

3) 定量分析

各分画は **chloroform/methanol** にて抽出後 **DEAE** カラムにて糖脂質分画を精製した。精製した各分画は薄層クロマトグラフィー(TLC)にて分離し、**TLC-immunoblot** 法にて糖脂質組成を解析した。1次抗体としては **GM3**, **GM1**, **sulfatide**, **SGPG** に対するものを用いた。また、**neuraminidase** にて **in situ** 酵素処理後 **HRP conjugated cholera toxin** による分析も行った。デンストメーターにて定量的に分析した。

結果

シヨ糖連続密度勾配を用いて分離した分画ではシヨ糖密度 **26~29%** の部分が **axolemma** 画分で、**14~17%** が **myelin I** 画分であった。**Axolemma**

画分 と **myelin I** 画分とではガングリオシド組成に著明な差異を認めなかった。**LCM** を用いた検討では **Ranvier node** 分画は **myelin II** 分画に比しガングリオシドが多く存在した。

考察

今回の検討では **GM1**, **GQ1b** は **Ranvier node** に比較的多く局在することが明らかになった。これらのガングリオシドは **ankyrin**, 電位依存性 **Na** チャネルと局在が一致しているが、実際にこれらの分子とどのように関連しているかは不明である。**Guillain-Barre** 症候群等で出現する抗ガングリオシド抗体のターゲットが **Ranvier node** である可能性が示唆された。

抗ガングリオシド抗体の反応性に及ぼす

様々なリン脂質の効果の検討

分担研究者 楠 進¹⁾

共同研究者 平川美菜子¹⁾、森田大児¹⁾、辻省次¹⁾

研究要旨

Guillain-Barré 症候群の患者血清抗 GM1 IgG 抗体および Miller Fisher 症候群の抗 GQ1b IgG 抗体の反応性に及ぼす様々なリン脂質の効果を検討した。抗 GM1 IgG 抗体については GM1 に PA, PI, PS, LPE, PE, LPC, CL を加えた混合抗原にたいして抗体活性が増強した。一方、抗 GQ1b IgG 抗体は PA を加えた時に抗体活性が増強する例が約半数にみられたが、その他のリン脂質には増強効果はみられなかった。いずれの抗体でも SM を加えた時には抗体活性は低下した。抗ガングリオシド抗体の病理学的作用を考える上で膜上に共存するリン脂質の影響を考慮する必要がある。

研究目的

昨年度われわれは Guillain-Barré 症候群(GBS)血中の抗 GM1 抗体の活性が GM1 とリン脂質の一つである PA(ホスファチジン酸)の混合抗原に対してより強く反応することを報告した(1)。今回は GBS と Miller Fisher 症候群(MFS)における抗ガングリオシド抗体の反応性に及ぼす様々なリン脂質の効果を検討した。

研究方法

東京大学神経内科に抗体検査依頼のあった抗 GM1 抗体陽性の GBS30 例と抗 GQ1b 抗体陽性の MFS32 例の急性期血清を対象とした。GBS 例では GM1 抗原に、MFS 例では GQ1b 抗原に以下に示す様々なリン脂質を各々加えた抗原を用いて抗体活性を ELISA 法で分析した。マイクロタイタープレートの各ウェルに GM1 抗原 100ng およびリン脂質 100ng を加えて固相化し、ブロッキングした後に 40 倍希釈の血清を加え、ペルオキシダーゼ標識二-

次抗体にて抗原抗体反応をみた。マイクロプレートリーダーを用いて吸光度 OD 値を測定し、GM1 抗原のみ 200ng を各ウェルに加えた時の吸光度 OD 値と比較検討した。同様に GQ1b 抗原 100ng およびリン脂質 100ng を各ウェルに加えて吸光度を測定し、GQ1b 抗原 200ng の時と比較検討した。用いたリン脂質は PA:ホスファチジン酸、PI:ホスファチジルイノシトール、PS:ホスファチジルセリン、LPE:リゾホスファチジルエタノールアミン、SM:スフィンゴミエリン、PE:ホスファチジルエタノールアミン、PC:ホスファチジルコリン、LPC:リゾホスファチジルコリン、CL:カルジオリピンの 9 種類である。

(倫理面への配慮)

本研究は個人の遺伝情報に関するものではなく、患者群を対象とするものであり、倫理面の問題はないと判断した。

研究結果

抗 GM1 抗体は PA, PI, PS, LPE, PE, LPC, CL のリン脂質を加えた時に各々

1) 東京大学医学部神経内科

70%以上の症例で抗体活性が増強した。抗 GQ1b 抗体では PA を加えて抗体価が増強する例が 56.3%であったが、その他のリン脂質では増強効果は目立たなかった。

一方 SM を加えた場合ほぼ全例で抗体価の低下がみられた。

SM を加えた場合の抗体価の低下は、用いた GM1 および GQ1b の抗原量が各ウェル当たり半分(100ng / well)であったためである可能性が考えられたので、GM1・GQ1b 抗原 200ng に SM200ng を加えた抗原を用いて抗体活性を測定したが、やはり同様に抗体活性は低下傾向をみせた。

考察

以上のようにリン脂質によって抗体活性への影響が異なり、また抗グングリオシド抗体の種類によって影響のされ方が異なるという結果が得られた。このようなリン脂質による反応性の違いを生じる要因として、生体膜上のリン脂質の非対称な分布に関連がある可能性が示唆された。脂質二重層である生体膜におけるリン脂質の分布は、外膜に SM, PC が多く存在し、PA, PI, PS, PE は内膜に多く存在している。外膜に分布するリン脂質である SM, PC を加えた混合抗原に対しては抗グングリオシド抗体の活性は低下し、内膜に分布するリン脂質を加えた混合抗原に対しては抗体活性が増強する傾向がみられた。

また細菌の細胞膜に存在するリン脂質として上記 9 種類のリン脂質の中では、PE, CL, PA, PS などがあげられる。これらのリン脂質を加えた混合抗原に対しては抗体活性が増強する傾向があると考えられた。

グングリオシドは広範に分布しているが、細胞外膜の SM の存在により患者血中の抗グングリオシド抗体の作用は高濃度にガン

グリオシドが局在する部位に限られる可能性があると思われる。また細菌のもつグングリオシド様糖鎖構造はリン脂質の共存する状態で免疫系に認識されている可能性があると思われた。

結論

GBS にみられる抗 GM1 IgG 抗体および MFS にみられる抗 GQ1b IgG 抗体の反応性は共存するリン脂質により影響される。抗グングリオシド抗体の病理学的作用を考える上で膜上に共存するリン脂質の影響を考慮する必要がある。

文献

- 1) Kusunomi S, Morita D, Ohminami S, et al. Binding of immunoglobulin G antibodies in Guillain-Barré syndrome sera to a mixture of GM1 and a phospholipid : Possible clinical implications. Muscle & Nerve in press

健康危険情報

特になし

知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし

ミラー・フィッシャー症候群における GQ1b とリン脂質の

混合抗原に対する血中抗体と臨床症状との関連

分担研究者 楠 進¹⁾

共同研究者 森田大児¹⁾、平川美菜子¹⁾、辻 省次¹⁾

研究要旨

昨年度我々は、ギラン・バレー症候群(GBS)にみられる抗 GM1 IgG 抗体について、GM1 単独より GM1 とリン脂質の 1 つである phosphatidic acid (PA) の混合抗原により強く反応するものが多いことを報告した。今回は抗 GQ1b IgG 抗体陽性である 54 例のミラー・フィッシャー症候群患者の血清について、PA との混合抗原を用いた際の抗体活性の変化と、先行感染や各種臨床症状との相関を検討した。その結果、PA との混合抗原への抗体活性が GQ1b 単独抗原を用いる場合に比べて増強する例は、抗 GM1 IgG 抗体の場合と比べて少ないことが判明した。臨床症状との関連については、GQ1b と PA の混合抗原よりも GQ1b 単独抗原への反応が強い群に球麻痺症状が優位に多いという結果が得られた。抗 GQ1b 抗体の fine specificity の違いが球麻痺の有無に関連する可能性が考えられた。

