免疫吸着療法 (IAPP) を施行した. ①IAPPは, MSの再発予防効果を有することが示唆された. ②IAPPは, 活性化CD4細胞, helper-inducer細胞を低下させ, NK細胞は上昇させた.

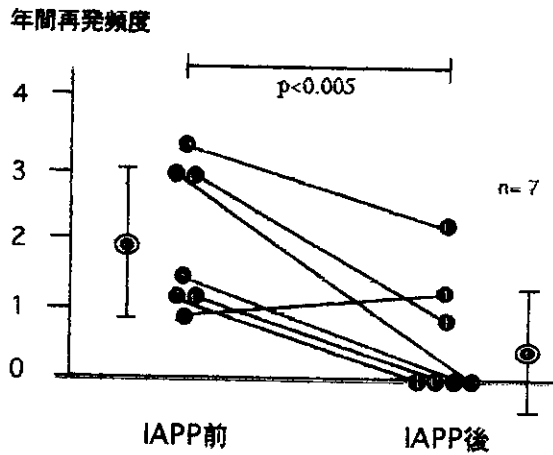


図1 MS患者におけるIAPP処置前後の年間再発回数  
IAPP治療前の平均年間再発回数は2.0であったが, 1年間の定期的なIAPP治療後には0.6と明らかに低下した ( $p < 0.005$ , paired t-test).

表1. IAPP処置前後における末梢血リンパ球サブセットの変動

CD	No. 主な分布	検体数	IAPP前	IAPP後	p 値
CD4+ CD25+	IL-2R+活性化CD4細胞	14	19.4 $\pm$ 5.0	14.2 $\pm$ 4.8	$p < 0.001$
CD4+ CD45RA+	naive or suppressor-inducer	14	33.7 $\pm$ 9.8	26.7 $\pm$ 10.0	ns
CD4+ CD29+	helper-inducer	14	21.2 $\pm$ 6.0	16.2 $\pm$ 4.7	$p < 0.001$
CD8+ CD25+	IL-2R+活性化CD8細胞	12	2.4 $\pm$ 0.6	1.2 $\pm$ 0.5	ns
CD8+ CD11b dull	suppressor-effector	11	3.7 $\pm$ 2.2	5.8 $\pm$ 5.4	ns
CD8+ CD11b bright	cytotoxic-effector/ NK	12	6.2 $\pm$ 5.2	7.6 $\pm$ 6.6	ns
CD3- CD16/56+	NK	13	6.7 $\pm$ 2.6	10.2 $\pm$ 5.1	$p < 0.005$
CD3+ CD16/56+	CTL	14	6.8 $\pm$ 6.5	8.5 $\pm$ 7.4	ns

## 多発性硬化症患者におけるビタミンD受容体 遺伝子多型についての検討

分担研究者 菊地 誠志  
(北海道大学大学院医学研究科脳科学専攻  
神経病態学講座神経内科学分野)

### 研究要旨

今回我々は、これまで、疫学的及び免疫学的側面から候補遺伝子として考えられているビタミンD受容体遺伝子多型について、MS患者－健康対照群で比較し、MSの発症及び臨床症状への影響などを検討した。これまでは、Apa I 及び Bsm I という2つの多型を検討していたが、それらとは連鎖不平衡を有しないとされる exon 2 の Fok I 多型について検討した。その結果、homozygote F/F 及び F allele の割合がMS患者に多い傾向が示されたものの、統計学的には有意な差までには至らなかった。MS患者においての検討では、発症年齢、経過およびMRI所見とFok I 多型との間に関連はなかった。Apa I 及び Bsm I において認められたHLAとFok Iとの関連については、特に認められなかった。しかしながら、ビタミンD受容体遺伝子多型についてはまだ未知の部分が多く、今後のさらなる検討が必要と思われる。

