

厚生労働科学研究費補助金
(難治性疾患克服対策研究事業)

免疫性神経疾患に関する調査研究
(H14-難治-16)

平成 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 吉 良 潤 一
(九州大学大学院医学研究院神経内科学 教授)

平成 16 年 (2004) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告	3
主任研究者：九州大学大学院医学研究院神経内科学 吉良 潤一	
II. 分担研究報告	
MSの全国臨床調査	
1. 多発性硬化症全国臨床調査	15
九州大学大学院医学研究院神経内科学 吉良 潤一、他	
2. 多発性硬化症の QOL 調査－基本計画と進捗状況	18
北海道大学大学院医学研究科神経内科学 菊地 誠志、他	
MSの臨床病型と遺伝的背景	
3. 日本での Charcot 古典型多発性硬化症の出現と増加	20
国立病院機構宇多野病院 齋田 孝彦、他	
4. 特発性炎症性脱髄疾患の三次元的概念理解：attack-related severity の重要性	23
北海道大学大学院医学研究科神経内科学 菊地 誠志、他	
5. 日本人多発性硬化症における臨床病型と血漿型 PAF-AH および PAF 受容体遺伝子多型との関連と IFN β -1b 投与時の末梢血 T 細胞内サイトカイン産生パターンの変動	26
九州大学大学院医学研究院神経内科学 吉良 潤一、他	
MSの画像解析	
6. 日本人の Charcot 古典型多発性硬化症の若年者で脳病巣が増加している	29
国立病院機構宇多野病院 齋田 孝彦、他	
7. MRI 拡散テンソル解析を用いた多発性硬化症患者の 大脳皮質・白質機能の非侵襲的評価	32
新潟大学脳研究所神経内科学 田中 恵子、他	
8. 多発性硬化症の ¹ H-MRS	34
東京理科大学理学部教養 太田 宏平、他	

MSの免疫担当細胞と治療による変化

9. RRMS, SPMS, PPMS の免疫病理学的背景は異なるか?..... 37
国立病院機構宇多野病院臨床研究部
松井 真、他
10. フローサイトメトリーによる多発性硬化症患者のサイトカイン産生能検索結果と
その分子免疫学的背景 38
国立病院機構宇多野病院臨床研究部
松井 真、他
11. 新しい調節性 T 細胞(V α 7.2-J α 33 invariant T cells)の多発性硬化症における役割..... 39
国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部
山村 隆、他
12. IFN- β 1b による多発性硬化症患者末梢血の免疫調節細胞と
細胞傷害活性の経時的変化 42
東京理科大学理学部教養
太田 宏平、他

MSの血液脳関門

13. 多発性硬化症における血液脳関門型の血管内皮細胞間接着分子の
VE-cadherin の検討 45
広島大学医学部・歯学部附属病院脳神経内科
郡山 達男、他
14. E-セレクトインに対する siRNA 導入による白血球のヒト血管内皮への接着抑制..... 49
東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科脳神経機能病態学
神田 隆、他
15. 共焦点レーザー顕微鏡を用いた免疫性神経疾患における
バリアー浸潤細胞解析の試み 52
東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科脳神経機能病態学
神田 隆、他

MSの髄液サイトカイン

16. 多発性硬化症患者の髄液中 Osteopontin の測定..... 54
北海道大学大学院医学研究科神経内科学
菊地 誠志、他
17. 多発性硬化症患者の髄液 Th1 / Th2 バランスとタンパクプロファイル 56
東北大学大学院医学系研究科神経内科学
糸山 泰人、他
18. 多発性硬化症の髄液中サイトカインの評価 58
国立長寿医療センター研究所
田平 武、他

19. 日本人多発性硬化症の臨床病型ごとの髄液および
髄液細胞内サイトカイン解析 60
九州大学大学院医学研究院神経内科学
吉良 潤一、他

MSの動物モデル(EAE)

20. 多発性硬化症実験動物モデルにおける髄鞘塩基性蛋白の
T細胞抗原性に関する研究 62
金沢医科大学神経内科
酒井 宏一郎、他
21. Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)誘導による実験的自己免疫性脳脊髄炎
における activation-induced cytidine deaminase (AID)による
抗MOG抗体クラススイッチの役割 65
信州大学医学部保健学科生体情報検査学
高 昌星、他
22. アストロサイト由来の免疫抑制因子
(astrocyte-derived immune suppressor factor, AdIF)による EAE の治療 69
国立長寿医療センター研究所
原 英夫、他
23. arundic acid (ONO-2506)の多発性硬化症実験動物(慢性進行性・再発寛解型 EAE)
に対する予防効果の研究 71
埼玉医科大学総合医療センター神経内科
野村 恭一、他

炎症性脱髄の異なる側面からの解析

24. 多発性硬化症脱髄巢反応性アストロサイトにおける
14-3-3 蛋白質各アイソフォームの発現 75
国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部
山村 隆、他
25. 炎症性脱髄における神経細胞変性 79
名古屋大学環境医学研究所神経免疫
錫村 明生、他
26. ウイルス性脱髄モデルを用いた脱髄関連遺伝子の探索 81
金沢医科大学微生物学
大原 義朗、他