研究目的

抗ガングリオシド抗体は、ギラン・バレー症候群(GBS)、ミラー・フィッシャー症候群(MFS)、IgM パラプロテイン血症を伴うニューロパチーの血中において、しばしば特異的に高力価の上昇がみられ、診断に有用であり、また発症機序に対しても関連が示唆されている。昨年度我々は GBS に見られる抗 GM1 IgG 抗体について、リン脂質の一つである phosphatidic acid(PA)を抗原に混合することにより多くの例で反応性が増強し、GM1 のみでは陰性の例で PA を混合することにより抗体反応が陽性となる例もあることを報告した¹⁾。今年度は MFS に特異的に見られる抗 GQ1b 抗体について同様の検討を目的とし、さらにリン脂質共存下での抗体の反応性と臨床症状との関連を解析した。

研究方法

東京大学神経内科に抗体測定依頼のあった、

抗 GQ1b IgG 抗体陽性の MFS54 例について、IgG 抗体活性を ELISA 法を用い、吸光度を測定して比較した。抗原としては、GQ1b のみ(200ng/well)、GQ1b と phosphatidic acid(PA)を混合したもの(GQ1b+PA, 各 100ng/well)、及び PA のみ(200ng/well)を用いた。1 次抗体は患者血清を 40 倍希釈したもの、2 次抗体はペルオキシダーゼ標識したヤギ抗ヒト IgG 抗体を用いた。得られた O.D.値が GQ1b のみを抗原とした方が、(GQ1b+PA)を抗原とした場合より高いものを A 群、低いものを B 群とした。この 2 群間における、先行感染の種類(上気道感染・消化器感染)、各種神経症状(眼球運動障害・小脳性失調・球麻痺・深部感覚障害)の有無について、相関関係を検討した。相関関係は $p < 0.05$ のときに有意であると判断した。

(倫理面への配慮)

本研究は個人の遺伝情報及び疾患情報に関するものではなく、患者群を対象とするものであり、倫理面の問題は無いと判断した。

1) 東京大学医学部神経内科

研究結果

54 例を全体として見たときには、抗 GM1 IgG 抗体の場合と異なり、PA との混合抗原による有意な活性の増強は見られなかった。しかし、個々の例においては、抗原への PA の混合により抗体活性が増強するものとしないうものが見られ、前者は 24 例(A 群)、後者は 30 例(B 群)であった。

先行感染については、上気道感染・消化器感染とも、両群間でその頻度に有意差は認められなかった。臨床症状に関しては、眼球運動障害と小脳性失調が高率であり、両群間で有意差は認められなかった。一方、球麻痺については、A 群において、有意にその出現が多いという結果が得られた($p<0.02$)。

MFS 54 例	先行感染 (上気道炎)	先行感染 (下痢)
A 群 24 例	15 (63%)	2 (8.3%)
B 群 30 例	24 (80%)	1 (3.3%)

眼球運動 障害	小脳性 失調	球麻痺*	深部感覚 障害
24(100%)	19 (79%)	8 (33%)	5 (21%)
30(100%)	26 (87%)	1 (3.3%)	2 (6.7%)

(* $p<0.02$)

考察

MFS における抗 GQ1b IgG 抗体については、PA との混合抗原への抗体活性が、GQ1b 単独抗原を用いる場合に比べて増強する症例の比率が、抗 GM1 IgG 抗体と比較して低いことがわかった。

球麻痺症状が、GQ1b+PA の混合抗原よりも GQ1b 単独抗原への反応が強い群に優位に多くみられた。

抗ガングリオシド抗体の 1 つである抗 GD1b 抗体については、その反応性の違いにより、disialosyl 基への反応と sensory ataxia, Gal-GalNAc 部位への反応と motor dominant の症状、monospecific な反応と脱髄及び感覚障害との関連といったように、抗体の fine specificity と特有の臨床症状との関連が報告されている。

今回の抗 GQ1b IgG 抗体のデータは、MFS における球麻痺合併の有無に抗体の fine specificity が関連することを示唆するものと考えた。

結論

今回の研究により、MFS における球麻痺の有無に、抗 GQ1b 抗体の fine specificity の違いが関連することが示唆された。こうした抗糖脂質抗体の反応性と臨床症状との関連は、診断・発症機序の解明に有用であり、今後も詳細な検討が必要と考えた。

文献

1) Kusunoki S, Morita D, Ohminami S, et al. Binding of immunoglobulin G antibodies in Guillain-Barré syndrome sera to a mixture of GM1 and a phospholipid: Possible clinical implications. Muscle & Nerve 2003, in press

健康危険情報

特になし。

知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし

ギラン・バレー症候群における *Campylobacter jejuni* 由来 Dps 蛋白に対する免疫応答の存在

主任研究者 村井弘之¹⁾

共同研究者 朴華¹⁾、三野原元澄¹⁾、石川崇彦²⁾、孫暁嘉¹⁾、小副川学¹⁾、水之江義充²⁾、楠進³⁾、吉良潤一¹⁾

研究要旨

私どもの研究グループにおいては、ギラン・バレー症候群 (GBS) の先行感染病原体である *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) より DNA-binding protein from starved cells (C-Dps) をクローニングすることに成功した。今回、血清抗 C-Dps-IgG 抗体価は、消化器感染後 GBS 患者と *C. jejuni* 腸炎患者でのみ認められ、平均 OD 値は消化器感染後 GBS 患者で高い傾向が認められた。また、C-Dps にて前処置したラット中枢神経組織切片を、抗 C-Dps モノクローナル抗体を用いて発色させたところ、ニューロンでの発色が認められた。C-Dps とホモロジーの強い *Helicobacter pylori* の NAP はガングリオシドと結合することから、C-Dps も同様にガングリオシドと結合するのかもしれない。これらのことより、*C. jejuni* 感染後 GBS について、C-Dps の関与が示唆され今後の検討を要するものと考えられた。

目的

Campylobacter jejuni (*C. jejuni*) は Guillain-Barre 症候群 (GBS) の先行感染病原体であり、LPS とガングリオシドとの分子相同性から GBS 発症との関連が盛んに検討されている。一方、*C. jejuni* は生体への感染に伴い、cytolethal distending toxin やコレラ毒素様の enterotoxin 等を放出する。ごく最近、我々は *C. jejuni* がストレス下におかれたときに多量に産生する蛋白の一つである *C. jejuni* 由来 DNA-binding protein from starved cells (C-Dps) 蛋白のクローニングに成功した。本研究では、C-Dps 蛋白の GBS の病態への関与を解明することを目的とする。

対照・方法

1) ELISA 法による抗 Dps-IgG 抗体測定

消化器感染後 GBS 患者 21 名、上気道感染後 GBS 患者 17 名、発熱後 GBS 患者 5 名、*C. jejuni* 腸炎患者 7 名、健常対照 61 名、多発性硬化症 (MS) 患者 70 名、HAM 患者 29 名、アトピー性脊髄炎 (AM) 患者 25 名、Miller Fisher 症候群 (MFS) 患者 9 名、慢性炎症性脱髄性多発根神経炎 (CIDP) 患者 6 名からの血清を用いて、C-Dps に対する抗体価を ELISA 法にて測定した。リコンビナント C-Dps 蛋白を 2 μg/ml で overnight で固相化し、血清 (2000 倍)、HRP 標識抗ヒト IgG 抗体 (2000 倍) を作用させた。O.D. 450nm

で測定し、健常対照の平均+5SD (0.1836) 以上を陽性とした。

2) 抗 C-Dps モノクローナル抗体による、ラット中枢神経組織の免疫染色

正常 Lewis rat を還流固定後、大脳・脊髄の凍結切片を作製した。抗 C-Dps モノクローナル抗体は、BALB/C マウスにリコンビナント C-Dps 蛋白を 4 回免疫し、細胞融合後、ELISA, WB にて確認後、陽性ハイブリドーマの培養上清を用いた。C-Dps 蛋白を 10 μg/ml、抗 C-Dps モノクローナル抗体 (×20)、HRP 標識された抗マウス IgG 抗体の順で各切片にあてた後、発色を行った。