# 多発性硬化症患者におけるビタミン D 受容体遺伝子多型についての検討

新野 正明<sup>1)</sup>

菊地 誠志<sup>1)</sup>

深澤 俊行<sup>2)</sup>

田代 邦雄<sup>1)</sup>

## 目的

多発性硬化症 (MS) は、日光の少ない高緯度地域に多く発症する。最近、緯度あるいは日照時間との相関といった従来より知られていながら説明がつけられていない MS の疫学的特徴を、ビタミン D (VD) の関与で説明しようとの試みもなされている<sup>1)</sup>。さらに、最近では、VD の免疫調節因子としての役割が注目され<sup>2)3)</sup>、MS の動物実験モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) では、VD 投与により、その発症を遅らせたり、症状を軽減したりすることが報告されている。VD は核内レセプタースーパーファミリーの一つであるビタミン D 受容体 (VDR) を介してその作用を発現するが、その遺伝子においてはいくつかの遺伝子多型が知られており、骨粗鬆症、甲状腺機能亢進症、インスリン依存性糖尿病などとの関連がこれまで報告されている。そして、我々もこれまで、前述した理由により VDR を介した、MS の発症ないし病状の進展に与える可能性を想定し、ビタミン D 受容体遺伝子 (VDRG) 多型 (Apa I 部位と Bsm I 部位) と MS との関連の有無を検討してきた<sup>4)5)</sup>。その結果、Apa I の多型部位で、欧米では少ないといわれる、A allele を有する MS の割合が対照群に比し有意に多いというデータを得た。また、VDRG 多型と HLA 多型との相関では、A allele (+) の MS では対照およびそれ以外の MS と比較して DPB1\*0501 が有意に高率であった (それぞれ  $P_c=0.0319$ 、 $P_c=0.0165$ )。Haplotype bA を有する MS は、対照およびそれ以外の MS よりも高率に DRB1\*1501 を有していたが (それぞれ  $P_{unc}=0.0431$ 、 $P_{unc}=0.0089$ )、補正後の検討では有意な値までにはならなかった。これらのことは、MS の発症に HLA と VD が協同的に作用している可能性を示すばかりでなく、MS と HLA との相関を検討する際には他の遺伝的背景 (この場合、VDR 遺伝子) の関連を考慮すべきことも示していると考えられた。

VDR においては、その他にいくつかの遺伝子多型が知られており、今回我々は、Apa I や Bsm I 部位とは、linkage disequilibrium を有しないとされる<sup>6)7)</sup>、exon 2 にある Fok I 部位の多型について検討した。

## 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多発性硬化症 (MS) 患者 (relapsing-remitting type 及び secondary progressive type) および健康対照者で行った。末梢血より得られた DNA を用い PCR-RFLP 解析を行い、制限酵素 Fok I にてそれぞれ遺伝子多型 FF、Ff、ff 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。

## 結果

今回の多型の検討では、Table に示すように、homozygote F/F 及び F allele の割合が MS 患者に多い傾向が示されたものの、統計学的には有意な差までには至らなかった。MS 患者における検討では、発症年齢、経過および MRI 所見と Fok I 多型との間に関連はなかった。Apa I 及び Bsm I において認められた HLA と Fok I との関連については、特に認められなかった。

## 考察

今回我々は、VDRG の exon 2 に存在する Fok I 多型について解析し、homozygote F/F 及び F allele が MS 患者に多い傾向が認められた。Fok I 遺伝子多型と疾患についての報告はいくつかみられ、f/f genotype が閉経後の Mexican-American women における腰椎の bone mineral density (BMD) の低下に関連があるという報告の他<sup>8)</sup>、同様のデータが日本からも報告されている<sup>9)</sup>。一方で、Graves disease において、homozygote F/F 及び F allele を有する割合が有意に高いとの報告があり<sup>10)</sup>、免疫関係において、これらの多型が重要な働きを有している可能性が

1) 北海道大学神経内科

2) 北祐会神経内科病院

ある。

しかしながら、FokI 部位を含め VDRG の多型についてはまだ未知の部分が多く、また、遺伝子多型については ethnicity の違いが大きな影響を与えるため、基礎的研究も含めたさらなる検討が今後必要と思われる。

まとめ

VDRG における Fok I 遺伝子多型 (exon 2) では、F/F genotype、F allele が MS 患者に多い傾向が認められた。今後、更に検討を重ねる必要があると思われる。

Table. Distribution of Fok I genotype in MS patients and healthy controls

	Patients n=111 (%)	Controls n=114 (%)
Genotype frequencies <sup>a</sup>		
F/F	56 (50.5%)	40 (35.1%)
F/f	46 (41.4%)	63 (55.3%)
f/f	9 (8.1%)	11 (9.6%)
Allele frequencies <sup>b</sup>		
F	158 (71.2%)	143 (62.7%)
f	64 (28.8%)	85 (37.3%)

<sup>a</sup>P=0.0646

<sup>b</sup>P=0.0568

6. Harris SS, et al. The vitamin D receptor start codon polymorphism (FokI) and bone mineral density in premenopausal American black and white women. J Bone Miner Res. 12: 1043-1048, 1997.

