

見られなかった。

2) 培養ヒト AS における NgR の発現: Western blot で、培養ヒト AS における NgR 蛋白質の発現を認めたが、IL-1 $\beta$  や TNF $\alpha$  による刺激ではその発現量は変動しなかった。また Western blot で、PI-PLC 処理 AS 培養上清中に NgR 蛋白質を確認した。しかし培養ヒト AS では免疫細胞化学的には NgR は主として細胞質に発現していた。

### 考察

既報 (Sato J et al. Neuropathol Appl Neurobiol 2002;28:95-106) に一致して、本研究では NgR の発現が神経細胞に特異的ではないことを確認した。本研究の結果は、MS 脱髄巣においては OL 上の Nogo-A と AS, MCG 上の NgR が結合し得ることを示唆している。すなわち Nogo-A/NgR を介する新しい glia-glia interaction の可能性がある。AS および MCG では免疫組織化学的には NgR coreceptor p75 の発現は見られなかったことより、AS, MCG

上の NgR は decoy receptor (non-functioning receptor) として働いている可能性がある。すなわち脱髄時に OL 細胞外に放出された Nogo-A を吸着したり、AS, MCG の増殖・肥大・活性化および炎症性 cytokine 産生を(おそらく負に)制御している可能性が示唆される (Sato J et al. J Neuropathol Exp Neurol, in press, 2005)。

### 結論

MS 脱髄巣では OL 上の Nogo-A と AS, MCG 上の NgR が結合する、新しい glia-glia interaction が成立する(図 1)。

健康危険情報 なし

### 知的財産権の出願・登録状況

特許出願中:(1) 多発性硬化症に対するインターフェロン・ベータ薬物治療の有効性予測法、(2) 多発性硬化症特異的遺伝子発現プロファイルの解析

実用新案登録: なし

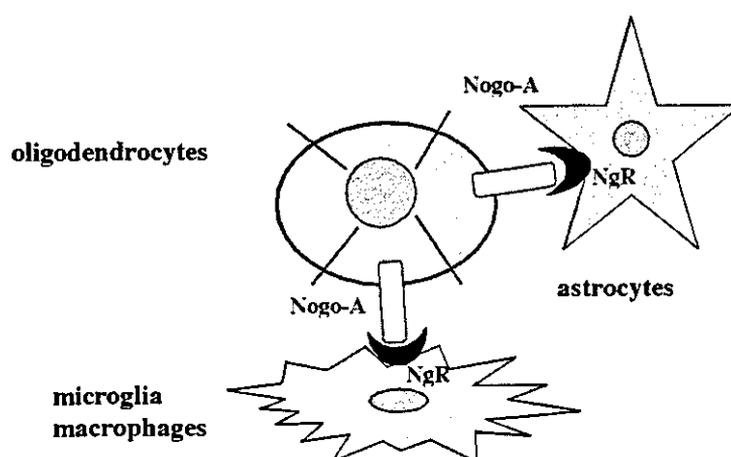


Fig. 1. A novel type of interaction between Nogo-A on oligodendrocytes and NgR on astrocytes/microglia in MS lesions.

# 共焦点レーザー顕微鏡を用いたバリアー浸潤の解析：急性期多発性硬化症患者リンパ球ではTh1細胞優位の浸潤がみられる

分担研究者 神田 隆<sup>1)</sup>

共同研究者 石橋 哲<sup>2)</sup> 山脇正永<sup>2)</sup> 沼田幸代<sup>2)</sup> 金 紅蓮<sup>2)</sup> 水澤英洋<sup>2)</sup>

## 研究要旨

共焦点レーザー顕微鏡によるpseudo 3D法を用いて、in vitroの血液脳関門モデルにおいてバリアーを越えて接着・浸潤するリンパ球の動態を解析し、急性期多発性硬化症患者から得られたリンパ球に特有の浸潤パターンを見いだした。ヒト脳毛細血管由来内皮細胞(HBMEC)は蛍光色素DiOで標識し、ヒトリンパ球は二次抗体としてTRITC標識したものをを用いた。対照成人7例から得られたリンパ球を用いた場合、侵入細胞はCCR4陽性細胞がCXCR3陽性細胞よりも優位であったが、急性期多発性硬化症患者8名から得られたリンパ球では、CCR4陽性細胞はほとんどがHBMEC表面に留まるのに対し、内皮内、または内皮直下へと浸潤するものにはCXCR3陽性細胞が多数見られた。多発性硬化症急性期の末梢血リンパ球は、CXCR3陽性のTh1細胞優位にBBB浸潤能を獲得しているものと考えられ、同細胞のBBB浸潤の選択的な阻止が多発性硬化症の有効な治療法の一つとなる可能性が示唆される。

## 研究目的

多発性硬化症をはじめとする免疫性神経疾患の成立には、血液脳関門(BBB)を越えて中枢神経内へ侵入するリンパ球が重要な役割を担っているが、BBBを越える時点でどのようなリンパ球が選択され、中枢神経内の炎症に参画するかは明らかではない。我々は平成15年度の本学会において、共焦点レーザー顕微鏡によるpseudo 3D法を用いて、BBB構成内皮細胞に対し、リンパ球が接着・浸潤する動態をin vitroで定量的に評価する方法を確立したことを報告したが、今年度は急性期多発性硬化症患者末梢血から得られたリンパ球を用い、健常者リンパ球とは異なった動態をとること明らかにしたのでその概要について報告する。

## 研究方法

Cellagen Disc(ICN, USA)上にヒト剖検脳毛細血管由来内皮細胞(HBMEC)を単層培養し、confluencyを確認した後にDiOを用いて蛍光標識した。HBMECの初代培養は68歳女性剖検例(肺癌、死後14時間)を用いた。TNF $\alpha$ (10ng/ml)で18時間刺激した後、8名の急性期多発性硬化症患者および7名の対照例から得られたリンパ球(CD4+)  $5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ /wellを播種、6時間後に4%

paraformaldehydeで固定して抗CXCR3および抗CCR4抗体を用いた免疫染色を行った。リンパ球側の染色の2次抗体にはTRITC標識したものをを用いた。赤色蛍光で標識されたリンパ球の単層HBMEC(緑色蛍光で標識)に対する位置関係をLeica社共焦点レーザー顕微鏡によるpseudo 3D再構成を用いて評価し、単層HBMEC上に接着しているリンパ球とHBMEC内および直下へと遊走しているリンパ球の割合をCXCR3陽性細胞、CCR4陽性細胞のそれぞれについて検討した。

## 研究結果

TNF $\alpha$ 非刺激の条件下では、CCR4陽性細胞、CXCR3陽性細胞ともHBMEC内・直下へ遊走しているリンパ球は殆ど認められなかった(図1)。対照例では、TNF $\alpha$ 刺激後の単層HBMECに付着するCCR4陽性細胞はCXCR3陽性細胞よりも有意に多く認められた。CXCR3陽性細胞の多くがHBMEC表面にとどまっているのに対し、CCR4陽性細胞はHBMEC下にもぐり込んでいるものが多数観察された(図2)。これに対し、急性期多発性硬化症患者から得られたリンパ球では、ほとんどのCCR4陽性細胞がHBMEC表面に留まっているのに対し、CXCR3陽性細胞の多くがHBMEC内、または直下に潜り込んでいる像が観察された。

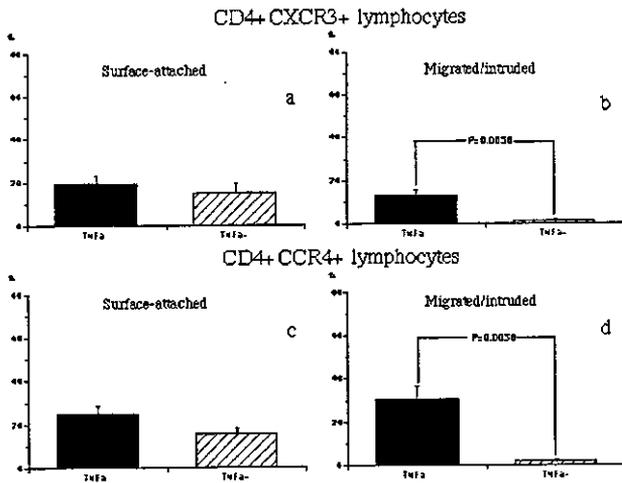
## 考察

今回我々の用いた共焦点レーザー顕微鏡によるpseudo 3D法に基づく解析は、単に内皮細胞

1) 山口大学医学部脳神経病態学

2) 東京医科歯科大学大学院脳神経機能病態学

Figure 1 Attached and Migrated lymphocytes on HBMEC monolayer in conditions with TNF $\alpha$  and without TNF $\alpha$