ADEMと脊髄炎

27. 多発性硬化症の急性期にIVIgが著効した症例 83
徳島大学医学部附属病院神経内科
梶 龍兒、他

28.	小児急性散在性脳脊髄炎およびその類縁疾患に関する疫学的研究	86
	九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野小児科学 原 寿郎、他	
29.	急性散在性脳脊髄炎における髄液中サイトカインの検討	90
	山口大学医学部生殖・発達・感染医科学 古川 漸、他	
30.	アトピー性脊髄炎と寄生虫性脊髄炎における免疫動態の差異	93
	九州大学病院神経内科 村井 弘之、他	
HAMの病態		
31.	HAM/TSP 発症を規定するウイルス因子、宿主因子と病態への作用機構	96
	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科神経内科・老年病学 納 光弘、他	
32.	HTLV-I 関連脊髄症での IFN- γ 発現亢進における p38 MAP kinase 系の関与	98
	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科感染分子病態学 中村 龍文、他	
33.	HAM 患者における CD4+CD25+制御性 T 細胞の異常	101
	鹿児島大学医学部難治ウイルス病態制御研究センター 出雲 周二、他	
34.	HAM 患者における EB ウイルスの慢性活動性持続感染の影響	105
	鹿児島大学医学部難治ウイルス病態制御研究センター 出雲 周二、他	
MG の臨床		
35.	重症筋無力症全国臨床調査	108
	九州大学病院神経内科 村井 弘之、他	
36.	長野県における高齢発症の重症筋無力症患者の臨床疫学的検討	111
	信州大学医学部第三内科 池田 修一、他	
37.	Seronegative MG における神経筋伝達障害に関する研究	114
	千葉大学医学部附属病院神経内科 桑原 聡、他	
38.	抗 MuSK 抗体陽性重症筋無力症患者 IgG が神経筋伝達を阻害する機序の解析	116
	国立病院機構川棚病院神経内科 松尾 秀徳、他	

MG の治療薬

39. 金沢大学神経内科における重症筋無力症治療のレトロスペクティブ・スタディ
ーステロイド減量経過を中心にー..... 118
金沢大学保健管理センター
吉川 弘明、他
40. 胸腺腫に対するステロイドパルス療法メカニズム解析..... 121
名古屋市立大学大学院医学研究科腫瘍・免疫外科学
藤井 義敬、他
41. 骨格筋培養細胞のアセチルコリンに対する細胞内カルシウム濃度変化と
免疫抑制薬の影響..... 124
金沢大学保健管理センター
吉川 弘明、他

MG の免疫学

42. 重症筋無力症のケモカインシグナル異常..... 127
東北大学大学院医学系研究科神経内科学
糸山 泰人、他
43. コンプリメンタリーペプチドモノクローナル抗体による重症筋無力症患者血清中の
idiotype 抗体の測定..... 130
鳥取大学医学部附属脳幹性疾患研究施設脳神経内科
荒賀 茂、他
44. Myoid cell 感作リンパ球を用いた胸腺胚中心形成機序の解析..... 132
国立病院機構川棚病院神経内科
松尾 秀徳、他

GBS の新しい標的抗原

45. 軸索型ギラン・バレー症候群における *Campylobacter jejuni* 由来 Dps タンパクの意義..... 134
九州大学病院神経内科
村井 弘之、他
46. ギラン・バレー症候群患者の髄液中に検出される抗ヘリコバクターピロリ空胞化毒素抗体の
臨床的意義とその標的分子の検索..... 136
札幌医科大学医学部神経内科
松本 博之、他
47. Guillain-Barré 症候群のあらたな標的抗原としてのガングリオシド複合抗原..... 139
近畿大学医学部神経内科
楠 進、他

Fisher 症候群・Bickerstaff 脳幹脳炎の臨床

48. Fisher 症候群に対する免疫グロブリン療法に関する研究..... 142
千葉大学医学部附属病院神経内科
桑原 聡、他

49. Bickerstaff 脳幹脳炎 62 症例の臨床像の解析.....	144
独協医科大学神経内科	
結城 伸泰、他	

GBSの動物モデル

50. 肺炎マイコプラズマ菌体脂質成分を接種したウサギ血中抗体の反応性の検討.....	148
近畿大学医学部神経内科	
楠 進、他	

51. Lewis rat EAN に対する FK506 の投与効果.....	151
北里大学医療衛生学部リハビリテーション科	
斎藤 豊和、他	

CIDPの免疫病態の解析

52. CIDP の髄液サイトカイン動態の解析.....	155
九州大学病院神経内科	
村井 弘之、他	

53. CIDP に対する免疫グロブリン療法の反応性に関わる遺伝子的背景の検索.....	158
名古屋大学大学院医学系研究科脳神経病態制御学	
祖父江 元、他	

54. 慢性炎症性脱髄性多発神経炎(CIDP)の骨格筋変化に関する免疫組織学的検討.....	160
東京大学医学部附属病院神経内科	
清水 潤、他	

CIDPの治療

55. シクロスポリン A を用いた難治性 CIDP の治療経験.....	162
独協医科大学神経内科	
結城 伸泰、他	

56. 慢性炎症性脱髄性多発根ニューロパチーにおける併用強化療法に関する研究.....	166
広島大学医学部・歯学部附属病院脳神経内科	
郡山 達男、他	

57. 抗 MAG/ SGPG IgM 抗体陽性の難治性慢性炎症性脱髄性多発根神経炎(CIDP)に対する rituximab の使用経験.....	169
信州大学医学部第三内科	
池田 修一、他	

その他の末梢神経疾患

58. Crow-Fukase 症候群の診断基準の作成.....	172
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科神経内科・老年病学	
納 光弘、他	

59. 明らかな伝導ブロックを認めない多巣性ニューロパシーと ALS との新しい鑑別法 — 脊髄根磁気刺激による疲労試験の検討 —	174
徳島大学医学部附属病院神経内科 梶 龍兒、他	
その他の重要な免疫性神経疾患	
60. 神経 Sweet 病の臨床的特徴と診断基準	176
国立病院機構宮城病院臨床研究部 久永 欣哉、他	
61. 傍腫瘍性神経症候群に関連する抗原の分子機構に関する研究	180
金沢医科大学神経内科 酒井 宏一郎、他	
62. 各種自己免疫性脳症における抗神経抗体の検索	183
福井大学医学部第二内科 米田 誠、他	
63. 封入体筋炎(IBM)と C 型肝炎ウイルス(HCV)の関連に関する検討	185
東京大学医学部附属病院神経内科 清水 潤、他	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	189