7. Eccleshall TR, et al. Lack of correlation between start codon polymorphism of the vitamin D receptor gene and bone mineral density in premenopausal French women: the OFELY study. J Bone Miner Res. 13: 31-35, 1998.

8. Gross C, et al. The presence of a polymorphism at the translation initiation site of the vitamin D receptor gene is associated with low bone mineral density in postmenopausal Mexican-American women. J Bone Miner Res. 11: 1850-1855, 1996.

9. Arai H, et al. A vitamin D receptor gene polymorphism in the translation initiation codon: effect on protein activity and relation to bone mineral density in Japanese women. J Bone Miner Res. 12: 915-921, 1997.

10. Ban Y, et al. Vitamin D receptor initiation codon polymorphism in Japanese patients with Graves' disease. Thyroid. 10: 375-380, 2000.

文献

1. Hayes CE, et al. Vitamin D and multiple sclerosis. Proc Soc Exp Biol Med 216: 21-27, 1997.

2. Thomasset M. Vitamin D and the immune system. Pathol Biol (Paris) 42:163-172, 1994.

3. Lemire JM. Immunomodulatory actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3. J Steroid Biochem Mol Biol 53: 599-602, 1995.

4. Fukazawa T, et al. Association of vitamin D receptor gene polymorphism with multiple sclerosis in Japanese. J Neurol Sci 166: 47-52, 1999.

5. 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.

## 本邦の多発性硬化症におけるオリゴクローナルバンドの解析

分担研究者 糸山 泰人

(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)

### 研究要旨

多発性硬化症(MS)のオリゴクローナルバンド(OB)の陽性率は通常型 MS(CMS)は 68%、視神経脊髓型 MS(OSMS)は 10%だった。Phage display 法で MS 髄液 IgG の標的抗原を解析し、ヘルペス属ウイルスと相同な配列を高頻度に検出した。1 例で EB ウイルスタンパクに対する IgG が血中より髄液中で増加しているのを確認した。GST pull down assay では OB は不変だったが、2 次元電気泳動で light chain スポットの消失を認め、この髄液 IgG と OB の関連がうかがわれた。MS125 例中 9.6%が発症後 5 年以上視神経炎と脊髓炎のみを呈し、脳 MRI に病変のない純粋型 OSMS だった。1 例を除き女性で、全例 OB 陰性である点が CMS と異なった。若年発症者は軽症だった。DPB1\*0501 の陽性率は 63.6%と従来 of 報告より低く、CMS と関連する DRB1\*1501 も 36.4%にみられた。

# 本邦の多発性硬化症におけるオリゴクローナルバンドの解析

糸山泰人<sup>1)</sup>、藤原一男<sup>1)</sup>、中島一郎<sup>1)</sup>、藤盛寿一<sup>1)</sup>、三須建郎<sup>1)</sup>、馮 娟<sup>1)</sup>、小野寺 宏<sup>1)</sup>、  
佐々木義輝<sup>2)</sup>、菅村和夫<sup>2)</sup>、佐藤 滋<sup>3)</sup>、高瀬貞夫<sup>3)</sup>、山本雅裕<sup>4)</sup>、山本直樹<sup>4)</sup>

## 目 的

多発性硬化症(MS)において oligoclonal IgG band (OB) は臨床病型との関連や、病因的意義の解明に重要な検査所見である。今回我々は以下の2つの検討を行った。I. OBの陽性率が低いことが特徴の1つとされる視神経脊髄型多発性硬化症(OSMS)の長期観察例の検討を行った。II. 昨年の Phage display 法による髄液 IgG の標的抗原の解析において検出された配列を用いて OB の吸着を試みた。

I. OSMS の解析にはその診断が確実である必要がある。しかし当初 OSMS と思われた症例が後に典型的な通常型 MS(CMS)となることがあり、また軽度の脳幹症候や脳 MRI で少数の病変がみられる症例を OSMS と CMS のいずれに分類するか苦慮する場合もある。我々は発症後5年以上にわたり視神経炎と脊髄炎のみを呈し、脳 MRI が一貫して正常である Pure OSMS 症例を抽出して解析した。<sup>1)</sup>