結果

1) ELISA 法による抗 Dps-IgG 抗体測定

抗 C-Dps-IgG 抗体は、消化器感染後 GBS 患者と *C. jejuni* 腸炎患者血清にのみ認められた (図 1)。消化器感染後 GBS と上気道感染後 GBS (p=0.007)、または発熱後 GBS (p=0.013) とでは、Welch 法にて陽性率に有意差を認めた。消化器感染後 GBS と *C. jejuni* 腸炎との間には有意差はみられなかったが、平均 O.D. 値は消化器感染後 GBS で 0.232、*C. jejuni* 腸炎で 0.101 であり、消化器感染後 GBS で高い傾向にあった。

2) 抗 C-Dps モノクローナル抗体による、ラット中枢神経組

¹⁾九州大学医学部神経内科、²⁾九州大学医学部細菌学

³⁾東京大学医学部神経内科

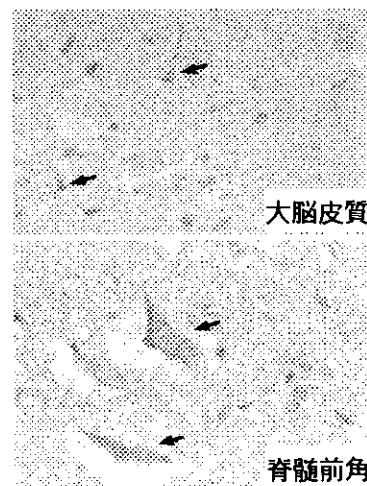
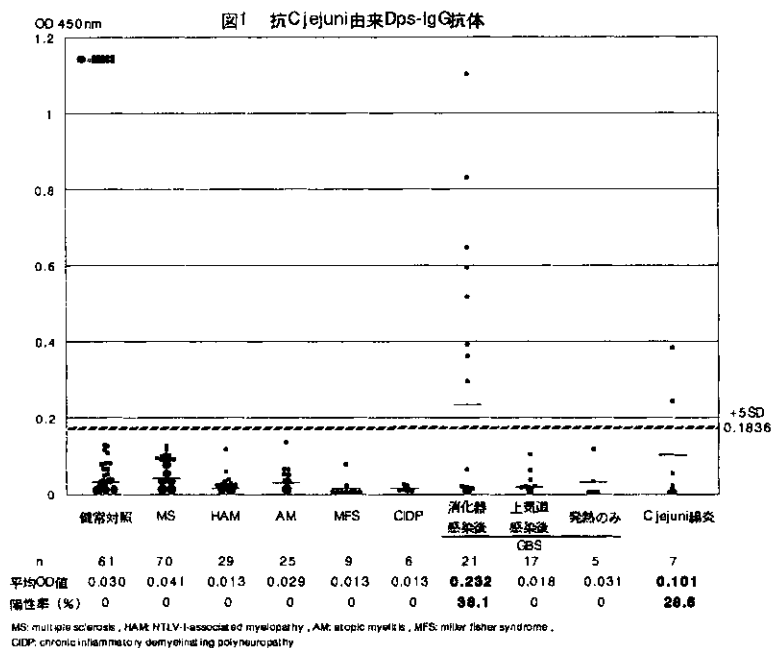


図2 抗C-Dpsモノクローナル抗体を用いたラット中枢神経組織の染色

織の免疫染色

抗 C-Dps モノクローナル抗体のみでは、発色は認められなかったが、C-Dps 蛋白を加えた後、抗 C-Dps モノクローナル抗体を用いることで、大脳皮質・脊髓前角のニューロンが染色された (図2)。

考察

Dps 蛋白ファミリーは、フェリチン様の構造を示し 12 量体を形成している。これらは、細菌が飢餓や酸化ストレスにさらされた場合、DNA に結合し防御する働きを有する。*Helicobacter pylori* (HP) の Dps は、好中球の活性化を引き起こすため、特に Neutrophil-activating factor (NAP) と呼ばれる。HP 感染胃粘膜には好中球集積が特徴的であり、菌株での NAP 発現量の差や *napA* 遺伝子型により胃粘膜炎症反応に差があるといわれている。また、NAP は好中球上のガングリオシドと結合することが示されている。新しくクローニングされた C-Dps 蛋白は、この NAP と 41% のホモロジーを有する。今回、抗 C-Dps-IgG 抗体は、消化器感染後 GBS 患者に認められ、消化器症状を呈していない GBS や他の炎症性神経疾患では認められなかった。*C. jejuni* 腸炎患者血清中にも抗 C-Dps-IgG 抗体が認められるものがあったが、その抗体価は低かった。このことは、消化器感染後 GBS 患者は、その免疫系が Dps 蛋白に曝露されていること、そしてこの蛋白に対する強い免疫応答が誘導されていることを示唆する。なお、今回の消化器感染後 GBS 患者は、全例が *C. jejuni* によ

るものかは検討し得ていないこともあり、今後、*C. jejuni* に起因するものであるかどうか特定することも重要である。

一方、C-Dps 蛋白を用いた大脳切片の染色では、抗 C-Dps-モノクローナル抗体のみではニューロンの染色は認められないが、C-Dps 蛋白を加えることでニューロンが染色された。よって、抗 C-Dps 抗体によるニューロンへの交差反応性は無いものの、C-Dps 蛋白とニューロンとの複合体に対し、抗 C-Dps-IgG 抗体が作用する可能性が考えられた。このことは軸索障害を主体とする *C. jejuni* 腸炎後 GBS の発症や軸索障害の重症度に関連するのかもしれない。今後、NAP 同様にニューロン上のガングリオシドが C-Dps 蛋白のレセプターとなっているか検討したい。

結論

消化器感染後 GBS 患者での血清抗 C-Dps-IgG 抗体の上昇が認められる。C-Dps 蛋白はニューロンへ結合することが示唆された。これらのことから、Dps 蛋白が GBS の軸索障害に関与している可能性があり、今後の検討が必要である。

健康危険情報

なし

知的財産権の出願・登録状況

特許取得: なし

実用新案登録: なし

軸索型 Guillain-Barré 症候群モデル動物:感作条件の検討

分担研究者 結城 伸泰

共同研究者 薄 敬一郎、西本 幸弘、森 泉、古賀 道明、平田 幸一

研究要旨

軸索型 Guillain-Barré 症候群モデル動物の最適な作製方法を検討した。ウシ脳ガングリオシド (BBG) 5.0 mg をウサギの背部皮下に注射した。下記 5 群を各 3 羽ずつ行った。①Japanese white rabbit (JW) のオスに、*keyhole limpet hemocyanin* (KLH)、完全 Freund アジュバント (CFA) とともに感作した従来の方法では、3 羽とも発症した。②初回のみ CFA を用い 2 回目以降は不完全 Freund アジュバント (IFA) を使用した群では、3 羽とも発症したが、発症までに時間がかかり、症状も軽い傾向であった。③KLH に代わりメチル化ウシ血清アルブミン (mBSA) を使用した群では、1 羽のみ発症した。④JW ではなく New Zealand white rabbit (NZW) を使用した群では、2 羽が発症した。⑤JW のメスを使用した群では、オスに比べ差はみられなかった。明らかな麻痺を呈さなかったウサギも含め、全例で血漿 IgG 抗 GM1 抗体上昇、神経根における軸索変性所見を認めた。さらに、Lewis rat のオス 10 匹に、BBG 0.25 mg、KLH、CFA を腹腔内投与し、モデル作製を試みたが、抗 GM1 抗体の誘導も麻痺もみられなかった。従来の感作方法では、動物種とその品種、アジュバント、キャリア蛋白の要素のうちいずれも、最も発症しやすいものを用いていたため、臨床症状の発現率が高かったと思われた。しかし、NZW や 2 回目感作以降 IFA を用いても、本モデルの追試が可能である。

研究目的

軸索型 Guillain-Barré 症候群 (GBS) は、*Campylobacter jejuni* 腸炎に続発することが多く、IgG 抗 GM1 抗体との関連が知られている。われわれは、ウシ脳ガングリオシド (BBG) を Japanese white rabbit (JW) に感作することにより、軸索型 GBS モデル動物を樹立した [1]。さらに、このモデル動物を用いた電気生理学的検討や、免疫グロブリン大量静注療法の評価などに関して、過去 3 年間の当班会議で報告してきた。本モデル動物の報告後、多くの研究者より New Zealand white rabbit (NZW) やマウス、ラットでは発症しないのかなど質問を受けた。また、完全 Freund アジュバント (CFA) の反復投与は、全身の炎症性反応を引き起こす懸念があるため、倫理的な見地からも疑問が寄せられた [2]。そこで、より望ましい感作方法を検討した。