I. 總 括 研 究 報 告

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

総括研究報告

免疫性神経疾患に関する調査研究

主任研究者 吉良 潤一 九州大学大学院医学研究院附属脳神経病研究施設神経内科

研究要旨

本年度は研究班の2年次である。研究班では全国臨床調査に関する2回目のワークショップを開催した。この中で、多発性硬化症(MS)の全国調査を15年ぶりに行うことを決め、一次調査を実施した。この結果を受けて二次調査を3年次に行う予定である。今回は従来調査されたことのないMRIとインタフェロンベータに対する反応性の調査項目を加え、またMRI所見も含めた病型調査を実施する。重症筋無力症(MG)についてもワーキンググループを結成し、全国調査の方法について検討を行った。さらに、フロウ・フカセ症候群の新診断基準を作成し、全国調査を開始した。研究においては以下の重要な成果があがった。(1)少量の髄液を用いて16項目のサイトカインを同時に測定することが可能となり、フローサイトメトリー法による髄液細胞の細胞内サイトカイン産生能の測定と併せ、MSでは髄液と末梢血とで免疫動態が異なることが明らかにされた。特に視神経脊髓型(OS-MS)では、髄液でTh1サイトカインの産生亢進に加えてIL-8、IL-17、MIP1 β のような好中球の走化性因子の産生が高まっていることが初めて示された。(2)通常型MSの新たな感受性遺伝子としてplatelet-activating factor (PAF) receptorのシグナル伝達を阻害する変異が(A224D)が同定された。(3)MSの病巣に新しい調節性T細胞Va7.2-Ja33T cellが集積していることが示された。(4)ギラン・バレー症候群(GBS)で*Campylobacter jejuni*由来Dps蛋白が本菌感染後GBS患者で特異的にみられ、このDps蛋白はsulfatideを受容体としてニューロンを傷害することが示された。さらに脱髄型GBS患者髄液では*Helicobacter pylori*のVacA蛋白に対する抗体が高率に検出されること示され、GBSの新しい責任抗原の解析が大きく進展した。(5)HAM患者でCD4+CD25+抑制性T細胞の機能異常が存在することが初めて示された。さらにその遺伝的背景として、HLA-A2、HLA-DRB1*0101に加えて、MMP-9 promoter d(CA)n repeatの延長、Aggrecan VNTR 1630bp アレル、TNF α -863A多型がHAM発症の危険率を上げ、SDF-1-801A3' UTR、IL-10-529A、Vitamin D receptor exon 9 ApaI、IL-10-529AはHAM発症危険率を下げる事が判明した。(6)MGの胸腺摘出により末梢血CD4陽性T細胞のTh1/Th2バランスが正常化することが見出された。2年次の成果として、神経免疫疾患のサイトカイン・ケモカインの解析が末梢血のみならず髄液においても進展し、その免疫動態がより明瞭になったことが特筆される。

分担研究者

糸山泰人（東北大学大学院医学研究科神経科学講座神経内科学：教授），納 光弘（鹿児島大学大学院医歯学総合研究科神経内科・老年病学：教授），齋田孝彦（国立療養所宇多野病院：院長），田平 武（国立療養所中部病院長寿医療研究センター：センター長），荒賀 茂（鳥取大学医学部附属脳幹性疾患研究施設脳神経内科：助教授），池田修一（信州大学医学部第三内科：教授），出雲周二（鹿児島大学医学部附属難治性ウイルス疾患研究センター分子病理遺伝子疫学研究分野：教授），太田宏平（東京理科大学理学部教養：教授），大原義朗（金沢医科大学微生物学：教授），梶 龍兒（徳島大学医学部附属病院神経内科：教授），神田 隆（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科脳神経機能病態学：助教授），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：助手），楠 進（近畿大学医学部神経内科：教授），桑原 聡（千葉大学医学部附属病院神経内科：講師），高 昌星（信州大学医学部保健学科生体情報検査学：教授），郡山達男（広島大学医学部・歯学部附属病院脳神経内科：講師），斎藤豊和（北里大学医療衛生学部リハビリテーション科：教授），酒井宏一郎（金沢医科大学神経内科：助教授），清水 潤（東京大学医学部附属病院神経内科：助手），錫村明生（名古屋大学環境医学研究所神経免疫：教授），祖父江元（名古屋大学大学院医学研究科脳神経病態制御学：教授），田中恵子（新潟大学脳研究所神経内科学：助教授），中村龍文（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科感染分子病態学：助教授），野村恭一（埼玉医科大学神経内科学：助教授），原 寿郎（九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野小児科学：教授），原 英夫（国立長寿医療研究センター：室長），久永欣哉（国立療養所宮城病院臨床研究部：臨床研究部長），藤井義敬（名古屋市立大学大学院医学

研究科腫瘍・免疫外科学：教授），古川 漸（山口大学医学部生殖・発達・感染医科学：教授），松井 真（国立療養所宇多野病院臨床研究部：免疫研究室長），松尾秀徳（国立療養所川棚病院神経内科：臨床研究部長），松本博之（札幌医科大学医学部神経内科：教授），村井弘之（九州大学病院神経内科：助手），山村 隆（国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部：部長），結城伸泰（獨協医科大学神経内科：助教授），吉川弘明（金沢大学保健管理センター：助教授），米田 誠（福井大学医学部第二内科：講師）

A. 研究目的

本研究の目的は、本研究班の7指定対象疾患である多発性硬化症(MS)、重症筋無力症(MG)、ギラン・バレー症候群(GBS)、フィッシャー症候群(FS)、慢性炎症性脱髄性多発神経炎(CIDP)、ルイス・サムナー症候群、クロウ・フカセ症候群ならびにその他の免疫性神経疾患について、全国的な調査研究班を組織して、1)疫学的特徴、臨床像、免疫遺伝学的背景、現状の治療成績を明らかにすること、2)全国調査結果の分析から発症機序を解明すること、3)発症機序に基づいた画期的な新治療法を開発すること、および4)発症予防法を発見することである。