II. 前回、MS 患者において Phage display 法を用いて髄液 IgG の標的抗原の検索を行ない、ヘルペス属ウイルスの構成タンパクと相同な配列が高頻度に検出された。<sup>2)</sup> うち1例では、3つの異なる病期の検体で、Epstein-Barr virus (EBV) の構成タンパクに相同性の高い3種類の配列が持続的に検出された。また Western blot にて本症例の髄液 IgG が EBV の構成タンパクを認識することを確認した。これらのモチーフの1つを用いて Glutathione S-transferase (GST) 融合タンパクを作成し、GST pull down assay により oligoclonal IgG band (OB) の吸着を試みた。

## 方 法

### I. Pure OSMS 症例の解析

1988~2001年に東北大学及び広南病院神経内科に入院した診断確実なMS症例125例(女性94名、男性31名)のうち、臨床的に再発性の視神経炎と脊髄炎のみを呈し、発症から5年以上経過しており、過去に施行した脳MRI検査の結果がすべて正常である Pure OSMS 症例の臨床、画像及び免疫学的解析を施行した。

### II. OB の解析

(1) 本症例(MS6)で検出された3種類のモチーフを含む特異的 phage を用いて SDS PAGE を行ない、一次抗体として髄液および血清 IgG を用いて Western blot を行なった。(2) 髄液 IgG と特異的に反応した phage のペプチド配列(TDPYQLPFDQSL、EBV ZEBRA タンパクと高い相同性を有する)をもとに wild type、N 末側、C 末側、EBV の4種類のペプチド配列を3回繰り返す GST 融合タンパクを作成した。作成した GST 融合タンパクを用いて SDS PAGE を行ない、一次抗体として髄液および血清 IgG を用いて Western blot を行なった。(3) GST pull down assay にて OB の吸着を試みた。(4) 髄液の2次元電気泳動を実施し、GST 融合タンパクによる吸着後の髄液では消失するスポットがあるかどうかを検索した。

## 結 果

I. Pure OSMS は12例(9.6%)であった。11例は女性だった。4例(発症年齢36~62歳)は中等度あるいは重度の視神経炎と脊髄炎を呈したが、8例(発症年齢10~38歳)はより軽症例で、このうち7例は Disability Status Scale の重症度は1だった。軽症例は発症年齢が若く、脊髄炎の症候はほとんどが感覚障害であった。脊髄 MRI では多くの症例で頸胸髄に複数の広範な病変がみられた。OB は全例陰性だった。

OSMS で高頻度に陽性と報告されている DPB1\*0501<sup>3)</sup> は重症の3例を含む7例(63.6%)のみでみられた。一方欧米でも本邦でも CMS との関連が指摘されている DRB1\*1501-DQB1\*0602<sup>3,4)</sup> が4例において陽性(36.4%)であり、うち1例は DPB1\*0501 も同時に陽性だったが、他の3例は DPB1\*0501 陰性で DSS1 と軽症だった。中等度の障害を呈した1例は DPB1\*0501 も DRB1\*1501 も共に陰性だった。

II. (1) Western blot 法による特異的 phage への髄液および血清 IgG の反応の比較では、両者と同程度の反応を示した phage および、髄液 IgG により強い反応を示した phage が認められた。

(2) 作成した GST 融合タンパクは血清よりも髄液 IgG により強く反応した。GST そのものとは反応しなかった。髄液 IgG は特に DPYQLPF の配列を認識した。すなわち、wild type 及び EBV の配列と強く反応したが、N 末側、C 末側の配列との反応は弱かった。

1) 東北大学大学院神経内科学分野

2) 東北大学大学院免疫学分野

3) 広南病院神経内科

4) 東京医科歯科大学大学院ウイルス制御

(3)GST pull down assay では GST 融合蛋白に反応した髄液 IgG が免疫沈降産物中に検出された。しかし上清を用いた等電点電気泳動では OB のバンドの吸収は確認されなかった。

(4)、この髄液と反応する GST 融合タンパクによる吸着後の髄液を用いた 2 次元電気泳動では IgG light chain の一部のスポットが消失した。

#### 考 察

I.本研究では日本人における Pure OSMS は 9.6%であった。これまでの OSMS の報告では、女性が多く、OB の陽性率が低いことが指摘されてきたが、今回の厳密な診断基準により Pure OSMS を抽出して解析したことにより、女性の疾患であり OB が陰性である点が CMS との際だった相違点であることが明確に示された。

従来、OSMS は臨床的には重症の視神経炎及び脊髄炎を呈することが特徴とされてきた。そして OSMS の剖検例の神経病理学的検討ではしばしば壊死性病変が存在することが記載され、この重症化と関連する所見と考えられてきた。しかしながら、Pure OSMS の中には再発を繰り返しても症状の改善が良好であり軽症で経過する症例が存在することが明らかになった。このような症例では壊死性病変が主体であるとは考えにくい。