研究方法

1. ウサギモデルでの感作条件検討

BBG 5.0 mg を背部の皮下に注射した。①従来

の方法 [1] で JW オスに *keyhole limpet hemocyanin* (KLH)、CFA とともに感作した群、②初回のみ CFA を用い 2 回目以降は不完全 Freund アジュバント (IFA) を用いた群、③キャリア蛋白として KLH に代わりメチル化ウシ血清アルブミン (mBSA) を用いた群、④JW ではなく NZW を用いた群、⑤JW のオスではなくメスをを用いた群を、各々 3 羽ずつ行った。臨床症状が出現するか、もしくは最大 5 回まで、3 週間毎に感作を繰り返した。西本らによる臨床スケール (最大 13 点。平成 13 年度、当班会議で発表) に基づいて症状を評価し、感作開始から 15 週まで観察した。ELISA で、発症後 1 週以内の血漿 IgG 抗 GM1 抗体価を測定した。発症しなかったウサギの抗体価測定には、観察期間終了後の解剖時血漿を用いた。全身麻酔下に灌流固定を行い、神経組織標本を摘出した。脊髄神経根または馬尾の標本で軸索変性所見の有無を判断した。

2. ラットを用いた動物モデル作製の試み

Lewis rat のオス 10 匹に、KLH と CFA とともに BBG を 0.25 mg、腹腔内に投与した。感作は 3 週毎に 5 回まで繰り返し、15 週間症状を観察した。ELISA で、血漿中の抗 GM1 抗体を測定した。

(倫理面での配慮)

十分な麻酔など、実験動物の苦痛除去に細心の配慮をした。本研究で実施された動物実験は、「動物の愛護及び管理に関する法律(第221号)」、「実験動物の飼育及び管理に関する法律(第6号)」、および「獨協医科大学動物実験指針」に基づいており、獨協医科大学動物実験委員会により承認された(承認番号0146号、99-233号)。

研究結果

1. ウサギモデルでの感作条件検討: Table。

2. ラットを用いた動物モデル作製の試み

全例に麻痺は起こらず、血漿中抗 GM1 抗体は、IgG、IgMともに検出されなかった。

考察

ウサギモデルでは、2回目感作以降に IFA を用いた群でも全例が発症した。キャリア蛋白に mBSA を用いた場合は1羽のみ、NZW では2羽が発症した。これらは、従来の方法[1]に比べ、発症までに時間がかかり、症状も軽い傾向であった。今回の検討では JW の性別は特に関係なかった。明らか

な麻痺を呈さなかった NZW の1羽と mBSA を用いた2羽とも、血漿 IgG 抗 GM1 抗体高値、軸索変性所見を認めた。ラットでは抗 GM1 抗体の誘導も麻痺もみられなかった。

従来の感作方法[1]では、動物種とその品種、アジュバント、キャリア蛋白の要素のうちいずれも、最も発症しやすいものを用いていたため、臨床症状を発現する率が高かったと思われる。しかし、NZW や2回目感作以降 IFA を用いても、本モデルの追試が可能である。なお、BBG の抗原量は 2.5 mg でも十分である(平成12年度、当班会議で発表)。

参考文献

[1] Yuki N, et al. *Ann Neurol* 2001;49:712-720

[2] Nachamkin I. *Ann Neurol* 2002;52:127-128

健康危険情報

なし

知的財産権の出願・登録状況

特許取得:なし

実用新案登録:なし

Table. Different methods for AMAN rabbits immunized with 5.0 mg of bovine brain ganglioside mixture

Rabbit	Strain	Sex	Carrier Protein	Adjuvant	Innocation Times	Onset of Disease (Day)	Clinical Scale at Nadir	Anti-GM1 IgG Titer	Days from Onset to Sacrifice	Axonal Degeneration
Bg-1	JW	M	KLH	CFA	2	35	8	16,000	22	+
Bg-2	JW	M	KLH	CFA	3	57	10	16,000	26	+
Bg-3	JW	M	KLH	CFA	3	60	10	16,000	30	+
Bg-4	JW	M	KLH	CFA, IFA	5	94	6	16,000	27	+
Bg-5	JW	M	KLH	CFA, IFA	5	90	6	≥ 64,000	29	+
Bg-6	JW	M	KLH	CFA, IFA	4	77	6	8,000	22	+
Bg-7	JW	M	mBSA	CFA	5	-	-	16,000	-	+
Bg-8	JW	M	mBSA	CFA	5	97	8	32,000	25	+
Bg-9	JW	M	mBSA	CFA	5	-	-	4,000	-	+
Bg-10	NZW	M	KLH	CFA	3	61	8	8,000	31	+
Bg-11	NZW	M	KLH	CFA	5	97	7	32,000	30	+
Bg-12	NZW	M	KLH	CFA	5	-	-	16,000	-	+
Bg-13	JW	F	KLH	CFA	3	57	8	≥ 64,000	28	+
Bg-14	JW	F	KLH	CFA	3	55	10	16,000	23	+
Bg-15	JW	F	KLH	CFA	2	32	8	≥ 64,000	22	+

JW, Japanese white rabbit; NZW, New Zealand white rabbit; KLH, *keyhole limpet hemocyanin*; mBSA, methylated bovine serum albumin; CFA, complete Freund's adjuvant; IFA, incomplete Freund's adjuvant. Bg-7, Bg-9, and Bg-12 did not show obvious weakness. In these rabbits, anti-GM1 IgG antibody was assayed using sera obtained 15 weeks after the beginning of sensitization. Axonal degeneration was evaluated in specimens of spinal nerve roots or cauda equina.

神経変性疾患におけるサイトカイン遺伝子多型の役割

分担研究者 梶 龍児¹⁾

共同研究者 西村 公孝¹⁾、 久野 貞子²⁾、 川上 秀史³⁾

研究要旨

サイトカインは、炎症や免疫応答はもちろん中枢神経系内においても独自のネットワークを形成しており、神経栄養因子様作用やアポトーシスといったさまざまな役割を果たしている。神経変性疾患におけるサイトカインの役割を検討する目的で、分泌機能に差を認めるプロモーター領域の遺伝子多型を中心に関連研究を行った。MSA 患者では、TNF 遺伝子多型の分泌亢進型アリルが有意に増加し、IL-1 α および IL-1 β は、共に分泌亢進型アリルが有意に減少していた。PD 患者ではMSA 患者と同様に、TNF は Toxic に IL-1 β は Protective に作用した。AD 患者に関しては、いずれの多型も発症年齢を含めてコントロールと差はなかった。しかし、欧米白人で有意な偏りが報告されている TGF β 1, IL-6, IL-1 β の三つの多型に関して、分泌亢進アリルを合わせ持つとそれぞれ発症年齢が若年化した。神経変性疾患の治療あるいは進行を遅らせる方法として、サイトカインの分泌を modify させる薬剤の投与が検討に値すると考えられる。

研究目的

神経変性疾患であるパーキンソン病 (PD)、多系統萎縮症 (MSA)、およびアルツハイマー病 (AD) におけるサイトカイン遺伝子多型の役割を明らかにする目的で、分泌機能に差を認めるプロモーター領域の多型を中心に関連研究を行った。

1) IL-1 α promoter -889 (2q) 2) IL-1 β promoter -511 (2q) 3) TNF promoter -1031 (6p21) 4) IL-4 intron 3 Deletion/Insertion (5q31) 5) IL-6 promoter -634 (7p) 6) IL-10 promoter -592 (1q) 7) TGF β 1 promoter -509 (19q13) 8) MCP-1 promoter -2518 (17q11) 9) CCR2 V64I (3p21)

研究方法

日本人 PD 患者 171 例、MSA 患者 122 例、AD 患者 172 例、健常人 163 例につきサイトカインおよびケモカイン遺伝子多型として、以下の部位の多型を PCR-RFLP 法や allele-specific PCR 法を用いて解析した。

研究結果

PD 患者では、TNF の分泌亢進型とされる -1031C アリルが、発症年齢が 50 歳以下の若年発症 PD 群で有意に増加していた (p=0.0013)。IL-1 β では、genotype や allele frequency に関してコントロールと差を認めなかった。しかし、IL-1 β の分泌低下型アリル (-511*1) のホモが、分泌亢進アリル (-511*2) のホモに比べ有意に発症年齢が若か