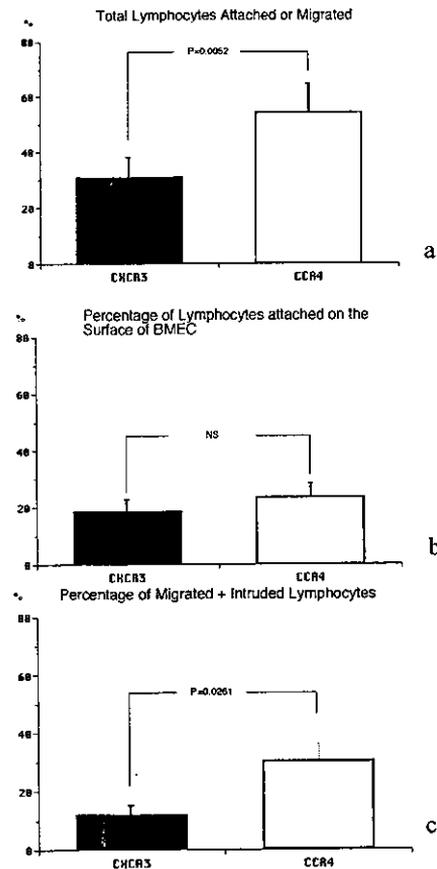


Mean percentage of CD4+CXCR3+ lymphocytes attached on the surface of BMEC monolayer (a) and migrated/intruded into BMEC monolayer (b), and that of CD4+CCR4+ lymphocytes attached (c) and migrated/intruded (d). Solid bars represent TNF $\alpha$ -stimulated conditions and hatched bars represent non-stimulated conditions. Although the number of surface-attached (non-migratory) lymphocytes did not change with or without TNF $\alpha$  stimulation (a and c), migrated or intruded lymphocytes are rarely observed in non-stimulatory conditions (c and d). Bars = SEM.

に対する親和性を検討するのみにとどまらず、リンパ球の遊走がどのサブセットを中心に起こっているかを定量的に確かめることのできる有用な手法である。Fabryらは、同一のペプチド抗原に特異的なTh1とTh2のクローンを用いてマウスの培養平滑筋細胞/周細胞と脳毛細血管由来内皮細胞を比較したところ、平滑筋細胞/周細胞はTh1を、脳毛細血管由来内皮細胞はTh2を選択的に活性化することを見いだしている。我々の結果でも、対照症例から得られたリンパ球ではTh2細胞有意のHBMEC親和性が観察されたが、多発性硬化症急性期ではこの関係が逆転し、CXCR3陽性のTh1細胞優位のBBB浸潤が確認できた。脳毛細血管由来内皮細胞の健常者末梢リンパ球に対するTh2親和性は、多発性硬化症をはじめとする中枢神経系の炎症性疾患の発症・増悪に対するBBBにおけるある種の防御機構と理解されるが、本研究で明らかになった急性期多発性硬化症患者リンパ球のTh1細胞優位の脳毛細血管由来内皮細胞下浸潤は、Th1細胞をBBBレベルで選択的にブロックすることが本症における新たな治療戦略となりうることを示したものと考えた。

今後は、①リンパ球の選択的なHBMEC接着・浸潤のdriving forceの実体を明らかにすること、②siRNA、アンチセンスヌクレオチド、モノクロナル抗体などを用いて、選択的にpathogenicなリンパ

Figure 2 Comparison of CCR4+ and CXCR3+ lymphocytes attached and migrated/intruded on TNF $\alpha$ -stimulated BMEC monolayer in normal subjects



Although no significant difference was noted between surface-attached (non-migratory) CXCR3+ lymphocytes (solid bar) and CCR4+ lymphocytes (b), mean percentages of total (a) and migrated/intruded (c) CCR4+ lymphocytes were significantly larger than those in CXCR3+ lymphocytes. Bars = SEM.

球のBBB通過を阻止する方法を開発すること等を中心に本研究を進展させる予定である。

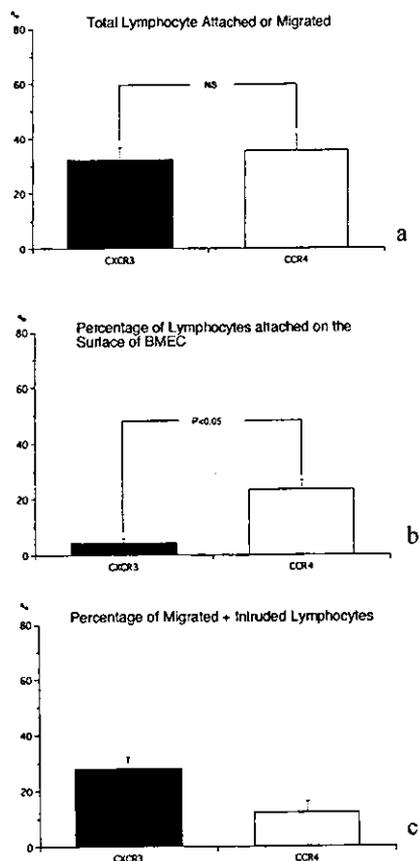
## 結論

脳毛細血管由来内皮細胞への接着・浸潤は健常者リンパ球ではTh1細胞よりもTh2細胞が優位であるが、急性期多発性硬化症患者末梢リンパ球ではこの関係が逆転し、Th2細胞は内皮細胞表面に留まることが多く、Th1細胞の内皮細胞下浸潤が優位となった。共焦点レーザー顕微鏡によるpseudo 3D法に基づく解析の有用性を明らかにした。

## 文献

- 1) Kanda T et al.: Glycosphingolipid antigens in cultured microvascular bovine brain endothelial cells: sulfo-glucuronosyl paragloboside as a target of monoclonal IgM in demyelinating neuropathy. J Cell Biol 126: 235-246, 1994.

Figure 3 Comparison of CCR4+ and CXCR3+ lymphocytes attached and migrated/intruded on TNF $\alpha$ -stimulated BMEC monolayer in multiple sclerosis patients in acute phase



Differed from normal subjects, most of the CCR4 lymphocytes stayed on the surface of BMEC (b) and many of the migrated/intruded lymphocytes are CXCR3 positive Th1 cells (c) in MS at acute phase. Bars = SEM.

## 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

- 2) Fabry Z et al. Differential activation of Th1 and Th2 CD4+ cells by murine brain microvessel endothelial cells and smooth muscle/pericytes. *J Immunol* 151:38-47, 1993.
- 3) Kanda T et al.: Anti-GM1 antibody facilitates leakage in an in vitro blood-nerve barrier model. *Neurology* 55: 585-587, 2000.
- 4) Kanda T et al.: Sera from Guillain-Barré patients enhance leakage in blood-nerve barrier model. *Neurology* 60: 301-306, 2003.
- 5) Kanda T et al.: Interleukin-1beta up-regulates the expression of sulfoglucuronosyl paragloboside, a ligand for L-selectin, in brain microvascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7897-7901, 1995.
- 6) Kanda T et al.: Glycosphingolipid composition of primary cultured human brain microvascular endothelial cells. *J Neurosci Res* 78: 141-150, 2004.