OSMS の HLA class II 遺伝子型に関して DPB1\*0501 が高頻度であることが報告されてきた。DPB1\*0501 は欧米に比べて日本人を含めたアジア人で陽性率が高いことが知られている。今回の検討では、Pure OSMS における DPB1\*0501 の陽性率(63.6%)は、これまでの報告に比べて低く、日本人の一般人口における陽性率とほぼ同様であった。一方、CMS との関連が繰り返し指摘されてきた DRB1\*1501-DQB1\*0602 が陽性の Pure OSMS が 4 例(36.4%)存在したことは、Pure OSMS が免疫遺伝学的に heterogenous であり、CMS と必ずしも区別できないことを示唆している。

II.今回髄液 IgG を解析した 1 例では、髄液 oligoclonal IgG が持続的に EBV の異なる 3 種類の構成タンパクを認識していることが疑われ、特に EBV ZEBRA タンパクが本症例の OB の認識抗原の一つである可能性が示唆された。しかし GST 融合タンパクを用いた吸着試験では、GST 融合タンパクに反応した髄液 IgG が免疫沈降産物中に検出されたものの、吸着後の髄液の OB は消失しなかった。2 次元電気泳動の結果から一部の髄液 IgG が吸着され、スポットの消失として確認されたが、OB は消失しなかった原因として、OB は 1 本のバンド中にも複数の抗体が含まれている可能性が考えられる。

#### まとめ

I.当科の MS 症例の 9.6%が Pure OSMS であり、1 例を除き全例が女性で、OB が陰性である点が CMS と異なる特徴であった。若年発症例では軽症で経過する症例が多かつ

た。DPB1\*0501 の陽性率は 63.6%と従来の報告より低く、CMS との関連が指摘されている DRB1\*1501-DQB1\*0602 の陽性例も 36.4%にみられた。Pure OSMS は重症度や免疫遺伝学的に heterogenous と考えられる。

II.EBV の構成タンパクを認識する髄液 IgG を持続的に検出した MS 症例において、GST pull down assay により OB の吸着を試みた。本症例では EBV ZEBRA に対する抗体が血中より髄液中で増加していることが示されたが、合成ペプチドを用いた吸着実験では OB の消失は確認されなかった。

#### 文 献

- 1) Misu T et al. Pure neuromyelitis optica: clinical, MRI and immunological study in 10 Japanese patients. *Neurology* 56(Suppl 3): A196, 2001.
- 2) Fujimori J, et al. The epitope analysis of CSF oligoclonal IgG in Japanese MS patients by phage display method. *Neurology* 56(Suppl 3): A225, 2001.
- Yamasaki K, et al. HLA-DPB1\*0501-associated opticospinal multiple sclerosis: clinical, neuroimaging and immunogenetic studies. *Brain* 122:1689-1696, 1999.
- 3) Olerup O, et al. HLA class II-associated genetic susceptibility in multiple sclerosis: a critical evaluation. *Tissue Antigens*. 38:1-15, 1991.
- 4) Kira J, et al. Western versus Asian types of multiple sclerosis: immunogenetically and clinically distinct disorders. *Ann Neurol*, 40: 569-574, 1996.



## 視神経脊髄型多発性硬化症をはじめとする炎症性中枢神経疾患 における新規責任自己抗原の検索

分担研究者 吉良 潤一  
(九州大学医学部脳研神経内科)

### 研究要旨

自己免疫性神経疾患における自己抗体は、その疾患の発症や病型の形成との関与示唆されるため、我々は各種炎症性神経疾患における新規自己抗原の同定を SEREX 法と二次元免疫ブロッティング法を用いて行った。その結果、多発性硬化症 (MS) や橋本脳症において数種類の候補抗原が同定され、この内 MS における HSP105 は、血清での自己抗体陽性率や、HSP105  $\alpha$  に対する自己反応性 T 細胞の増殖応答が MS 群で上昇していることから、HSP105 が MS の新規自己抗原であることが示唆された。他に橋本脳症における  $\alpha$ -enolase、視神経脊髄型 MS での NSD1 や 2 種類の EST など候補自己抗原が同定されており、各疾患における病的意義の検討が今後必要である。今回の検討により、自己免疫性神経疾患における自己抗原の検索に、SEREX 法、二次元免疫ブロッティング法の有用性が示された。