B. 研究方法、研究結果、ならびに考察

研究全般を通して倫理的課題については班員所属施設の倫理委員会・遺伝子解析倫理委員会の承諾を得るよう徹底した。研究対象者に対する不利益や危険性を排除し研究に際してのインフォームドコンセントを取るよう特に留意した。動物実験に関しては各施設の動物実験の指針を遵守するようにした。

1) 多発性硬化症(MS)

全国調査

吉良(九大)は、MS ワーキンググループを組織し、15年ぶりの全国臨床調査を立案した。一次調査を開始し2年次に終了する予定である。一次調査の結果を受けて3年次に二次調査を実施する予定である。今回の臨床調査では、調査項目にMRI所見、IFN- β に対する反応性、臨床病型、末梢神経障害やSjögren症候群などの合併症を加えた点に特徴がある。これにより日本人MSの病型の変化や治療反応性の特徴などが明らかになり、日本人の実情に応じたよりよい診断基準や治療ガイドラインの策定に有用なデータが得られると期待される。菊地(北大)は、日本人MSでは初めてのQOL調査の実施に向けた質的検討を始めた。日本人MSに最適なQOL評価尺度として何を採用するかが最も重要な問題点であることが示された。

臨床像

齋田(宇多野病院)は、1970年代以降生まれの日本人では、脳MRI上の病巣体積が増大していることを明らかにし、OS-MSに対するC-MSの比率が著しく増加していることを示した。菊地(北大)は、脊髄とともに大脳にも破壊性の病巣を伴うMSの存在を明らかにし、MSの病型分類に新たに再発の激しさを加味することを提唱した。

画像診断

齋田(宇多野病院)は、多数例のMS患者のMRI所見の解析に基づき、大脳及び小脳の病巣体積が若年者のMSで著しく増大していることを明らかにした。田中(新潟大学)は、MRI拡散強調画像の拡散テンソル画像を用いて、独自に開発したラムダ・チャート法により大脳白質に加えて大脳皮質においても障害が存在することを明らかにした。このような大脳皮質の変化は、二次性慢性進行型MSのみならず再発寛解型MSにおいても存在することを初めて示した。太田(東京理科大)は、MS

の大脳白質の1H-MRS解析により、病巣のみならずnormal appearing white matter (NAWM)でもNAA/Cr比の低下がみられることから軸索小ギアが広汎に生じている可能性を報告した。

MSの治療

吉良(九大)は、MSのIFN β 投与開始前から開始後48週まで末梢血リンパ球の細胞内サイトカイン産生能を追跡し、投与開始1週後からTh1シフトが生じ、48週後まで持続することを明らかにした。なかでもIFN β 投与時に再発のない群では、投与24週以降に有意なIFN γ の産生低下が見られる一方、再発有りの群では、IFN γ の低下が見られず、しかも投与1週間以降にIL-13の有意な増加が見られることを明らかにした。さらにOS-MSはC-MSよりIFN β 投与後も有意に再発が多く、かつ投与24週以降のIFN γ の有意な低下がみられないことを証明した。太田(東京理科大)は、IFN β 治療によりMSの白質のNAA/Cr比が上昇し索障害の改善がみられることを示した。さらにIFN β 投与前後で継時的にIL-2培養後NK細胞、CD3+CD56+細胞、 $\gamma\delta$ T細胞および細胞障害活性を測定し、これらが投与開始1年後に有意に低下することを見出した。

免疫遺伝学的背景

吉良(九大)は、OS-MSではplatelet-activating factor (PAF)の分解をするPAF acetylhydrolase(PAF-AH)を不活性化する変異(G994T)が有意に高率であるのに対して、C-MSではPAF receptor (PAFR)の伝達を阻害する遺伝子変異(A224D)の頻度が有意に高いことを見出した。このことはOS-MSではPAF-AH不活化変異によりPAFの不活化が遅れることでPAFによる血管透過性亢進や炎症細胞の動員が高まることで疾患の病態に重要である一方、C-MSではPAFの作用が阻害されることでTh2細胞の機能が抑えられる方向に傾くことが、疾患感受性を高めることを示唆している。

末梢血免疫動態

松井(宇多野病院)は、末梢血細胞内サイトカインの解析により一次性進行型 MS では IL-4+CD4+ T cell とともに TNF- α +CD4+ T cell の増加がみられる点が再発寛解型や二次性進行型とは異なることを明らかにした。さらに RT-PCR により末梢血では IL-4 message は MS 回復期にのみ検出され活動期にはみとめられないことから、疾患活動性と関連する可能性を指摘した。山村(精神・神経センター)は MS の脳病巣と末梢血の PCR-SSCP 法により、新しい調節性 T 細胞 V α 7.2-J α 33T cell が MS の脳病巣に集積していることを初めて明らかにした。

血液脳関門

郡山(広島大)は、血管内皮細胞接着分子である vascular endothelial cadherin (VE-cadherin)及び hepatocyte growth factor (HGF)を MS 患者及び健常者の血清で測定し、両者の濃度が相関する傾向にあることから、血清 VE-cadherin は血管内皮細胞の再生にもとづく血液脳関門の修復を反映している可能性を指摘した。神田(東京医科歯科大)は、ヒト脳毛細血管由来内皮細胞を単層培養し、リンパ球の migration を蛍光色素で標識して検索した。CCR4 陽性細胞(Th2)は CXCR3 陽性細胞(Th1)より有意に多く培養血管内皮細胞表面にとどまり、かつその下にもぐり込んでいることを明らかにした。TNF- α を加えて刺激すると CCR4 陽性細胞の migration が増加することを示した。さらに E-セレクトインに対する siRNA を培養血管内皮細胞に導入することで、強制発現させた E-セレクトインや IL-1b で誘導される内因性 E-セレクトインの発現が著明に抑制されることを見出し、このような接着因子に対する siRNA が有効な遺伝子治療手段になり得ることを示した。