- 1) 徳島大学医学部高次脳神経診療部
- 2) 国立療養所宇野病院臨床研究部
- 3) 広島大学医学部脳神経内科学

った (53.2 ± 9.3 years vs. 58.2 ± 10.2 years, $p=0.019$)。MCP-1 の多型では、分泌低下アリル (-2518A) をホモで有する患者は、MCP-1-2518*G carriers に比べて PD 発症が有意に遅れた (61.9 ± 10.4 vs. 54.7 ± 10.4 , $p=0.013$)。独立した PD 患者群 158 例でも同様の結果が得られた。

MSA 患者では、TNF 遺伝子多型において分泌亢進型アリル (-1031C) が有意に増加し ($p=0.0057$)、IL-1 α および IL-1 β は、共に分泌亢進型アリルが有意に減少していた (IL-1 α ; $p=0.014$, IL-1 β ; $p=0.0019$)。

一方、AD 患者に関しては、いずれの多型についても発症年齢を含めてコントロールと差はなかった。しかし、欧米白人で有意な偏りが報告されている TGF β 1, IL-6, IL-1 β の三つの多型に関して、TGF β 1 と IL-6、および TGF β 1 と IL-1 β の遺伝子多型の間で、分泌亢進アリルを合わせ持つとそれぞれ発症年齢が若年化した (TGF β 1-509*T/T and IL-6-634*C/C; onset 65.5 ± 9.1 , $p=0.034$, TGF β 1-509*T/T and IL-1 β -511*2 carrier; onset 65.3 ± 9.4 , $p=0.019$)。

分泌亢進アリルが患者群で増加あるいは発症年齢を早める場合を toxic、分泌亢進アリルが減少あるいは発症年齢を遅らせる場合を protective とした場合、PD と MSA はよく似た傾向を示し、TNF は toxic、IL-1 β は protective に作用することが示唆された。一方、AD では、IL-1 β はむしろ toxic に作用する傾向がみられた。

考察

TNF は、炎症やアポトーシスを誘導することから、PD および MSA に関して toxic に作用することが想像される。一方、IL-1 β も

炎症やアポトーシスを促進しうるが、同時に強力な神経栄養因子 (basic FGF など) の誘導作用を持っている。従って、PD や MSA では IL-1 β の神経保護作用がより優位に作用している可能性がある。

AD に関しては、抗炎症剤が治療にも応用されつつあり、in vitro や in vivo の系で、TGF β 1 のアミロイド沈着促進や IL-6/IL-1 の neuritic plaque の形成への関与なども報告されている。今回の解析により、リスクとしては非常に弱いものの、日本人においても欧米白人と同様にこれらのサイトカインが AD に対して toxic に作用することが示唆された。

関連研究については、統計上の問題 (多重比較)、地域差・民族差、コントロールの設定等多数の問題点があり、今回の解析は一次スクリーニングとして捉える必要がある。最近フィンランド人 PD 患者の関連研究で、我々の結果と同様に TNF が toxic に、IL-1 β が protective に作用するという報告があり、こうした独立したグループによる複数の追試が必要と考えられる。

結論

変性疾患におけるサイトカイン遺伝子多型の重要性が示唆された。今後、神経変性疾患の治療あるいは進行を遅らせる方法として、サイトカインの分泌を modify させる薬剤の投与が検討に値すると考えられる。

健康危険情報

なし

知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし

神経変性疾患における免疫機序

分担研究者 久永欣哉¹⁾

共同研究者 浅黄美沙¹⁾、岩崎祐三¹⁾、糸山泰人²⁾

研究要旨

孤発性パーキンソン病などの神経変性疾患は複数の原因が重なって発症すると考えられており、免疫異常の関与も示唆されている。我々はこれまでパーキンソン病患者の末梢血において CD3⁺ CD4 bright⁺ CD8 dull⁺ Tリンパ球の割合が有意に、かつ年余にわたって高値を示すことを報告した。これらのリンパ球は CD1a⁻ CD45RO⁺ CD95⁺ TCR- γ δ ⁻ であり、成熟した α β メモリーT細胞または細胞障害性T細胞である可能性がある。これらのリンパ球は IL-2、TNF- α 、IFN- γ 陽性、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1Ra、IL-4、IL-6、IL-8 陰性であり、Th1/Tc1 細胞の性格を有することが明らかとなった。遺伝的素因として各種サイトカイン遺伝子の多型を検討しているが、明らかな関連は認められていない。パーキンソン病の病態への関与は今後の検討を要する。

研究目的

孤発性パーキンソン病やアルツハイマー病などの神経変性疾患は複数の要因が重なって発症する多因子性疾患と考えられており、その一つとして免疫異常の関与も示唆されている。例えば、パーキンソン病患者の黒質では tumor necrosis factor (TNF)- α や interferon (IFN)- γ の Th1 系のサイトカインが増加しており、末梢血では CD4⁺ CD45RO⁺ メモリーT細胞などの増加が報告されている。また、サイトカイン遺伝子の多型では interleukin (IL)-1 β -511C/T、TNF- α -1031C/T、IFN- γ CA repeat 多型が発症年齢に関与しているとの報告がある (文献1)。

我々はこれまで、パーキンソン病患者の末梢血において、CD3⁺ CD4 bright⁺ CD8 dull⁺ Tリンパ球の割合が対照者 (p=0.0054) や軽症脳血管障害患者 (p=0.0022) に比して有意に、かつ年余にわたって高値を示すことを報告した (文献2)。すなわち CD4 bright⁺ CD8 dull⁺ Tリンパ球がリンパ球全体の1%以上の高値を示す割合は対照者 18%、軽症脳血管障害患者 18%に対し、

パーキンソン病患者では 58%にみられた。

これらのリンパ球は CD1a⁻ であり、胸腺で見られる未成熟な CD4⁺ CD8⁺ 細胞が漏れ出したものではなく、成熟したTリンパ球であると考えられる。また、これらの CD45RO⁺ CD95 (Fas)⁺ CD54 (ICAM-1)⁺ TCR- γ δ ⁻ であり、何らかの免疫活性を有する α β Tリンパ球であると考えられる。CD4⁺CD8⁺ (double positive) リンパ球はいくつかのウイルス (cytomegalovirus、EB virus、HTLV-1、HHV-6 など) や悪性腫瘍との関連が報告されており、なんらかの免疫賦活を受けた後、メモリーT細胞または細胞障害性T細胞として、疾患の病態に関与している可能性が示唆される。in vitro では CD4 bright⁺ CD8⁻ リンパ球も刺激により CD8 を発現して CD4⁺ CD8⁺ double positive リンパ球になりうると報告されている。

今回は、3 color-flow cytometry を用いて細胞のサイトカイン産生能を調べるとともに、各種サイトカインの遺伝子多型との関連を検討した。

研究方法

パーキンソン病患者のうち、これまでの検討で CD4 bright⁺ CD8 dull⁺ Tリンパ球が高値であった 10 例の末梢よりへパリン採血し、37°C、5.0% CO₂、Brefeldin (40 μ g / ml) 存在下に

1) 国立療養所 宮城病院 神経内科

2) 東北大学 大学院 神経内科学

phorbol 12-myristate 13 acetate (40ng / ml) およびlonomycin (4 μ g / ml) で4時間刺激し、CD4抗体-FITC、CD8抗体-PC5で免疫染色を施し、IntraPrep (Beckman Coulter) で処理した後、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1Ra、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、TNF- α 、IFN- γ 抗体-PEのひとつでさらに免疫染色を施し、3 color-flow cytometryによりCD4 bright⁺CD8 dull⁺Tリンパ球における免疫染色性を検討した。また、これまでにCD4bright⁺CD8 dull⁺Tリンパ球の割合を検討したパーキンソン病患者80人よりインフォームド・コンセントのもと末梢白血球のDNAを抽出し、IL-1 α -889C/T、IL-1 β -511C/T、IL-1 β +3953C/T、IL-1Ra variable number tandem repeat (VNTR)、TNF- α -850C/T多型を検出した。