# 視神経脊髄型及び通常型多発性硬化症剖検例の病理学的比較解析

分担研究者 糸山泰人<sup>1)</sup>

共同研究者 三須建郎<sup>1)</sup>、藤原一男<sup>1)</sup>、中島一郎<sup>1)</sup>、柿田明美<sup>2)</sup>、高橋 均<sup>2)</sup>

## 研究要旨

我々は視神経脊髄型多発性硬化症(OSMS) 12例、通常型MS(CMS) 6例の剖検例を用いて脊髄標本の病理学的所見を比較解析した。CMSと異なり、OSMSでは大部分の症例で頸髄から胸髄にかけて広範な脱髄とともに組織壊死や灰白質病変が認められた。OSMSではマクロファージが主な浸潤細胞で、好中球の浸潤は1例、好酸球の浸潤は2例で見られた。OSMS全例で血管の肥厚や硝子化が見られ、高頻度にこれら異常血管周囲にIgM、IgG、C9neoの沈着が認められた。これらの所見はCMSでは低頻度だった。今回OSMSでみられた血管異常や液性因子の沈着は、Lucchinettiらも北米のNeuromyelitis opticaにおいて報告しており、CMSと異なる免疫病理所見としてOSMSの病態のみならず治療法確立の観点からも注目される。

## 研究目的

視神経脊髄型MS(OSMS)は通常型MS(CMS)と異なり比較的アジア諸国に多く、視神経と脊髄の選択的障害に加えて、脊髄病変が長く、圧倒的の女性が多く、オリゴクローナル抗体が陽性であることなどが特徴としてあげられている。<sup>1)</sup>欧米におけるNeuromyelitis optica(NMO)もOSMSと同様の臨床的特徴を有しており、最近詳細に共通の血清自己抗体(NMO-IgG)が存在することも報告されている。<sup>2)</sup>

Lucchinettiらは、NMOの病理学的特徴として、IgGやIgM、活性化補体の沈着や血管の肥厚変化や硝子化、また好中球や好酸球の浸潤が高頻度で見られることを報告しNMOの特異な病態を論じているが、

<sup>3)</sup>本邦におけるそれらの知見に関する報告はない。

今回我々は、OSMS及びCMSの剖検例における病理学的な比較解析を行った。

## 研究方法

解析に用いた剖検症例はOSMS 12例(平均59.3才、経過8.0年、

1) 東北大学神経内科

2) 新潟大学剖検研究所

女性8例 男性4例)、CMS 6例(平均36.7才、経過10.3年、女性3例 男性3例)である。各症例の脊髄標本を用いて、HE、KB、Bodian染色所見を標準し、病変分布、浸潤細胞の特徴、異常血管(血管壁の肥厚や硝子化)等を両群間で比較した。さらに免疫グロブリン(IgG、IgM)及び活性化補体(C9neo)の組織への沈着の有無を免疫組織化学的に検討した。

## 研究結果

OSMSの多くは上位頸髄から胸髄にかけて軸索障害、灰白質病変を伴う広範な脱髄所見が認められ、一部で著明な脊髄縮を伴っていた(12例中10例)。OSMSの全例で血管の肥厚や硝子化が認められた。一方CMSではそれらの血管の異常所見は概して軽度であった。

OSMSの産期の病変は、リンパ球の浸潤を認める症例は比較的少なく、マクロファージが浸潤細胞の主体であった。その他、好酸球の優位な浸潤が2例に、多核球の優位な浸潤は1例のみみられた。

免疫グロブリンのうちIgMの沈着は主にOSMSの異常血管周囲のみみられ、活動期OSMS病変の87%、CMSの14%で陽性であった。IgGもIgMと同様に血管周囲やグリアに沈着がみられ、OSMS 29%、CMS 14%であ

図 1. 血管壁の肥厚

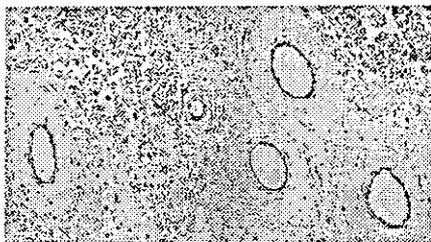


図 2. 血管壁の硝子化

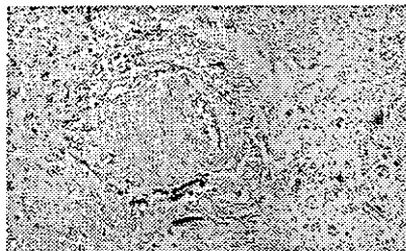


図 3. IgG の沈着

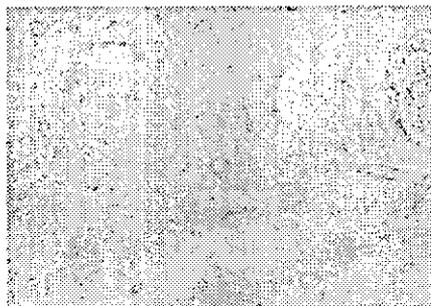


図 4. C9neo の沈着



った。補体の活性化を示すC9neoは、OSMS 86%、MS 33%とOSMSに優位に沈着しており、特に異常血管壁で強く染色された。

た血管病変(血管壁肥厚や硝子化)やその周囲への免疫グロブリンや活性化補体の沈着が有意に高頻度で認められた。

### 考察

本研究よりOSMSにおいて、MDで示されたのと同様に免疫グロブリンや補体の沈着を介する血管周囲の特異な免疫反応がその病態に関与する可能性が示唆された。今後その機序のさらなる詳細的解析によりMSとの免疫学的相違が明確なことが期待される。また今回示された液生因子に対する知見は、OSMSで腎皮質ステロイドの大量投与療法が無効でもしばしば血漿交換療法が有効であることとの関連も考えられ、治療観点からも重要である。病変部位への浸潤細胞については、我々の検討ではMDにおける報告に比べて好酸球や好中球の検出頻度が低くOSMSに特徴的な所見とは異なっていた。病期染色方法などがこの結果の相違に関連しているかさらに検討が必要であろう。

### 文献

- 1) Misu T, et al. Pure optic-spiral form of multiple sclerosis in Japan. *Brain* 125:2460-2468, 2002.
- 2) Lennon VA, et al. Serum autoantibody marker of neuromyelitis optica : distinction from multiple sclerosis. *Lancet* 364:2106-2112, 2004.
- 3) Lucchinetti GF, et al. A role for humoral mechanisms in the pathogenesis of Devic's neuromyelitis optica. *Brain* 125:1450-1461, 2002.

### 結論

OSMSとMSの脊髄病変の病理学的比較検討を行った。OSMSはMSに比べて髄髄のみならず重度の壊死性病変、灰白質病変が特徴で、ま

### 健康情報

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

# Helicobacter pylori 感染の日本人多発性硬化症における意義

主任研究者 吉良潤一<sup>1)</sup>

共同研究者 三野原元澄<sup>1)</sup>、李巍<sup>1)</sup>、小副川学<sup>1)</sup>、石津尚明<sup>1)</sup>、村井弘之<sup>1)</sup>

## 研究要旨

本研究は、日本人多発性硬化症 (MS) における *Helicobacter pylori* (HP) 感染率を明らかとし、MS への HP 感染の意義を検討することを目的としている。MS 患者 83 名を、視神経脊髄型 MS (OS-MS) 40 名、通常型 MS (C-MS) 43 名とに分類し、健常者 55 名と共に、血清抗 HP-IgG 抗体の測定を行った結果、健常者では 45.5%、OS-MS では 45.0%、C-MS では 23.3% の陽性率であり、C-MS は健常者や OS-MS に比べ有意に陽性率が低下していた ( $p=0.041$ ,  $p=0.033$ )。また、C-MS のみにおいて EDSS は陰性群で 4.88、陽性群で 2.94 と陽性者において EDSS が低下する傾向がみられた ( $p=0.0504$ )。一方で、HP の産生する neutrophil activating protein (HP-NAP) に対する抗体の測定では、OS-MS でのみ陽性者が認められ、その陽性率は 12.5% であった。以上のことから、日本人 MS では OS-MS と C-MS の 2 つの異なる病態があり、C-MS では HP 感染自体が MS を抑制する可能性が考えられ、一方で OS-MS での好中球活性化に HP-NAP が関与する可能性が考えられた。