髄液免疫動態

菊地(北海道大)は、MS 髄液中の osteopontin を ELISA 法により測定し、再発寛解型 MS はそ

他の神経疾患や二次性進行型 MS より有意に高値であることを示した。このことは osteopontin が炎症性サイトカインとして働いていることを示唆する。糸山(東北大)は、髄液の Th1/Th2 バランスの新たなマーカーとして sCD26(Th1 細胞に発現)/sCD30(Th2 細胞に発現)比を測定したところ、OS-MS と C-MS で有意な差はなかった。また髄液中の新たな疾患マーカーを検索する目的で 100kDa 以下の蛋白質をプロテインチップで解析した。MS 髄液ではアルブミン、B2 ミクログロブリンに加えていくつかのピークが増加していることを明らかにした。今後増加しているピークが何か解析が進められる予定である。

吉良(九大)は、蛍光ビーズサスペンションアレイシステムにより少量の髄液中の 16 種のサイトカインの同時測定に成功した。その結果、OS-MS はその他の神経疾患(脊髄小脳変性症)に比して、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-10、TNF- α 、IL-17、MIP-1 β が有意に高値であった。一方、C-MS は IFN- γ 、IL-4、IL-8、IL-10、TNF- α 、IL-17 が有意に高値であった。OS-MS では、特に IL-8、IL-17、MIP-1 β のような好中球の活性化と局所動員に寄与するサイトカインが高い傾向にあり、OS-MS では顆粒球系の活性化が起りやすく、それが組織の高度破壊に関与していることが示唆された。また OS-MS では C-MS に比して有意に IL-5 が高く、好酸球の動員や活性化の可能性も考えられた。田平(長寿医療センター)も同様な方法により髄液で 10 種類のサイトカインの同時測定を行い、MS で IL-6 がその他の神経疾患に比し有意に上昇していることを報告した。さらに吉良(九大)は、髄液中の CD4 陽性 T 細胞内サイトカイン産生を測定し、MS ではその他の非炎症性神経疾患(OND)に比して髄液中の IFN- γ +IL-4 細胞%が有意に高値であり、その程度は OS-MS と C-MS との間では差がなく、いずれも再発期には Th1 シフトしていることが明らかとなった。

MS の基礎的研究

酒井(金沢医大)は、MBP ペプチド 87-99 とその altered peptide ligand を用いて SJL/J マウスを感作し、T 細胞クローンを樹立した。それらのクローンの抗原ペプチドに対する増殖応答やそれらを用いた受身移入実験により、87-99 は脳炎惹起能があるが、87-98 には脳炎惹起能はなかった。かつ altered peptide ligand による脳炎惹起能の検討結果より、87-99 で感作した場合は、90F、92N、95T を認識する T 細胞クローンが優位になることを明らかにした。高(信州大)は、抗体を IgM から IgG や IgE、IgA にクラススイッチするうえで重要な役割を担っている activation-induced deaminase (AID) のノックアウトマウスで myelin-oligodendrocyte glycoprotein (MOG) による実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)の誘導を検討し、AID ノックアウトマウスでも同様に EAE が誘導されることを示した。このことは本モデルでは MOG に対する IgG クラスの抗体は EAE に寄与しないことを指し示している。

原(国立長寿医療センター)は、MOG ペプチドによるマウスの EAE の系で感作 7 日目に一回 astrocyte-derived immune suppressor factor (AdIF)を投与することで EAE が緩和されることを示した。これは MS の新しい治療薬の可能性を拓くものといえる。野村(埼玉医大)は、MOG によるマウス EAE の系にアストロサイト機能改善薬 ONO-2506 を投与し、EAE が軽減することを示した。本剤はアストロサイトの活性化(astrogliosis)を押さえることで治療効果を発揮しているものと考えられた。

山村(精神・神経センター)は、MS 剖検脳で 14-3-3 蛋白の発現が MS 脱髄病巣の反応性アストロサイトで亢進していることを明らかにした。Isoform では特にεの発現が高度であった。また培養アストロサイトでも血清の添加により著明に発現が増加することを示した。この結果、14-3-3

はアストロサイトの増殖シグナルに関与している可能性が示唆された。

錫村(名古屋大環境研)は、培養ミクログリアを炎症性サイトカインで活性化した際のニューロン障害について検討した。IFN-γ添加により活性化ミクログリアは dendrite をまず障害し、著明な dendritic beading の形成を起こすことを明らかにした。大原(金沢医大)は、Theiler ウイルスによる脱髄モデルで L*蛋白と相互作用する蛋白の探索を bacterial two hybrid system で進めている。L*蛋白は apoptosis-inducing sequence と相互作用し、宿主のアポトーシスを抑制する。今後、L*蛋白と相互作用する蛋白が解明され、その持続感染機構と脱髄誘導機構の解明が進むことが期待される。

急性散在性脳脊髄炎・アトピー性脊髄炎

原(九大)は、福岡県内の小児科を対象として小児の急性散在性脳脊髄炎(ADEM)の臨床調査を実施した。その結果、小児 ADEM は 10 万人あたり 0.64 人の有病率であり、一方、小児 MS は 10 万人あたり 0.16 の有病率であった。73%は感染後性、15%はワクチン接種後性であった。男女比は 2.25 対 1 で男児に多かった。5 歳に発症のピークが見られた。日本人では発熱(71%)、痙攣(41%)の頻度が高かった。古川(山口大)は、ADEM 急性期の髄液サイトカインとその可溶性受容体を測定し、IL-6、IL-10、sTNFR が上昇していることを明らかにした。TNF-αは半減期が 30 分と短いため、その増加は捉えられがたかった。梶(徳島大)は、免疫グロブリン大量静注療法が奏功した ADEM 例を報告した。

吉良(九大)は、非圧迫性ミエロパチー連続 108 例の臨床的検討を行い、アトピー性脊髄炎が 30%、寄生虫性脊髄炎が 5%を占めることを明らかにした。両者の髄液細胞内及び上清のサイトカインを測定した。細胞内サイトカイン産生については、寄生虫性では IFN-γ-IL-4+CD4+T 細胞%が増加