結果と考察

CD4 bright⁺CD8 dull⁺ α β Tリンパ球はIL-2、TNF- α 、IFN- γ 陽性、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1Ra、IL-4、IL-6、IL-8陰性であり、Th1/Tc1細胞の性格を有することが明らかとなった

(図)。遺伝的素因として検討した各種サイトカイン遺伝子の多型ではCD4 bright⁺CD8 dull⁺Tリンパ球高値群(1%以上、40症例)と低値群(1%未満、40症例)の間に有意差が認められたものはなかったが、IL-1 α -889C/T多型において、高値群でT(+が多い傾向が認められた(表)。

これらのリンパ球がパーキンソン病の病態に関与するかどうかはさらに検討を要するが、引き続きこのリンパ球の性質、働きを調べるとともに、患者高値群における微生物感染や遺伝的素因の検討に加え、剖検脳での検討も進めていきたい。

文献

- 1) Nishimura M, et al. Influence of interleukin-1 β gene polymorphisms on age-at-onset of sporadic Parkinson's disease. Neurosci. Lett. 284: 73-76, 2000
- 2) Hisanaga K, et al. Increase in peripheral CD4 bright⁺CD8 dull⁺T cells in Parkinson disease. Arch. Neurol. 58: 1580-1583, 2001

図. 3 color-flow cytometry

(CD8 dull⁺T細胞のゲート。矢印がTNF- α またはIFN- γ 陽性のCD4 bright⁺CD8 dull⁺T細胞)

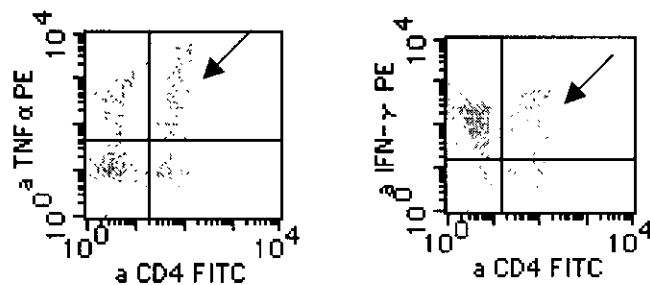


表. IL-1 α 遺伝子多型 (-889、プロモーター領域)

	パーキンソン病 CD4b+8d+ 1%以上 40例	パーキンソン病 CD4b+8d+ 1%未満 40例	対照 (文献1) 112例
C/C	28 (70%)	35 (88%)	87 (78%)
C/T	8 (20%)	5 (13%)	25 (22%)
T/T	4 (10%)	0 (0%)	0 (0%)

$\chi^2 p = 0.0649$, T(+): $\chi^2 p = 0.0557$

皮膚症状を主徴とする皮膚筋炎に対するシクロスポリンA療法の検討

分担研究者 池田修一

共同研究者 下島恭弘、岡野友美、星研一、山本寛二、松田正之

研究要旨

皮膚症状を主徴とする皮膚筋炎 (amyopathic dermatomyositis) における cyclosporin A (CyA)療法の有用性について臨床的に検討した。対象は十分量のステロイド薬の投与にもかかわらず間質性肺炎、あるいは皮膚症状が進行する難治例4例で、経口投与が可能な症例では CyA 腸溶錠を 12 時間毎に服用させ、血中トラフ値が 100~150 ng/ml になるように内服量を調節した。CyA 投与開始後、全例で臨床症状に改善が認められたが、高度の間質性肺炎を合併した1例では腎機能障害をきたし、本薬の中止後から症状が急速に進行して死亡した。他の症例では明らかな副作用は見られず、全例で血清中 KL-6 が間質性肺炎の経過観察に有用であった。本症では致命的な間質性肺炎を高頻度で合併するため、ステロイド薬などの従来からの治療に対して抵抗性を示す症例では早期から CyA の使用を考慮すべきである。

研究目的

筋症状がなく皮膚症状のみが目立つ皮膚筋炎 (amyopathic dermatomyositis) では従来から間質性肺炎の合併が多く、治療に難渋することが少なくない。本症でみられる間質性肺炎はステロイド治療や血液浄化療法に対して抵抗性で致死的な経過をとる場合があるが、いまだに確実な治療法がないのが現状である。我々は本症の臨床的特徴を明らかにするとともに、シクロスポリン A (CyA) 療法の有用性について検討した。

研究方法

対象は最近 3 年間に当科へ入院した皮膚症状を主徴とする皮膚筋炎 (dermatomyositis, DM) 4 例 (男性 1 名、女性 3 名、平均年齢 42.5 歳、平均罹病期間 4 か月)。CyA 療法開始前に副腎皮質ステロイド療法が全例で行なわれていた。CyA の導入基準は、十分なステロイド治療を行なっているにもかかわらず進行性の間質性肺炎、あるいは皮膚病変がみられる場合とした。本薬の投与方法は、経口投与が可能な場合には約 5mg/kg/day の腸溶錠を 1 日 2 回 (12 時間毎) に分けて内服させ、血中トラフ値が 100~150 ng/ml になるように服用量を

調節した。内服が不可能な場合には持続静注を行ない、血中濃度を 400~600 ng/ml になるようにコントロールした。臨床症状を観察するとともに、末梢血中 KL-6・動脈血ガス・胸部 CT を定期的に調べて CyA の臨床効果を検討した。

(倫理面への配慮)

CyA 療法で期待できる有効性と副作用の可能性について全例に説明を行ない、本薬の使用について了解を得た。

研究結果

当科入院時には全例で筋力低下は目立たず炎症反応は低値を示し、CK は 1 例 (症例 3) で軽度の上昇が見られた他は正常範囲内であった。抗 Jo-1 抗体を含めた自己抗体は全例で陰性。4 症例の経過を示す。

症例 1 : 25 歳男性

2001 年 7 月から手指伸側と手背に紅斑が出現し、8 月には肘および膝伸側へと広がった。筋力低下のため近医入院し、CK 272 U/l (正常 230 以下) と軽度高値を認めたことから DM と診断された。ステロイド治療で CK と筋力は正常化した。が労作時呼吸困難が出現し、胸部レントゲン写真と KL-6 上昇から間質性肺炎の合併と考えられた。またこの頃から両側手背、肘・膝伸側、足底の皮疹が増悪して潰瘍化し、2002 年 1 月に当科へ転院した。ステロイド治療に加えて免疫グロブリン大量静注療法を施行し皮疹はやや軽快したものの、間質性肺炎は増悪傾向を

示し、2002 年 4 月から CyA を導入。5 月には間質性肺炎は安定化して KL-6 は正常化し、皮疹は治癒した。同年 6 月退院。ステロイド薬を外来にて漸減中で、経過は良好である。

症例 2 : 34 歳女性

2001 年 12 月頃から両手背の皮疹が出現し、顔面と背中へ拡大。皮膚所見と生検で DM と診断された。2002 年 5 月から近医でステロイド治療を開始されたが皮疹は軽減せず、当科入院。明らかな筋力低下はなかった。CK は正常範囲内であったが KL-6 が高値を示し、胸部レントゲン写真で間質性肺炎が見られたことから、ステロイド治療に加えて CyA が導入された。6 月には皮疹は軽快し KL-6 は低下して、胸部レントゲン写真上でも間質性肺炎像の縮小が確認された。同年 8 月退院。外来にてステロイド薬を漸減中で、経過は良好である。

症例 3 : 65 歳女性

2001 年 1 月頃から両手伸側、肘・膝伸側、顔面、胸背部に紅色の皮疹が出現。近医に入院し、CK 軽度上昇 (376 IU/l) から DM と診断された。筋力低下は目立たなかった。ステロイド治療を開始されたが皮疹は軽減せず、3 月に当科へ転院した。胸部レントゲン写真で間質性肺炎を認め KL-6 は高値を示し、4 月から呼吸困難が急速に増悪。ステロイドパルス療法と血漿交換を行なったが効果なく、気管内挿管して人工呼吸管理を開始し、同時に CyA を持続点滴で導入した。間質性

肺炎像は軽減して KL-6 は低下し皮疹は軽快したが、CyA によると考えられる腎機能障害が出現。本薬を中止してステロイドパルス療法と血漿交換に変更後、呼吸状態が急速に悪化して永眠された。