# 視神経脊髄型多発性硬化症をはじめとする炎症性中枢神経疾患における新規責任自己抗原の検索

吉良潤一<sup>1)</sup>、三野原元澄<sup>1)</sup>、堀内泉<sup>1)</sup>、朴華<sup>1)</sup>、荒木令江<sup>2)</sup>、西村泰治<sup>3)</sup>

## 目 的

これまで私どもは、日本人において通常型多発性硬化症 (C-MS) と視神経脊髄型 MS (OS-MS) は、臨床症候ばかりでなく、疾患感受性遺伝子<sup>1)</sup> や自己反応性 T 細胞の自己抗原に対する免疫応答が異なること<sup>2)</sup> を報告してきたが、OS-MS の特異な病巣分布がどのようにして決定されるのかは依然として不明のままである。近年、オリゴデンドロサイトは、視神経・脊髄と大脳とではその前駆細胞が異なる<sup>3)</sup> という見方もあることから、OS-MS の病型を惹起し得る視神経と脊髄に主として分布する責任自己抗原の存在も示唆される。一方、自己免疫性神経疾患における自己抗体は、その疾患の発症、あるいは病型の形成との関与が検討され、病態の理解に大きく貢献していることから、我々は、各種炎症性神経疾患における新規自己抗原の同定を SEREX 法、並びに二次元免疫プロット法を用いて行った。

## 対照・方法

### 1) SEREX 法による自己抗原同定

ヒト脊髄由来 mRNA をもとに cDNA を合成し、λ ZAP II ベクターへのライゲーションを行い、ヒト脊髄 cDNA 発現ライブラリーを作成した。このライブラリーを用いて、OS-MS 患者 8 名 (全例 HLA-DPB1\*0501 陽性) からの血清を SEREX 法にてスクリーニング (1 名につき  $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$  個のファージ) を行った。陽性クローンは塩基配列を決定後、BLAST software を用いて同定した。

同定された候補抗原のうち heat shock protein 105  $\alpha$  (HSP105  $\alpha$ ) (熊本大学・院医・免疫識別・西村先

生より恵与) 並びに Rabaptin-5 蛋白を作成し、ELISA にて血清中 IgG 抗体測定を行った。対象は、健常対照群 66 名 (平均年齢 46.8 歳、男:女=15:51)、OS-MS 患者 35 名 (平均年齢 44.3 歳、男:女=1:4)、C-MS 患者 34 名 (平均年齢 37.1 歳、男:女=12:22)。患者血清を 50 倍希釈し、二次抗体に抗ヒト IgG を 2000 倍希釈したものをを用いて、O.D.450nm にて測定し、健常群の平均+2SD 以上を陽性とした。

HSP105  $\alpha$  に対する自己反応性 T 細胞の検討では、患者あるいは健常者からの PBMC より、ネガティブセレクションにより抽出した CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T 細胞を、irradiation した HSP105  $\alpha$ +PBMC を APC として用いて一次培養を行い、5~7 日目に増殖応答をチミジンの取り込みにて検討した。

### 2) 二次元免疫プロット法による自己抗原同定

ヒトの大脳白質、灰白質ホモジネートを二次元電気泳動後、PVDF メンブレンに転写し、橋本脳症、C-MS のそれぞれの患者血清と反応させ、抗ヒト免疫グロブリン抗体で検出した。二次元免疫プロット検出フィルムと重ね、ゲル上の蛋白質スポットのマッチングを行い、ゲルから切り出したスポットを質量分析を行い同定した。

## 結 果

### 1) SEREX 法による自己抗原同定

OS-MS 患者 8 名の血清をスクリーニングすることにより、11 個の陽性クローンを得た。このうち、9 個はオーバーラップしたクローンであり、最終的に 5 つの異なる遺伝子が同定された (表 1)。

#### i) ELISA による抗体測定

Rabaptin-5 融合蛋白 (N 末より 235AA を欠く、全体の 73% を占める GST 融合蛋白) を作成し、血清・

<sup>1)</sup>九州大学神経内科、<sup>2)</sup>熊本大学腫瘍医学、

<sup>3)</sup>熊本大学免疫識別学

表1 SEREX法にて同定された遺伝子

heat shock protein 105 (KIAA0201)
NSD1
Rabaptin-5
EST (KIAA0610)
EST (KIAA1640)