## 目的

*Helicobacter pylori* (HP) は、全人類の約 50% に感染が認められる。HP 感染は胃・十二指腸潰瘍、胃癌などの消化器疾患と関連し、感染胃粘膜では病理学的に胃粘膜への好中球の集積が特徴的とされる。好中球の活性化のメカニズムは、菌体由来の neutrophil activating protein (HP-NAP) による直接的機序が考えられている。

多発性硬化症 (multiple sclerosis; MS) は、主に中枢神経系の白質を侵す非化膿性炎症性脱髄性疾患であり、その発症には自己免疫機序の関与が示唆されているが、その病態は明らかではなく、これまでいくつかの病原微生物の感染との関連が報告されている。特にアジア人種に多い視神経脊髄型 MS (OS-MS) では、病巣に顕著な好中球浸潤がみられる例のあることが報告されている。そこで、本研究では日本人 MS における HP 感染率を解明するために、抗 HP 抗体、抗 HP-NAP 抗体の検討を行った。

## 方法

McDonak の診断基準により診断確実な MS 83 名、健常者 55 名。MS は Kira の診断基準により OS-MS 40 名、C-MS 43 名に分類した。平均年齢は OS-MS で 50.9 歳であり、C-MS (40.5 歳)、健常者 (43.6 歳) に比べ有意に年齢が高く ( $p=0.0005$ ,  $p=0.0333$ )、男女比は C-MS が OS-MS に比べ

有意に男性の比率が高かった ( $p=0.0064$ )。OS-MS は C-MS に比べ有意に発症年齢が高かった ( $p=0.0004$ )。最終フォローアップ時での罹病期間や expanded disability status scale (EDSS) には有意差は認められなかった。

## 抗 HP 抗体の測定

抗 HP-IgG 抗体の測定は、スマイテスト ELISA [ヘリコバクター] を用いた。血清は 201 倍希釈にて使用し、抗 HP 抗体濃度が 50U/ml 以上を陽性とした。

## 抗 HP-NAP 抗体の測定

ELISA 法により血清抗 HP-NAP-IgG 抗体の測定を行った。96 穴プレートに rHP-NAP 固相化し、一次抗体として 100 倍希釈したサンプル血清、二次抗体として 2000 倍希釈した HRP 標識抗ヒト IgG 抗体を使用した。健常者の平均値+5S.D. (0.212) を cut-off 値とした。

## 結果

### 抗 HP-IgG 抗体

健常者の抗 HP 抗体陽性率は 45.5%、OS-MS では 45.0%、C-MS では 23.3% であり (図 1)、C-MS は健常者や OS-MS に比べ有意に陽性率が低下していた ( $p=0.041$ ,  $p=0.033$ )。出生年代を 1950 年前後に分けた場合、1950 年以降生まれの陽性率は、OS-MS では 45.5%、C-MS では 16.2%、健常者では 34.4% であり、C-MS は OS-MS と比較し有意に陽性率

<sup>1)</sup> 九州大学医学部神経内科

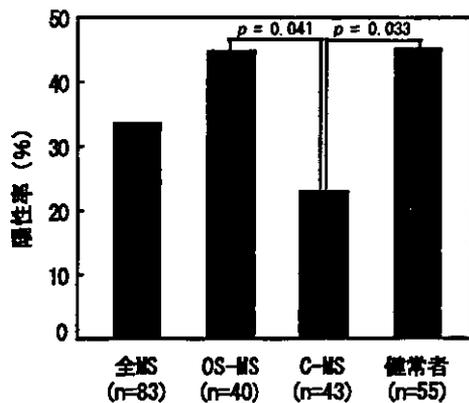


図 1 抗HP-IgG抗体陽性率

MS: multiple sclerosis, OS-MS: opticospinal MS, C-MS: conventional MS, HP: *Helicobacter pylori*, NAP: neutrophil activating protein

が低下していた ( $p=0.032$ )。抗 HP-IgG 抗体陽性例と陰性例との間で、罹病期間、発症年齢に有意差は認められなかったが、C-MS のみにおいて EDSS は陰性群で 4.88、陽性群で 2.94 と陽性者において EDSS が低下する傾向がみられた ( $p=0.0504$ )。

#### 抗 HP-NAP-IgG 抗体

OS-MS は、40 名中 5 名が陽性であり 12.5% の陽性率であったが、C-MS や健常者では認められなかった。抗 HP-NAP 抗体陽性群と陰性群において、発症年齢や総合障害度、罹病期間に有意な差は認められなかった。

#### 考察

HP 感染は、壁細胞が十分に成熟しておらず、また、免疫系の発達も不十分な乳幼児期に感染を生じると考えられている。日本における HP 感染率は、1945 年の終戦から 5 年くらいまでは上下水道をはじめとする衛生設備の普及が見られなかった時期であり、この時期までは発展途上国と同等の高い感染率が認められる。一方、それ以降の出生者では、先進国と同様に感染率は低い。今回我々は MS 患者での HP 感染率を検討し、C-MS では健常者や OS-MS に比べ感染率が低下していることを明らかにした。HP 感染のある C-MS 患者は感染のない患者と比べて、総合障害度 (EDSS) が低下する傾向にあったことは、HP 感染が C-MS の病態を抑制している可能性を示唆しているがその機序は不明である。

一方で、日本における OS-MS と C-MS の発症率を出生年別別に観察した場合、1960 年までの出生者では C-MS/OS-MS 比は 1.27~1.70 であるが、1960 年以降の出生者では 4.00

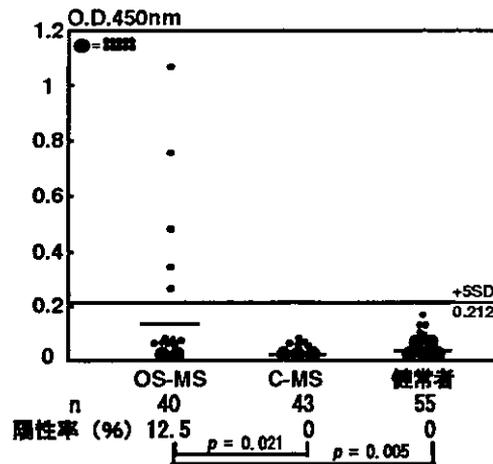


図 2 抗HP-NAP-IgG抗体

~4.67 と C-MS の割合が著明に増加している。これには戦後の復興期を経ての生活様式の近代化との関連が示唆されている。環境の近代化は HP 感染率を低下させ、このような環境が C-MS を発症をさせやすいのかもしれない。

本研究では、C-MS における HP 感染率の低下は認められたが、OS-MS ではこの傾向は認められなかった。最近我々の研究グループでは、OS-MS の病巣は C-MS と異なり好中球浸潤を認める例が多いこと、髄液 IL-17/IL-8 が OS-MS では有意に上昇していることを明らかにし、好中球の病態への関与が OS-MS では考えられるようになった。今回、HP より産生される HP-NAP に対する抗体応答の検討において、OS-MS のみで陽性者がみられた。このことは、OS-MS 患者の一部では HP-NAP に暴露されたことを意味しており、OS-MS 病態における好中球の活性化に HP-NAP が関与する可能性が示唆された。

#### 結論

日本人 MS における抗 HP 抗体、抗 HP-NAP 抗体の検討では、C-MS では抗 HP 抗体陽性率の低下が認められたが、OS-MS では認められなかった。また、抗 HP-NAP 抗体は OS-MS 患者でのみ陽性者が認められた。