症例 4：46 歳女性

2002 年 8 月頃から両手指小関節背側、両肘、顔面に赤色の皮疹が出現して拡大した。10 月、皮膚生検にて皮膚筋炎と診断され当科入院。入院時、筋力低下はなく CK は正常範囲内で、胸部レントゲン写真で間質性肺炎を認めた。ステロイド治療を開始したが、11 月から KL-6 の上昇に伴って胸部 CT で間質性肺炎の増悪が見られたため CyA を導入した。精神症状を併発したためステロイド薬を減量中で、間質性肺炎と皮膚症状に増悪は見られていない。

全例がステロイド治療に対し抵抗性で、CyA が皮疹と間質性肺炎の両者に著効を示したが、うち 1 例（症例 3）は腎機能低下のために同薬の中止後、間質性肺炎が急速に進行して死亡した。血中 KL-6 が間質性肺炎の病勢を把握するのに有用であった。

考察

Amyopathic DM では高頻度に間質性肺炎を合併し、症例 3 のように急速に進行して予後不良な臨床経過をとる場合には病理組織学的に diffuse alveolar damage を

呈することが多いことが知られている。最近、Amyopathic DM に合併した間質性肺炎に対しては、本邦を中心にして CyA 療法が行なわれるようになり、その有効性を示す臨床報告がいくつかなされている。今回の我々の検討では全例で CyA が有効であったが、症例 3 は腎障害のために本薬を中止後、呼吸器症状が急速に進行して死亡した。過去の報告例に我々の症例を含めても、ステロイド薬抵抗性の難治例に CyA を用いた時の救命率は約 40% と依然として低く、今後は予後不良例の見きわめと CyA 投与開始時期の検討が必要であると思われる。

結論

皮膚症状を主徴とする DM におけるでは予後不良の間質性肺炎を合併することが多く、ステロイド薬抵抗性の場合には早期に CyA を試みるべきである。CK の上昇が軽度もしくは見られない場合が多いので、間質性肺炎の治療指標としては胸部 CT、Ga シンチグラム、血中 KL-6 が有用である。

健康危険情報

なし

知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし

神経 Sweet 病の全国調査

分担研究者 久永欣哉¹⁾

共同研究者 岩崎祐三¹⁾、糸山泰人²⁾

研究要旨

Sweet 病は発熱、浮腫性紅斑などを呈する全身性炎症性疾患で、紅斑の皮膚生検にて血管炎を伴わない好中球の浸潤を認めることが特徴である。Behçet 病に類似しているが、HLA-B51 ではなく B54 と相関する。神経症状を伴う Behçet 病を神経 Behçet 病というが、神経症状を伴う Sweet 病の症例も自験例を含め 15 例の論文報告があり、我々はこれを神経 Sweet 病として提唱している。今回、第一次全国調査を行い、新たに 9 例の該当症例が確認された。既報症例と合わせた計 24 例の臨床像の解析では、好発年齢は 30~70 歳であり、神経症状は皮膚症状と同時期 (10 例) か、または遅れて (13 例) 出現し、大部分が脳炎様の中樞神経症状を示し、基底核、脳幹などに好発し、髄液検査で軽度の細胞・蛋白増加を示し、ステロイドが著効を示すが再発する場合が多いことなどが明らかとなった。

研究目的・方法

Sweet 病は発熱、浮腫性紅斑などを呈する全身性炎症性疾患である。浮腫性紅斑は圧痛を伴い、顔、頸部、体幹上半部、四肢に好発し、ステロイドに反応して通常瘢痕を残さず治癒する。紅斑の皮膚生検にて血管炎を伴わない深部への好中球の浸潤を認めることが特徴である。Behçet 病に類似しているが、Behçet 病と相関する HLA-B51 ではなく (対照 17% に対し Behçet 病では 51%、Sweet 病では 14%)、B54 と相関する (対照 14% に対し 48%)。神経症状を伴う Behçet 病を神経 Behçet 病というが、神経症状を伴う Sweet 病の症例も自験例を含め 15 例の論文報告があり、我々はこれを神経 Sweet 病として提唱している。

今回、我々は神経 Sweet 病に関する第 1 次全国調査を施行した。方法として、まず簡易調査票を全国 166 施設の神経内科に送付し、(1) 最近 10 年間の神経 Behçet 病および類縁疾患の症例、

(2) その中で Sweet 病 (様) 浮腫性紅斑または HLA-B54 を示した症例数について調査を行った。さらに、(2) の症例について御報告頂いた 21 施設に詳細調査票を送付して、その皮膚症状、神経症状とその発症年齢、皮膚生検実施の有無、各種検査所見、HLA 型、治療と経過について調査を行った。

結果

簡易調査票には 88 施設より御回答を頂き、神経 Behçet 病症例数は合計 307 例で、上記 (2) に該当する症例は 26 例であった。詳細調査票には 15 施設から計 16 症例の御回答を頂き、今回は浮腫性紅斑が確認された 9 例を該当症例とした。既報症例と併せた計 24 例について臨床像を検討した。

男女比は 14:10 で、うち 19 例が本邦例である。皮膚生検による Sweet 病の確定診断は 21 例でなされている。24 例中、本邦の Behçet 病の診断基準で不全型の基準を満たす症例が 5 例含まれている。神経症状の発症年齢は生後 7 週で髄膜炎を呈した海外の報告を除き 30 歳から 70 歳

1) 国立療養所 宮城病院 神経内科

2) 東北大学 大学院 神経内科学

で(平均48.9歳)、脳炎様18例、髄膜炎3例、末梢神経障害2例、TIA様1例であった。皮膚症状発症と同時期発症が10例と多く、他の13例で約1年から20年皮膚症状発症が先行している。1例のみ(自験例)、神経症状発症時やそれ以前には皮膚症状は確認されていない(3年後に確認)。神経症状では意識障害(13例、そのうち4例はてんかん発作あり)、頭痛(10例)、眼球運動障害・複視(7例)、片(四肢)麻痺(6例)、失調(5例)、構音障害(4例)、記憶障害(4例)などが多かった。ぶどう膜炎を示した例は2例であったが、いずれも皮疹の生検診断が未実施で診断が未確定の症例であった(いずれもBehçet病不全型の基準を満たす症例)。随伴症状としては、発熱(18例)、口腔内アフタ(12例)、関節炎・関節痛(8例)、外陰部潰瘍(7例)、咽頭痛(4例)、結節性紅斑(3例)などが多くみられた。針反応は記載のあった14例中5例で陽性だった。脳CTまたはMRIで脳炎様の信号異常が確認された症例は11例で、大脳皮質(4例)、大脳白質(4例)、視床(4例)、基底核(5例)、脳幹(5例)、小脳(4例)など広く認められた。HLA-B54は調べられた16例中10例で確認され、一方、B51は6例(うち3例はB51、B54両方)であった。血沈亢進、白血球増多、CRP高値がほとんどの症例でみられた。髄液は19例で調べられ、細胞数は2~512/ μ l(平均70.3/ μ l、大部分でリンパ球優位)、蛋白は31~236mg/dl(平均82.5mg/dl)といずれも大部分の症例で軽度の増加を示した。血清・髄液中の各種微生物抗体、自己免疫系抗体などが調べられている症例もあるが特筆すべきものは見つかっていない。

ステロイドは22例で投与され、大部分の症例で皮膚・神経症状ともに著効を示した。再発は5例で2~6回認められている。後遺症は7例でのみ記載されており、軽度の記憶障害4例(うち2例はBehçet病不全型、1例はHLA-B51・B54両方を示した症例)、構音障害・失調1例

(HLA-B51の症例)、難聴、1指のしびれ、それぞれ1例ずつ(いずれも末梢神経障害のみで中枢神経の症状は示さなかった症例)であった。

考察

Sweet病における浮腫性紅斑はステロイドによく反応して、通常瘢痕を残さずに治癒する。Sweet病に合併する脳炎もステロイドによく反応して、予後良好であり、Behçet病とは異なる特異的な病態をもつ可能性がある。一方、Sweet病にはBehçet病や他の膠原病、悪性腫瘍などの合併例が多いのも確かであり、これらを十分に検索して区別していく必要がある。末梢神経障害のみを示した2例をこの疾患概念に含めるべきかどうかは検討を要する。Sweet病症例のうち神経症状を合併する症例の背景となる素因の検討も神経Behçet病との関連もあり興味深い。ステロイドに対する反応は良いが再発することが多い点は今後の治療上の問題点となろう。また、神経Sweet病を区別することで、より難治性である神経Behçet病の解析も容易になる可能性がある。今後、症例のさらなる収集と解析を進め、脳炎の鑑別診断の1つとして「神経Sweet病」の確立を図りたい。