していること、一方、アトピー性脊髄炎ではむしろ IFN- γ +IL-4+CD4+T 細胞%が増加していることを発見した。さらに髄液上清のサイトカインでは、寄生虫性脊髄炎では IL-5 と IL-8 が、アトピー性脊髄炎では IFN- γ と IL-8 がその他の神経疾患より有意に上昇していることが見出された。したがって、両者の髄液腔内の免疫動態が大きく異なることが初めて明らかとなった。

2) 重症筋無力症(MG)

全国調査

村井(九大)らは、MG の臨床調査を提言した。MG の疫学調査は 1973 年と 1987 年に行われているが、特定疾患医療受給者証交付者数は 1987 年から現在までの間に倍以上に増加している。また、欧米人に比べアジア人種で多いといわれている小児 MG の有病率や病型・治療・予後などはまだ十分に調べられていない。成人の MG に関しては、非胸腺腫 MG や抗 AChR 抗体陰性 MG にも胸腺摘出術が有効であるか否かの評価が待たれている。今回の臨床調査では、成人及び小児の現時点における有病率を調査すること、小児 MG の病型・治療・予後を調査すること、胸腺摘出術の術式・病型・予後を調査することを目的とする。

MG の臨床

池田(信州大)は長野県における 28 年間の MG 発症患者の発症率の変化、胸腺摘出術の効果について調査した。その結果、発症率は高齢群・若年群ともに増加していたが、特に高齢群で顕著であり、高齢発症 MG が増加していることが示唆された。また、高齢者でも胸腺摘出術は有効であることが示された。桑原(千葉大)は、Seronegative MG における単一筋線維筋電図を行ったところ、抗 AChR 抗体陽性群に比較して異常が軽度であったことより、アセチルコリン受容体を介する神経筋伝達は比較的保たれており、その後の興奮収縮連関の異常を合併していると考えられた。松尾(川棚病院)は、抗 MuSK 抗体陽性 MG では EPP quantal

content が低下する例があること、発症機序に補体の関与がなさそうであることを見いだした。

MG の治療薬

吉川(金沢大)は MG における副腎皮質ステロイド薬による治療効果を retrospective に調査し、長期的には眼筋型も全身型も使用量に差がないこと、胸腺腫合併例で長期的にステロイド剤の減量が困難であることを報告した。藤井(名古屋市大)は fetal thymus organ culture の技術をヒトで応用し、胸腺腫を副腎皮質ステロイドとともに培養することにより、腫瘍細胞・リンパ球の両者がアポトーシスに陥ることを示した。また、吉川(金沢大)は、抗 AChR 抗体の測定キットに使用されている培養細胞 TE671/RD を使用し、アセチルコリン添加後の細胞内カルシウム $[Ca^{2+}]$ を調べた。 $[Ca^{2+}]$ 変化は同時発現しているムスカリン性 AChR を介すること、リアノジン、FK506 の添加では $[Ca^{2+}]$ は上昇するが、cyclosporin A では変化がないことを明らかにした。

MG の免疫学

糸山(東北大)は胸腺摘出前後での末梢リンパ球のケモカイン受容体発現の変化、正常胸腺と MG 胸腺のケモカイン発現の差を検討した。末梢血 CD4 陽性 T 細胞の Th1/Th2 バランスが胸腺摘出後に正常化したこと、過形成胸腺ではリンパ球ホーミングに必須のケモカイン CCL21 の発現が著明に高く、杯中心の形成に重要な役割を演ずることが示された。荒賀(鳥取大)は AChR α subunit の 61-76 のコンプリメンタリーペプチドに対するモノクローナル抗体 KM02 を用いて MG 患者の自己抗体の測定を行ったところ、seropositive MG の 1/3 で陽性であり、seronegative MG では全例陰性であったことを報告した。松尾(川棚病院)は myoid cell 感作リンパ球を活性化後に cyclosporin A や抗 AChR 抗体で修飾したラットに passive transfer したが、杯中心の形成は見られなかったことより、MG の胸腺過形成の発症機序には、AChR 反応性 T

細胞のみならず、胸腺内でのトリガーが必要であることが示唆された。

3) 免疫性末梢神経障害

ギラン・バレー症候群(GBS)・フィッシャー症候群(FS)

GBSの新しい標的抗原: 村井(九大)、吉良(九大)は、GBSの先行感染症である *Campylobacter jejuni* 由来 Dps 蛋白に対する抗体が同細菌を先行感染症とする GBS 患者で特異的に陽性になることを発見し、同蛋白の作用を検討した。リコンビナント Dps 蛋白は中枢神経では脊髄前角運動ニューロンなどのニューロンの胞体に、末梢神経では髄鞘に特異的に結合することを見出した。Dps 蛋白と各種糖脂質との結合を検索したところ、Dps 蛋白が sulfatide を受容体として神経系と結合することを初めて明らかにした。ニューロンに分化させた培養 PC12 細胞にも Dps 蛋白は結合し、濃度依存性に細胞膜を障害する(培養上清中に LDH の遊離が起こる)ことを示した。このことは Dps 蛋白自体または、Dps 蛋白に対する免疫応答が運動ニューロン軸索障害に関与することを強く示唆する。松本(札幌医大)は、脱髄型 GBS の髄液中で *Helicobacter pylori* の VacA(空胞化毒素)に対する抗体が検出されることを見出した。さらに VacA がヒト Na·K ATPase α subunit および ミエリン P0 蛋白と分子相同性を有することを初めて明らかにした。このことは脱髄型 GBS の一部で *Helicobacter pylori* に対する抗体が分子相同性機序を介して髄鞘を障害する可能性を示唆する。

楠(近畿大)は、GBS 患者血清中に GD1a、GD1b 単独よりも両者が混在した状態で生じる複合抗原により強い親和性を有する抗ガングリオシド抗体の存在を初めて証明した。したがって、抗ガングリオシド抗体の抗原として複数のガングリオシドの複合体が重要であることが明らかとなった。