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

## 視神経脊髄型多発性硬化症における髄腔内 IL-17/IL-8 系の活性化

分担研究者 吉良潤一

共同研究者 石津尚明、梅風君、小副川学、田中正人、三野原元澄、村井弘之

### 研究要旨

視神経脊髄型 MS (OS-MS) と通常型 MS (C-MS) の免疫病態の違いを明らかにすることを目的とし、髄液サイトカイン・ケモカインの多項目同時測定、および種々の臨床パラメータとの相関を検討した。OS-MS 群は C-MS 群に比し、IL-8、IL-17、IL-5 が有意に高値であり、さらに IL-8 と IL-17 のみが、EDSS の高値、髄液蛋白量や髄液/末梢血アルブミン比の上昇、脊髄 MRI 病変の長さといった OS-MS に特徴的な臨床パラメータと有意な正の相関を示した。IL-17 は activated memory T cell より産生され、代表的な好中球動員ケモカインである IL-8 を介して病変局所への好中球浸潤に関与するとされ、他の自己免疫疾患で報告されている。我々の MS 剖検例を用いた病理学的検討においても、半数の OS-MS 症例で病変部位への著明な好中球浸潤が確認された。以上の結果から、OS-MS において、髄腔内 IL-17/IL-8 系の活性化とそれに伴う病変部位への著明な好中球浸潤が、長大な脊髄病巣と血液脳関門の破綻、高度の機能障害といった OS-MS に特徴的な病態を形成するのに関与していると考えられる。

### 研究目的

日本人の多発性硬化症 (MS) の 2 つの臨床病型、視神経脊髄型 MS (OS-MS) と通常型 MS (C-MS) は病変の局在以外にも異なった臨床的特徴を有しており、OS-MS では、EDSS での重症度が高い、髄液蛋白の高値、脊髄 MRI で 3 椎体以上に及ぶ縦長の病変を呈するといった点が特徴的である。また病理学的には、OS-MS では脱髄のみならず軸索傷害や壊死といった高度の組織破壊所見を呈する。しかし、これらの臨床的・病理学的な相違を説明しうる免疫病態の違いは依然として明らかでない。今回我々は、髄液サイトカイン・ケモカインの多項目同時測定を行い、それぞれの臨床病型における免疫病態の違いを比較するとともに、種々の臨床パラメータとの相関を検討した。また併せて、MS の剖検例を用いて病理学的にも検討した。さらに、髄液上清中の濃度が低く測定困難な TNF- $\alpha$  (半減期が約 30 分と短い) と IL-2 は髄液細胞内サイトカイン産生能も測定し、末梢血と比較した。

### 研究方法

活動期の MS 患者 40 名、脊髄小脳変性症 (SCD) 患者 19 名 (男 9 名、女 10 名、平均年齢 59.4 歳) を対象とした。MS 患者の内訳は、OS-MS 20 名 (男 1 名、女 19 名、平均年齢 51.0 歳)、C-MS 20 名 (男 4 名、女 16 名、平均年齢 31.6 歳) である。

(1) 髄液上清サイトカイン・ケモカイン測定：蛍光ビーズサスペンションレイシシステム (Bio-Plex) を用いて、IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12 (p70)、IL-13、IL-17、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、G-CSF、MCP-1、MIP-1 $\beta$  の 16 種のサイトカイン・ケモカイン濃度を同時測定した。

(2) 臨床パラメータとの相関：MS で上昇を認めたサイトカイン・ケモカインと、発症年齢、髄液採取時年齢、罹病期間、性別、EDSS、髄液細胞数、髄液蛋白量、髄液/末梢血アルブミン比、脊髄 MRI での病変長との相関を、Spearman's rank correlation analysis を用いて検討した。

(3) 病理学的検討：MS 剖検例 (OS-MS 6 例、C-MS 2 例) の脊髄標本を用い、HE 染色、myeloperoxidase (MPO)、myelin basic protein、

phosphorylated neurofilament、T・B cell antigen での免疫染色を行った。

(4) 髄液細胞内サイトカイン産生能測定：採取した髄液・血液細胞をPMAとionomycinを含む刺激液で37℃、4時間インキュベートした後、CD4-PC5、TNF- $\alpha$ -PE、IL-2-FITCで染色し、フローサイトメトリーを用いてCD4陽性T細胞中のTNF- $\alpha$ <sup>+</sup>細胞%、IL-2<sup>+</sup>細胞%を算出した。

## 研究結果

### (1) 髄液サイトカイン・ケモカイン測定

#### (a) OS-MS群とSCD群での比較

OS-MS群ではSCD群に比し、IL-1 $\beta$  ( $P=0.027$ )、IL-8 ( $P<0.0001$ )、IL-10 ( $P<0.0001$ )、IL-13 ( $P=0.027$ )、IL-17 ( $P=0.0031$ )、TNF- $\alpha$  ( $P=0.026$ )、MIP-1 $\beta$  ( $P=0.0042$ )が有意に高値であり、IL-7 ( $P=0.0048$ )、MCP-1 ( $P=0.04$ )が有意に低値であった。

#### (b) C-MS群とSCD群での比較

C-MS群ではSCD群に比し、IL-8 ( $P=0.0012$ )、IL-10 ( $P=0.00054$ )、TNF- $\alpha$  ( $P=0.0055$ )が有意に高値であり、IL-7 ( $P<0.0001$ )、MCP-1 ( $P=0.034$ )が有意に低値であった。

#### (c) OS-MS群とC-MS群での比較

OS-MS群ではC-MS群に比し、IL-5 ( $P=0.0048$ )、IL-8 ( $P=0.029$ )、IL-17 ( $P=0.045$ )が有意に高値を示した(図1)。

### (2) 臨床パラメータとの相関

MSで上昇していたサイトカイン・ケモカインのうち、IL-8のみがEDSSと有意な正の相関を示した。また、IL-8とIL-17のみが、髄液蛋白量や髄液/末梢血アルブミン比、脊髄MRI病変の長さとは有意な正の相関を示した(図2)。発症年齢、髄液採取時年齢、罹病期間、性別、髄液細胞数と有意な相関を示したサイトカイン・ケモカインは無かった。

### (3) 病理学的検討

OS-MS症例では高度の組織破壊所見を呈し、全例でマクロファージやリンパ球の病変部位への浸潤がみられたことに加え、6例中3例で病変部位、特に血管壁周囲にMPO陽性の好中球

浸潤を認めた(図3)。一方C-MS症例ではマクロファージやリンパ球の浸潤はみられたが、好中球浸潤は認めなかった。

### (4) CD4陽性T細胞内TNF- $\alpha$ /IL-2産生能

MSでは末梢血より髄液でTNF- $\alpha$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞%が有意に増加しており、髄液中のTNF- $\alpha$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞%はONDより有意にMSで高く、特にC-MSでその傾向が強かった。これに対し、IL-2<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞%は末梢血より髄液がむしろ低く抑えられており、各群間に差は見られなかった。

## 考察

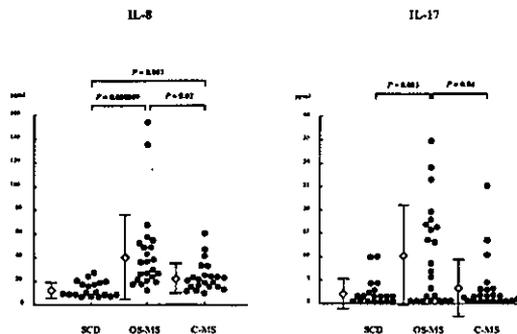
今回の検討で、IL-17/IL-8系の活性化がOS-MSに顕著なサイトカイン・ケモカイン変化であると考えられた。さらにIL-17とIL-8のみが、EDSSの高値、髄液蛋白の上昇、髄液/末梢血アルブミン比の上昇、脊髄MRIでの長い病変といったOS-MSに特徴的な臨床所見と有意な相関を示した。IL-17はactivated memory T cellより産生され、代表的な好中球動員ケモカインであるIL-8等を介して病変局所への好中球浸潤に関与する<sup>1,2</sup>。このIL-17/IL-8系の活性化による好中球の局所動員と高度の組織破壊は、関節リウマチ、気管支喘息といった他の自己免疫疾患で報告されている<sup>3,4</sup>。また、OS-MSとoverlapする疾患単位である欧米NMOの病理報告では、56%の症例で好中球の著しい集簇が確認されている<sup>5</sup>。我々の今回の病理学的検討でも半数のOS-MS症例で著明な好中球浸潤がみられた。以上の所見は、OS-MSにおいて、髄腔内IL-17/IL-8系の活性化とそれに伴う病変部位への著明な好中球浸潤が、脊髄の長い病変や高度の組織破壊といったOS-MSに特徴的な病態を形成するのに重要なファクターであることを強く示唆するものである。また、TNF- $\alpha$ およびIL-2産生CD4陽性T細胞は、末梢血と髄腔内では異なる免疫調節を受けており、OS-MS、C-MSともにTNF- $\alpha$ 産生細胞が髄液で末梢血よりも増加しているが、IL-2産生細胞は低く抑えられている。これらは髄液上清サイトカインの結果とも符合する所見で