髄液での IgG 抗体測定を行ったが、対照群と MS 並びに各病型において有意差は認められなかった (data not shown)。

HSP105 蛋白に対する血清中抗 IgG 抗体の測定では、健常対照群に比べ、全 MS 並びに OS-MS、C-MS にて陽性者数は有意に上昇していた (全 MS:  $p=0.0193$ , OS-MS:  $p=0.0341$ , C-MS:  $p=0.0302$ ) (表 2)。しかしながら OS-MS と C-MS では有意差は認められなかった。男女間での検討では、健常対照では男女間に有意差は認められないが、MS 患者では有意差 ( $p=0.0350$ ) が認められ、陽性者は全例女性であった (表 3)。髄液での検討では、陽性率では神経変性疾患群との間に MS 群で有意差は認められなかったが、O.D.値を用いた Mann-Whitney U 検定において、OS-MS 群で有意な上昇が認められた ( $p=0.04$ )。

#### ii) HSP105 $\alpha$ に対する自己反応性 T 細胞応答

健常対照群 5 名、MS 患者群 9 名において HSP105  $\alpha$  に対する CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>T 細胞の自己反応性 T 細胞の検討では、健常対照群においては SI>2 の増殖反応は認められなかったが、MS 群においては 9 名中 3 名に増殖応答が認められた。

#### 2) 二次元免疫ブロッティング法による自己抗原同定

橋本脳症では、スポット 1-1 (48kDa, pI 7.3)、1-2 (48kDa, pI 7.5) が検出され、MS ではスポット 2-1 (48kDa, pI 5.1)、2-2 (40kDa, pI 5.1)、2-3 (36kDa, pI 4.9)、2-4 (34kDa, pI 4.7)、2-5 (60kDa, pI 5.5)、2-6 (65kDa, pI 5.4) が検出された (図 1)。質量分析の結果、橋本脳症では  $\alpha$ -enolase (スポット 1-1)、MS では neurofilament-66 (スポット 2-6) と HSP 60 (スポット 2-5) が同定された。

表2 ELISAによる血清中抗HSP105  $\alpha$ -IgG抗体の測定

	健常対照	全MS	OS-MS	C-MS
症例数	66	69	35	34
平均年齢 (歳)	46.8	40.8	44.3	37.1
男:女	15:51	19:50	7:28	12:22
陽性者数	2/66	10/69	5/35	5/34
陽性率 (%)	3.0	14.5	14.9	14.7
p 値	---	0.0193	0.0341	0.0302

表3 血清中抗HSP105  $\alpha$ -IgG抗体陽性率の性差

	男性	女性	p 値
健常対照	1/15 (6.7%)	1/51 (2.0%)	NS
全MS	0/19 (0%)	10/50 (20.0%)	0.0350
p 値	NS	0.0036	