FS・Bickerstaff 脳幹脳炎の臨床: 桑原(千葉大)は、多数例の FS に対する免疫療法の効果を検討した。保存的治療法では平均 7 ヶ月で複視が、1.5 ヶ月で運動失調が消失した。血液浄化療法は保存的治療法と有意な差はなかったが、免疫グロブリン静注療法では改善開始までの期間が有意に短かった。このことは FS における免疫グロブリン静注療法の有用性を指示する。結城(独協医大)は、多数例の Bickerstaff 脳幹脳炎の臨床像を検討し、本症の疾患概念を明らかにした。本症では軸索型 GBS とオーバーラップする症例の存在も示された。

GBSの動物モデル: 楠(近畿大)は、培養肺炎マイコプラズマ(*mycoplasma pneumoniae*)から抽出した糖脂質でウサギを免疫した。6羽全てで抗 Gal·C IgG 抗体の上昇がみられ、1羽では横断性脊髄炎を発症した。したがって、肺炎マイコプラズマ感染後に脱髄性ニューロパチーや脊髄炎の発症にはこのような抗 Gal·C 抗体の誘導が関わっているものと考えられた。斉藤(北里大)は、Lewis rat を牛末梢神経髄鞘抗原で感作した実験的アレルギー神経炎において FK506 の効果を検証した。本剤を感作と同時に 3日間投与した場合では重症度が有意に軽減した。さらに運動障害のピークから 3日間投与した場合でも重症度の改善が早まった。この結果は、GBS や CIDP で FK506 が有用である可能性を示唆する。

慢性炎症性脱髄性多発神経炎(CIDP)

CIDPの免疫学的側面: 村井(九大)、吉良(九大)は、CIDP の髄液細胞の細胞内サイトカインの測定に初めて成功した。CIDP の髄液細胞では IFN- γ +IL-4-CD4+T 細胞がその他の神経疾患より有意に上昇していた。一方、血管炎による多発単神経炎ではそのような有意な変化はみられなかった。しかも、CIDP のうち免疫グロブリンに反応する responder で non-responder より IFN- γ +IL-4-CD4+T 細胞%が有意に高値であった。

したがって、この細胞%が治療反応性のマーカーとなる可能性がある。祖父江(名大)は、CIDPのうち免疫グロブリンに対する responder と non-responder で臨床像の差異を検討した。反応群は、非反応群より運動神経伝導速度の低下や遠位潜時の延長が高度であった。一方、非反応群では複合活動電位の低下が顕著であった。このことは IVIG 療法が、電気生理学的に脱髄主体例ではより有効であり、軸索障害が目立つ例では有効性に乏しいことを示唆する。さらに生検腓腹神経組織の遺伝子発現の差異をマイクロアレイにより解析し、TNF- α が non-responder で高値であることを見出した。清水(東大)は、CIDP の筋肉組織について検討を加えた。CIDP の非壊死性筋線維では HLA-A、B、C および HLA-DR の異所性発現が認められ、筋肉自体への免疫学的機序による作用も起こっていることが示唆された。

CIDP の治療： 結城(独協医大)は、難治性 CIDP 8 例にシクロスポリン(CyA)療法を施行し6例で有効であったことを報告した。当班一年次の池田(信州大)の報告とも一致する成績で、CyA 療法は難治性の CIDP に対して有効性が期待できる治療法であることがより確実となった。郡山(広島大)は、CIDP 6 例に免疫吸着療法後に、ステロイドパルス療法さらに免疫グロブリン大量静注療法を併用することで5例に速やかに寛解導入がなされたことを報告した。池田(信州大)は、抗 MAG/SGPG 抗体陽性の難治性 CIDP に対して rituximab(抗 CD20 抗体)の投与を行い有効であったことを報告した。

多巣性運動ニューロパチー(MMN)： 梶(徳島大)は、伝導ブロックの明らかでない MMN と筋萎縮性側索硬化症(ALS)を鑑別する新たな電気生理学的方法を考案した。即ち 60 秒間の最大随意収縮の前後で継時的に頸髄神経根の磁気刺激を行い(fatigue test)、MMN では ALS と比べて有意に運動後の伝導速度遅延や cMAP の持続時間の延長

が認められた。本法は安全で短時間に施行できる有用な検査法と考えられた。

クロー・フカセ症候群： 納(鹿児島大)は、クロー・フカセ症候群の臨床像を解析し、日本人の実態に対応した新たな診断基準を策定した。日本人では血清 M 蛋白陰性例が約 25%を占めることより、本項目は必須とせず、小基準の一つとした点に特徴がある。この新たな診断基準に基づいて3年次に特定疾患の疫学に関する研究班と共同して全国臨床調査を実施する予定である。

4) HAM

納(鹿児島大)、出雲(鹿児島大)は、多数例の HAM 患者と健常キャリアーで HTLV-1 ウイルス量と遺伝的背景を解析した。末梢血の HTLV-1 プロウイルス量が 2%を越えると感度 80%、特異度 80%以上で HAM と健常キャリアーを区別できることを示した。納は、健常キャリアーでは高ウイルス量群、低ウイルス量群共に HAM 患者より HLA-A2 陽性群で約 5 倍、陰性群で約 1.5 倍 dN/dS 比(非同義アミノ酸置換/同義アミノ酸置換比)が高く、健常キャリアーでは HTLV-1 に対する強い選択圧が存在することがわかった。さらに HLA 以外の遺伝子については、MMP-9 promoter d(CA)n repeat の延長、Aggrecan VNTR 1630bp アレルおよび TNF α -863A 多型が HAM 発症の危険率を上げることが示された。また SDF-1-801A3' UTR、IL-10-529A、Vitamin D receptor exon 9 ApaI 多型が HAM 発症の危険率を下げることも明らかになった。IL-10-529A は HAM 発症危険率を下げると同時に健常キャリアーにおいて HTLV-I プロウイルス量を下げる作用も持つことも判明した。出雲は HAM 患者の CD4+CD25+抑制性 T 細胞について検討した。HAM 患者末梢血単核球を各細胞分画ごとに HTLV-1 プロウイルス量を定量的 PCR 法により測定した結果、HTLV-1 は CD4+CD25+T 細胞の大部分に感染していることが明らかとなった。さ