あった。

図 1

### 結論

OS-MS では髄腔内での IL-17/IL-8 系の活性化が長大な脊髄病巣の形成と血液脳関門の破綻、高度の機能障害に関与している。



### 文献

1. Aarvak T, et al. IL-17 is produced by some proinflammatory Th1/Th0 cells but not by Th2 cells. *J Immunol* 162:1246-51,1999.
2. Miyamoto M, et al. Endogenous IL-17 as a mediator of neutrophil recruitment caused by endotoxin exposure in mouse airways. *J Immunol* 170:4665-72,2003.
3. Kotake S, et al. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest* 103:1345-52,1999.
4. Linden A, et al. Neutrophilic airway inflammation and IL-17. *Allergy* 57:769-75,2002.
5. Lucchinetti CF, et al. A role for humoral mechanisms in the pathogenesis of Devic's neuromyelitis optica. *Brain* 125:1450-61,2002.

図 2

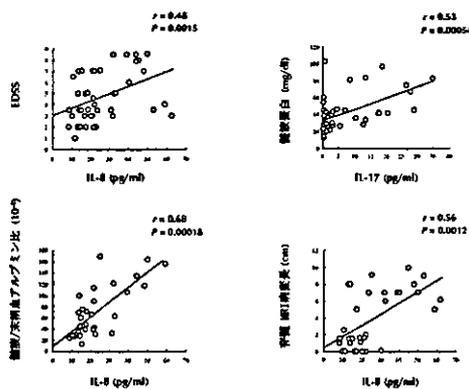


図 3

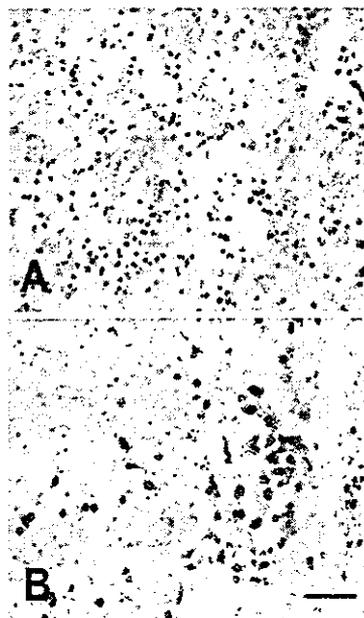
### 健康危険情報

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



A: hematoxylin-eosin stain  
B: MPO immunostaining

# 視神経脊髄炎/視神経脊髄型多発性硬化症に特異な血清自己抗体(NMO-IgG)

班 員 糸山泰人<sup>1)</sup>

共同研究者 藤原一男<sup>1)</sup>、中島一郎<sup>1)</sup>、三須建郎<sup>1)</sup>、Lennon VA,<sup>2)</sup> Wingerchuk DM,<sup>2)</sup>  
Kryzer TJ,<sup>2)</sup> Pittock SJ,<sup>2)</sup> Lucchinetti CF,<sup>2)</sup> Weinshenker BG<sup>2)</sup>

## 研究要旨

視神経脊髄型多発性硬化症(OSMS)/視神経脊髄炎(NMO)は通常型MS(CMS)と異なる臨床的特徴を有する。今回、間接蛍光抗体法を用いて本邦のOSMS、北米のNMO、OSMS/NMOのハイリスク群、CMS及び対照群の血清をマウス脳組織と反応させOSMS/NMOに特異な自己抗体の有無を検索した。その結果OSMS/NMO、ハイリスク群で中枢神経の白質、灰白質の微小血管、軟膜、軟膜下、Virchow-Robin spaceなどが染色(NMO-IgG)された。NMO-IgG検出の感度および特異性はOSMSではそれぞれ58%[95%信頼区間30-86%])と100%[66-100%]、NMOでは73%[60-86%])と91%[79-100%]だった。ハイリスク群の約半数も陽性だった。NMO-IgGはOSMSに特異な自己抗体であり、今後その早期診断への有用性、病態への関与、標的抗原の解析が必要である。

## 研究目的

本邦の視神経脊髄型多発性硬化症(OSMS)は、欧米で記載されてきた視神経脊髄炎(NMO)と同様に視神経及び脊髄を選択的に冒す一般に予後不良の中枢神経の炎症性脱髄疾患である。OSMSは通常型MS(CMS)と比べて、特徴的な病変分布に加えて女性優位、オリゴクローナルバンド(OB)が大部分の症例で陽性、脊髄病変が長いなどの特徴を有することが報告されてきたが、これまでにOSMSをCMSと識別する特異的なバイオマーカーは存在しなかった。今回、新たに同定された血清自己抗体(NMO-IgG)の疾患特異性を検討した。

## 研究方法

本邦の検体はOSMS 11例、OSMSのハイリスク症例1例(長い病変を呈する脊髄炎の既往があり、視神経炎の病態および視覚誘発脳波でP100潜時の有意な延長がみられる症例)、CMS 5

例、若年性脳梗塞5例の血清を用いた。OSMS症例はすべてWingerchukらのNMOの診断基準(1999)を満たしOB陰性であり、一方CMS症例は全例McDonaldらのMSの診断基準(2001)を満たしOB陽性であった。米国の検体はNMO 45例、NMOのハイリスク症例(両側視神経炎あるいは長い病変の脊髄炎のみの症例) 35例、CMS 22例の血清である。

これらの血清をliver powderでpreabsorptionした後、マウスの脳組織と反応させ間接蛍光抗体法で特徴的な染色パターン(NMO-IgG)の有無を観察した。2次抗体としては蛍光標識したヤギ抗ヒトIgG抗体を用いた。陽性と判定された血清は2倍希釈していき陽性である最大希釈倍率を求めて抗体価とした。陽性あるいは陰性の結果判定は、2名の独立した判定者がコードされた検体を用いて行った。陽性、陰性の判定は100%一致し、また抗体価の判定に関する相違は2倍以内であった。

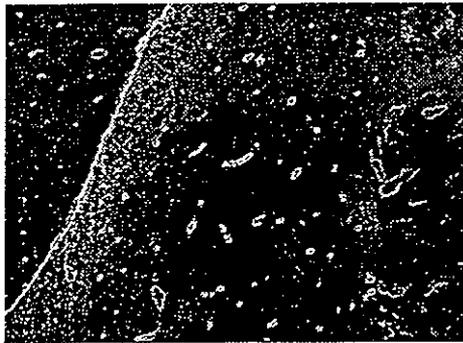
NMO-IgGの結合領域の局在をさらに検討するため、ウサギ抗Factor VIII $\alpha$ 、GFAP、laminin-IgGとrhodamine標識抗ウサギIgGを用いて2重染色した。

各群におけるNMO-IgGの陽性率を算出し、陽性例と陰性例の

1) 東北大学神経内科

2) メイヨークリニック神経内科

図1. NMO-IgG の染色パターン



臨床、画像その他の検査所見を比較した。

### 研究結果

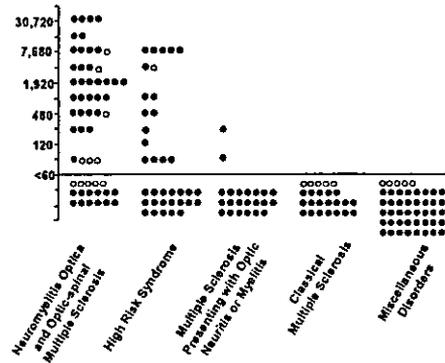
OSMS, NMJ 及びハイリスク症例の血清に特異な染色パターン (NMO-IgG) が観察された (図1)。NMO-IgG は中枢神経 (脳 中脳 脊髄) の白質、灰白質の微小血管、軟膜、軟膜下、Virchow-Robin space を染色した。また NMO-IgG は部分的には laminin と共在した。一方、クモ膜下の血管や choroid plexus は染色されなかった。また、腸 腎臓 肺臓も染色されなかった。NMO-IgG 検出の感度及び特異性は OSMS ではそれぞれ 58% (95% 信頼区間は 30-86)、100% (66-100)、NMJ では 73% (60-86)、91% (79-100) だった (図2)。本邦の 1 例を含めてハイリスク症例の約半数も NMO-IgG 陽性と判定された (図2)。