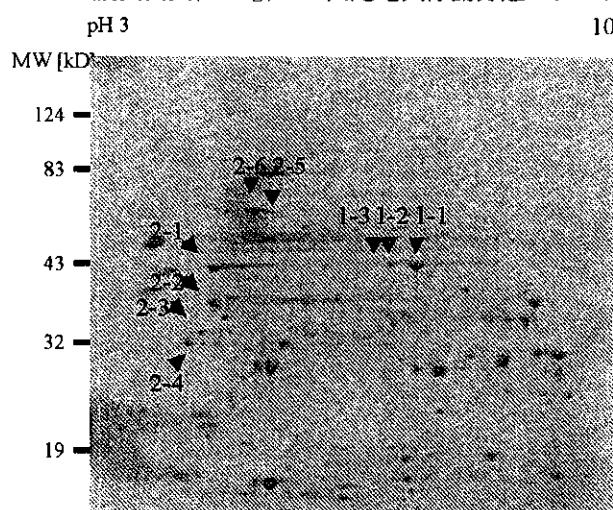
NS: not significant

## 考 察

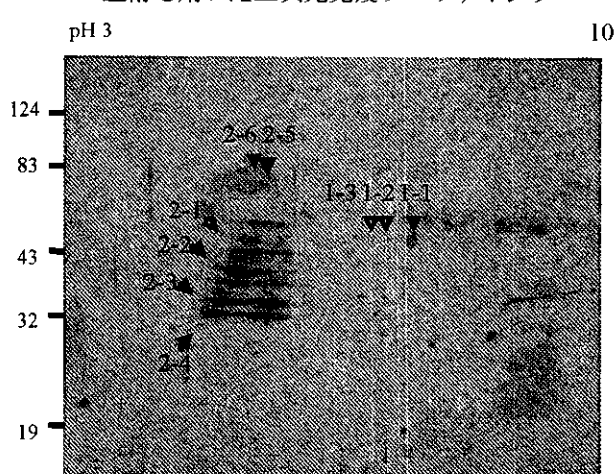
SEREX 法にて 5 種類の OS-MS の候補抗原が同定された。HSP105 は、 $\alpha$  と  $\beta$  の 2 種類が存在し、105kDa の HSP105  $\alpha$  の一部がスプライスアウトした 90kDa の蛋白が HSP105  $\beta$  である。マウスにおける HSP105 の発現は、中枢神経系での発現が非常に多く、in vitro においてはニューロン、ミクログリア、アストロサイト、オリゴデンドロサイトに常に発現が認められ、熱ストレスにより著明に発現が増大する<sup>4)</sup>。ヒトにおいても、多くの組織で発現が認められるが、脳や精巣、肺、大腸粘膜に強い発現が認められる (<http://www.kazusa.or.jp/>)。

今回、HSP105 における血清中 IgG 抗体測定を行い、健常対照群に対して MS 並びに OS-MS、C-MS 群で有意な上昇が認められたが、OS-MS と C-MS の間では有意な差は認められなかった。抗体陽性率は MS 患者並びに 2 病型ではおよそ 15% 程度である (女性の MS 患者では、抗体陽性率は 20% であった)。この抗 HSP105 抗体陽性率の性差は、女性の有病率の高い MS の病態に何らかの関連があるのかもしれない。また、HSP105  $\alpha$  に対する自己反応性 T 細胞応答についても MS 群において反応性の亢進が示唆された。これまで、代表的な HSP である HSP60 family, HSP70 family,  $\alpha$ B-crystallin を含む HSP20 family の中には、MS 病巣において発現量が増すものや、自己反応性 T 細胞による反応性の亢進、 $\gamma$   $\delta$  T 細胞の活性化、自

**図1** 脳蛋白質(1.2mg)の二次元電気泳動分離パターン



血清を用いた二次元免疫ブロッティング



自己抗体陽性率の上昇、MS のモデル動物である EAE の発症を遅らせたり、軽症化させたりすることなど、MS の病態との関連が多く報告により示唆されている。また、HSP は各生物間での相同性も高いことから、いわゆる分子擬態による自己抗原として働く可能性も考えられる。今回、SEREX 法にて同定された HSP105 については、MS の病態との関連を示唆する報告はこれまでになく、今後更に検討を進めていくことは重要と考えられる。

二次元免疫ブロッティング法を用いた検索では、橋本脳症において 48kDa の蛋白質が  $\alpha$ -enolase であることが示唆された。enolase は全身組織に分布する解糖系酵素であり、血管内皮細胞のプラスミノゲン受容体として血管内や細胞周囲の線溶系に関与し、熱ショック蛋白としての働きも知られている<sup>5)</sup>。最近、SLE や血管炎などの自己免疫疾患で自己抗体が出現することが報告されていることなどから、抗  $\alpha$ -enolase 抗体が橋本脳症の病態に関与していることが示唆される。

## 結 論

今回、私どもは炎症性中枢神経疾患における自己抗体の同定に、SEREX 法と二次元免疫ブロッティング法を用い、その有用性が示唆された。今後更にスクリーニングを継続すると共に、現時点で既に同定されている候補

自己抗原 (NSD1, KIAA0610, KIAA1640, neurofilament-66) について、その病的意義の検討を行っていく予定である。

## 文 献

- 1) Kira J et al: Western vs. Asian types of multiple sclerosis: immunogenetically and clinically distinct disorders. *Ann Neurol* 40: 569-574, 1996.
- 2) Minohara M et al: Differences between T cell reactivities to major myelin protein-derived peptides in opticospinal and conventional forms of multiple sclerosis and healthy controls. *Tissue Antigens* 57 : 447-456, 2001.
- 3) Fruttiger M et al: Defective oligodendrocyte development and severe hypomyelination in PDGF-A knockout mice. *Development* 126: 457-467, 1999.
- 4) Satoh J et al: Constitutive and heat-inducible expression of HSP105 in neurons and glial cells in culture. *Neuro Report* 9 : 2977-2983, 1998.
- 5) Pancholi V et al: Multifunctional  $\alpha$ -enolase: its role in diseases. *Cel Mol Life Sci* 58 : 902-920, 2001.