らに CD4+CD25+T 細胞における FoxP3 遺伝子発現は健常コントロールより低値であり、かつ CTLA-4 の発現を欠き、一方 IFN- γ や IL-12 の発現は亢進していた。したがって、HAM では CD4+CD25+抑制性 T 細胞の機能異常が存在することが示唆された。また HAM 患者では EB ウイルスの慢性活動性持続感染の頻度が高く、EB ウイルス抗体の高い群では、HTLV-1 プロウイルス量が高値であることを示した。このことより EB ウイルス慢性活動性持続感染が HAM の増悪因子になっていることが示唆された。

中村(長崎大)は、末梢血 Th1 細胞における IFN- γ 発現亢進のメカニズムを検討した。HAM 患者由来 T 細胞株では p38MAPK 系の活性化が生じていること、HAM 患者末梢血の CD4 陽性 T 細胞を p38MAPK 阻害薬で処理すると IFN- γ の産生が 25-80%抑制されることを示し、HAM 患者末梢血 Th1 細胞の spontaneous な IFN- γ 産生には p38MAPK の活性化が重要な役割を演じていることを明らかにした。

6) その他

傍腫瘍性神経症候群： 酒井(金沢医大)は、抗 Yo 抗体の抗原である pcd17 が MORF ファミリーである MRG15 と結合し、その結合を介して B-myb プロモーター活性を抑制することを明らかにした。抗 Yo 抗体を細胞内に移入すると、pcd17 によって抑制されていた B-myb プロモーター活性が回復することが示された。したがって、傍腫瘍性小脳変性症では B-myb の過剰発現が小脳神経細胞死を誘導することが示唆された。

神経 Sweet 病： 久永(国立療養所宮城病院)は、神経 Sweet 病の全国調査を行い、24 例の解析結果をまとめた。その結果、本症では HLA-Cw1 が 95%、HLA-B54 が 78%で陽性であるのが重要な特徴であることが示された。平均発症年齢は 48.9 歳(30~70 歳)であり、神経症状は皮膚症状と同時期(10 例)か、遅れて(13 例)出現し、大部分が脳炎

様症状を示した。ステロイド剤が著効を示すことが大部分であるなどの特徴が明らかとなった。したがって、本症は脳炎の重要な鑑別診断の一つと考えられた。

封入体筋炎： 清水(東大)は、封入体筋炎(IBM)46 例を対象にして、C 型肝炎ウイルスの関与を検討した。IBM の HCV 陽性率は 17.4%と脳血管障害の 7.2%より有意に高値であった。IBM 生検筋組織 7 例中 6 例で HCV の RNA が検出された。これらの成績より IBM の一部で HCV の病態への関与が示唆された。

C. 結論

本年度は、第 1 に少量の髄液を用いて 16 項目のサイトカインを同時に測定することが可能となったことがあげられる。フローサイトメトリー法による髄液細胞の細胞内サイトカイン産生能の測定と併せ、髄液と末梢血とで免疫動態の解析が大きく進展した。特に OS-MS では、髄液で Th1 サイトカインの産生亢進に加えて IL-8、IL-17、MIP1 β のような好中球の走化性因子の産生が高まっていることが明らかとなった。さらに、C-MS の新たな感受性遺伝子として platelet-activating factor (PAF) receptor のシグナル伝達を阻害する変異が(A224D)が同定された。また MS の病巣に新しい調節性 T 細胞 Va7.2-Ja33T cell が集積していることが示された。第 2 に MG では、胸腺摘出により末梢血 CD4 陽性 T 細胞の Th1/Th2 バランスが正常化することが見出された。また seronegative MG の単一線維筋電図より抗 AchR 抗体陰性群は陽性群よりアセチルコリンを介する神経筋伝達は保たれており、その後の興奮収縮連関に異常がある可能性が示された。第 3 に GBS 先行感染菌の菌体蛋白に対する免疫応答の解析が進んだことがあげられる。*Campylobacter jejuni* 由来 Dps 蛋白が本菌感染後 GBS 患者で特異的にみられ、この Dps 蛋白は sulfatide を受容体として

ニューロンを傷害することが示された。さらに脱髄型 GBS 患者髄液では *Helicobacter pylori* の VacA 蛋白に対する抗体が高率に検出されること示された。第 4 に、HAM やアトピー性脊髄炎での免疫学的な解析がさらに進展したことがあげられる。HAM では CD4+CD25+抑制性 T 細胞の機能異常が存在することが初めて示された。さらにその遺伝的背景として、HLA-A2、HLA-DRB1*0101 に加えて、MMP-9 promoter d(CA)n repeat の延長、Aggrecan VNTR 1630bp アレル、TNF α -863A 多型が HAM 発症の危険率を上げ、SDF-1 -801A3' UTR、IL-10-529A、Vitamin D receptor exon 9 ApaI、IL-10-529A は HAM 発症危険率を下げる事が判明した。アトピー性脊髄炎では髄液上清のサイトカインや細胞内サイトカインを寄生虫性脊髄炎と比較することにより、アトピー性脊髄炎の免疫動態の独自性が示されつつある。このように日本に根ざした独自の発想のに基づく研究成果が報告され、世界に向けて新しい情報を発信しつつあるといえる。

D. 健康危険情報

本年度は特に健康危険情報として報告すべきものはなかった。

E. 研究発表

各分担研究者のものは、それぞれの分担研究報告書に、全体をまとめたものは研究成果の刊行に関する一覧表に記載した。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

本年度は特になかった。

II. 分 担 研 究 報 告