本邦の OSMS では NMO-IgG 陽性例が陰性例と比較してやや発症年齢が高く、EDSS スコアが高い傾向がみられたが、OSMS、NMJ のいずれにおいても NMO-IgG と統計的に有意な関連を示す所見はなかった。

### 考察

今回の検討により、本邦の OSMS と欧米の NMJ に特異性の高い血清 IgG 自己抗体 (NMO-IgG) の存在が明らかになった。その検出感度や特異性は OSMS と NMJ でほぼ同等であり、両群に共通の自己免疫病態があることが示唆された。NMO-IgG は OSMS、NMJ の診断基準症例のみならず、ハイリスク症例でも半数で検出されたことから、今後早期診断における有用性の検討がさらに必要である。また NMO-IgG は血脳関

図2. NMO-IgG の抗体価



門あるいはその近傍に結合するようであるが、標的抗原の同定が今後の課題である。最近 OSMS や NMJ の病機における免疫病理学的観点により、血管壁の肥厚や硝子化などの血管病変や、免疫グロブリンや補体の血管への沈着が OSMS に比べて高頻度みられることが報告されており、これらの所見と NMO-IgG との関係も注目される。

### 結論

本邦の OSMS 及び北米の NMJ に特異な血清自己抗体 NMO-IgG を発見した。

### 文献

- 1) Lennon VA, et al. Serum autoantibody marker of neuromyelitis optica : distinction from multiple sclerosis. Lancet 364:2106-2112, 2004.

### 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

## 多発性硬化症における血管関連因子の検討

分担研究者 吉良潤一

共同研究者 小副川学、蘇真真、田中正人、三野原元澄  
石津尚明、村井弘之

### 研究要旨

血管関連因子の日本人多発性硬化症 (MS) における関与を明らかにすることを目的とした。対象は Poser の診断基準にて MS と診断された 52 例 (視神経脊髄型 MS 28 例、通常型 MS 24 例) と健常対照 22 例に分類した。血管関連因子は血清 VEGF、acidic FGF、basic FGF、PDGF-AA、-AB、-BB を ELISA 法にて測定し、病型、病期 (再発期および寛解期) ごとに健常対照と比較を行った。血清 VEGF は病型に関わらず、MS 再発期において MS 寛解期および健常対照と比べ、有意に高値であった (それぞれ  $p = 0.0123$ 、 $p = 0.0002$ )。MS における脊髄 MRI 上の T2 高信号病変の長さとは血清 VEGF 値の相関を調べると、再発期において正の相関を示した ( $r = 0.650$ 、 $p = 0.0023$ )。また basic FGF は病期に関わらず、C-MS においてのみ健常対照と比べ、有意に高かった ( $p = 0.0097$ )。血清 VEGF は MS 急性期の血管透過性に関与している可能性が示唆された。

### 研究目的

MS はその臨床症候により、視神経および脊髄に臨床病変が限局する視神経脊髄型 MS (optico-spinal MS : OS-MS) と大脳、小脳、脳幹を含む広汎な中枢神経に病変を有する通常型 MS (conventional MS : C-MS) に分けられるが、日本を含むアジア諸国においては OS-MS の占める割合が高率であることが特徴である。OS-MS は C-MS に比べ、高齢女性に多い、再発が頻回である、欧米の C-MS では 95% が陽性であるオリゴクローナルバンドの陽性率が低い (10%) という点に加えて、MRI 上 3 椎体以上に及ぶ長大な脊髄病変を有し、そのため重症化しやすいということがきわだった特徴を有する。また神経病理学的においても OS-MS の脊髄では壊死を伴う広汎な脱髄や空洞を伴うことが多く、血管壁の肥厚、ヒアリン様変性、毛細血管の新生などの血管病変を

呈する症例が半数以上に見られるという特徴がある。そのため OS-MS の発症および増悪機序に血管関連因子の関与が推測されるので、MS と血管関連因子の関係を明らかにすることを今回の目的とした。

### 研究方法

対象は Poser の分類にて clinically definite MS と診断された 50 例 (男 9 例、女 41 例、採血時年齢  $41.6 \pm 16.0$  歳 < 平均  $\pm$  標準偏差 >、発症年齢  $32.7 \pm 16.5$  歳)。臨床経過は全例再発寛解型。そのうち 27 例 (全例女性) が視神経脊髄型 MS (OS-MS)。残り 23 例 (男性 9 例、女性 14 例) が通常型 MS (C-MS)。OS-MS と C-MS にて観察期間は  $7.8 \pm 8.3$  年、 $9.1 \pm 10.5$  年とほぼ同等。再発期 (26 例) または寛解期 (27 例) に採血を行った (うち 3 例は両期において採血)。採血時にはインターフェロン  $\beta$ -1b やステロイド大量投与などの免疫療法を行われたものは除いた (但し、プレドニン 10mg 以下の経口少量投与 5 例は含めた)。また 22 例 (男 13 例、女 9 例、 $33.2 \pm 8.7$  歳) を健

---

九州大学神経内科

常対照とした。

血清を使用し、ELISA 法にて vascular endothelial growth factor (VEGF)、acidic fibroblast growth factor (FGF)、basic FGF、platelet-derived growth factor (PDGF)-AA、-AB、-BB などの血管関連因子との測定を行った。病期(再発期、寛解期)、病型(OS-MS、C-MS)に分け、健常対照を含め比較統計した。また、EDSS や脊髄 MRI における T2 高信号病変の長さ等の臨床所見と各血管関連因子との相関について検討した。統計学的手法としては、前者においてまず Kruskal-Wallis H test を行い、有意差がみられたものに関して Mann-Whitney U test with Bonferroni correction を用いて多重比較を行った。後者においては Spearman の順位相関を使用した。

## 研究結果

### 1-1) MS 再発期、MS 寛解期及び健常対照群における血管関連因子の検討 (図 1)

MS 再発期において MS 寛解期と比べ、血清 VEGF 値が有意に高かった ( $320.5 \pm 316.1$  pg/ml vs.  $46.1 \pm 23.9$  pg/ml,  $p = 0.0003$ ) また MS 再発期は健常対照と比べても有意に血清 VEGF 値が高値であった ( $320.5 \pm 316.1$  pg/ml vs.  $131.0 \pm 158.9$  pg/ml,  $p = 0.0303$ )。その他の血管関連因子に関しては 3 群間に有意差はみられなかった。

### 1-2) OS-MS、C-MS 及び健常対照群における血管関連因子の検討 (図 1)

C-MS において健常対照群と比べ、血清 basic FGF 値が有意に高かったが ( $5.8 \pm 4.2$  pg/ml vs.  $3.7 \pm 2.5$  pg/ml,  $p = 0.0291$ )、OS-MS との差異は明らかではなかった ( $p < 0.1$ )。その他の血管関連因子に関しては 3 群間に有意差はみられなかった。

### 2) 各種血管関連因子と臨床所見との相関 (図 2)

MS を再発期と寛解期にわけてそれぞれ、MS における脊髄 MRI 上の T2 高信号病変

の長さ と血清 VEGF 値の相関を調べると、再発期において正の相関を示した ( $r = 0.650$ ,  $p = 0.0023$ )。血清 VEGF 値は OS-MS においてのみ検査時年齢と正の相関を示した (検査時年齢:  $r = 0.714$ ,  $p = 0.0100$ )。