文献

Hisanaga K. et al. "Neuro-Sweet disease" Benign recurrent encephalitis with neutrophilic dermatosis. Arch Neurol 56: 1010-1013, 1999

謝辞

全国調査にあたりまして御回答を頂きました88施設の諸先生方に深謝致します。なお、詳細調査票への御回答は以下の15施設より頂きました(北祐会神経内科病院、岩手医科大学、松戸市立病院、東京医科歯科大学、北里大学、東海大学、横浜市立大学、犀潟病院、三重大学、関西医科大学、馬場記念病院、島根医科大学、徳島大学、産業医科大学、鹿児島大学)。

亜急性硬化性全脳炎患者の宿主側因子の解析

分担研究者 原 寿郎¹⁾

共同研究者 鳥巢浩幸¹⁾、吉良龍太郎¹⁾、楠原浩一¹⁾

研究要旨

抗ウイルス蛋白 MxA は I 型インターフェロンに誘導され、麻疹ウイルスに対して増殖抑制作用を持つことが知られている。われわれは亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) 患者群において *MxA* 遺伝子プロモーター領域の一塩基多型 -88G/T で T アレルの頻度と TT ホモ接合者の頻度が対照群より有意に高いことを明らかにした。今回、デュアルルシフェラーゼアッセイを用いて両アレルのプロモーター活性を比較したところ、T アレルが G アレルより *MxA* 遺伝子の転写を有意に高めることが明らかとなった。MxA は麻疹ウイルス遺伝子の転写抑制を介して、感染細胞におけるウイルス性蛋白の細胞表面への発現低下に影響し、潜伏感染に関与すると考えられ、*MxA*-88T アレルは麻疹ウイルスの潜伏を促すことによって SSPE となる危険性を高めると予想される。

研究目的

亜急性硬化性全脳炎 (subacute sclerosing panencephalitis; SSPE) では麻疹罹患時の年齢が 2 歳以下でリスクが高いことや性差があることから、その病態には宿主側因子が関与すると考えられている。SSPE における宿主側因子の解析はその病態の解明のみならず、将来的な治療の場面にも役立つことが期待される。

われわれは SSPE 患者の麻疹ウイルスに対する免疫応答について研究を行い、現在、インターフェロンを介した非特異的免疫を担う抗ウイルス蛋白 MxA に着目して、その SSPE への関与を検討している。MxA は I 型インターフェロンに誘導されて細胞質に発現し、RNA ウイルスであるインフルエンザウイルスや麻疹ウイルスの増殖を抑制する蛋白である。ヒトの培養神経細胞でも MxA による麻疹ウイルス遺伝子の転写の抑制が報告されており、MxA は脳内持続感染の成立に関与すると考えられている^{1,2)}。

われわれは SSPE 患者の *MxA* 遺伝子プロモーター領域上の一塩基多型 (*MxA*-88G/T 多型) を用いて遺伝子関連研究を行い、T アレルの頻度と TT

ホモ接合者の占める割合が SSPE 患者群で有意に高いことを明らかにした。今回、われわれは SSPE との関連が予想される *MxA*-88G/T 多型が、実際に *MxA* 遺伝子のプロモーター活性に影響を及ぼす機能的な遺伝子多型であるかどうかを検証するために、ルシフェラーゼ遺伝子をレポーター遺伝子とした発現実験を行い、この多型と SSPE との関連を検討した。

研究方法

MxA-88G/T 多型及び -123C/A 多型の遺伝子型を決定した対照群から -88TT と -123AA を有する者、-88GG と -123CC を有する者、-88TT と -123CC を有する者を選び、それぞれ末梢血から抽出した DNA を用いて、両多型を含む 540bp の *MxA* 遺伝子プロモーター領域を PCR 法でクローニングした。そして、この 3 種類のハプロタイプを有する遺伝子断片 (-88T&-123A, -88G&-123C, -88T&-123C) をそれぞれホタルルシフェラーゼ発現プラスミド (pGL3-Basic Vector, Promega) に組み込み、ウミシイタケルシフェラーゼ発現プラスミド (pRL-TK, Promega) とともに HeLa 細胞に LipofectAMINE PLUS Reagent (GIBCO-BRL) を用いて遺伝子導入を行った。導入後、インターフェ

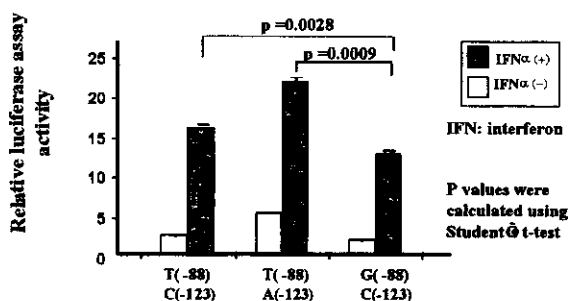
1) 九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野

ロンαを1000IU/mlとなるように培養液に加え、24時間後、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega)を用いて、細胞内に発現しているルシフェラーゼの酵素活性を測定した。

本研究における遺伝子解析は患者あるいは保護者の文書による同意を得て行い、当院での倫理委員会の承認を受けている。

研究結果

相対的ルシフェラーゼ活性はインターフェロンα投与後、全てのハプロタイプで上昇し、-88T&-123A, -88T&-123C, -88G&-123Cの順に有意に高かった。これはインターフェロンα投与下において、-88Tを有するハプロタイプが、-88G&-123Cよりも有意に*MxA*プロモーター活性が高いことを示す。



MxA-88/123 ハプロタイプと*MxA* プロモーター活性

考察

MxA-88G/T 多型は interferon-stimulated response element (ISRE)-like sequence と呼ばれる配列上に存在し、ISRE との相同性からインターフェロン刺激による転写活性はTアレルが高いことが予想されていた。今回の遺伝子発現実験の結果はその予想を支持し、-88G/T 多型は *MxA* 遺伝子の発現に関わる機能的多型であり、*MxA*-88T アレルは *MxA* 遺伝子を発現しやすいアレルであることが明らかとなった。

MxA あるいは I 型インターフェロンが麻疹ウイルスの排除に強く関わっている報告は現在までにない。また、動物実験ではあるが、中枢神経系でのウイルス排除においては I 型インターフェロンでなく、インターフェロンγが重要であることが示されている。このため、SSPE と *MxA* の関連は

麻疹ウイルス排除に関するものではないことが予想される。

MxA はむしろ麻疹ウイルス遺伝子の転写抑制を介して、感染細胞におけるウイルス性蛋白の細胞表面への発現低下に影響していると考えられる。実際、SSPE 患者の脳の感染細胞ではウイルスのエンヴェロップ蛋白の産生が低いことが知られ、このために細胞表面のウイルス性蛋白の発現が低下し、免疫系から認識されにくい状態にあると考えられている。*MxA*-88T アレルは *MxA* を強く発現することによって、ウイルス性蛋白の発現をより低下させ、麻疹ウイルスの潜伏を促し、SSPE となる危険性を高めると予想される。

結論

ウイルス蛋白 *MxA* 遺伝子のプロモータ領域における-88G/T 多型は *MxA* 遺伝子の発現を調節する機能的な多型であり、T アレルは G アレルよりもインターフェロン投与下での活性が高い。*MxA*-88T アレルは *MxA* を強く発現することにより、麻疹ウイルスの潜伏を促し、SSPE となる危険性を高めることが予想される。

文献

1. Schneider-Schaulies S, et al: Cell type-specific *MxA*-mediated inhibition of measles virus transcription in human brain cells. *J Virol* 68:6910-6917, 1994
2. Schneider-Schaulies J, et al: Measles virus in the CNS: the role of viral and host factors for the establishment and maintenance of a persistent infection. *J Neurovirol* 5:613-622, 1999

健康危険情報

なし

知的財産の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案特許：なし