## 考察

OS-MS の特徴として、3 椎体以上の長い病変を有し、病理学的にも血管病変の関与があることが知られていたが、今回の検討で血管関連因子のひとつである VEGF が脊髄に長い病変を有する MS の進展に関与している可能性が示唆された。また OS-MS では検査時年齢が高いほど VEGF が高値であり、OS-MS の発症および検査時年齢が高いことに関係する可能性があり興味深い。VEGF には BBB の透過性を高め、病変への炎症細胞の移入を進めることによって炎症反応を促進するという報告があり、今回の結果によく合致する。今後髄液における測定や病理組織での VEGF およびその受容体の発現を検索し、病理への関与を明らかにしていく予定である。

## 結論

MS 再発期に VEGF は高値となり、MRI 上の脊髄病変の長さ と正の相関が示されたので、脊髄の長い病変の形成に血清 VEGF が寄与しているものと考えられた。

## 健康危機情報

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

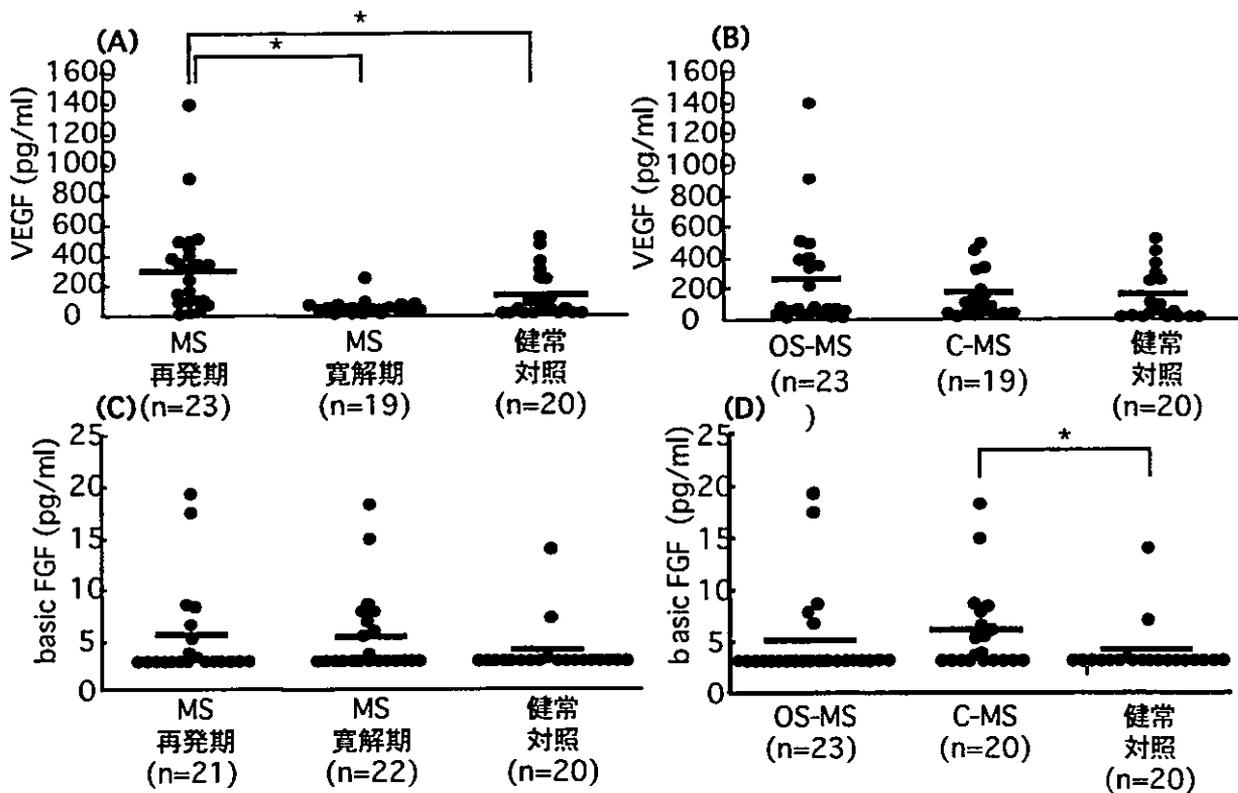


図1 (A): 血清VEGF値はMS再発期においてMS寛解期、健常対照に比べて有意に高い、\*: $p < 0.05$   
 (B): しかし、血清VEGF値はOS-MS、C-MS、健常対照の3群間で有意差はない  
 (C): 血清basic FGF 値はMS再発期、MS寛解期、健常対照の3群間で有意差はない  
 (D): しかし、血清basic FGF 値はC-MSにおいて健常対照に比べて有意に高い、\*: $p < 0.05$

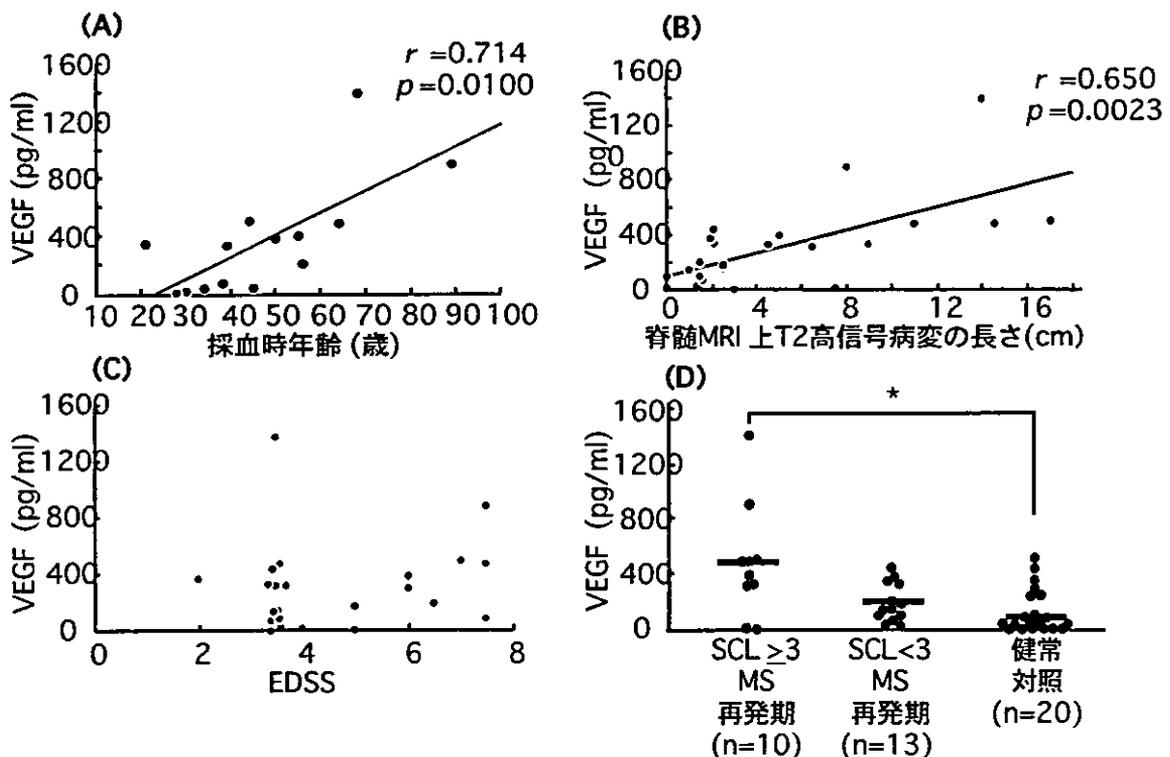


図2 (A): 血清VEGF値はOS-MSにおいて採血時年齢と相関する  
 (B): 血清VEGF値はMS再発時において脊髄MRI上のT2高信号病変の長さとの正の相関を示す  
 (C): しかし、血清VEGF値はEDSSとは相関しない  
 (D): 脊髄MRI上3椎体を超えるT2高信号病変を有する再発期MS (SCL  $\geq 3$  MS 再発期) において血清VEGF値は健常対照より有意に高い、\*: $p < 0.05$

## 血清 MMP-3 は多発性硬化症の疾患活動性と相関する

分担研究者 桑原 聡

共同研究者 森 雅裕、金坂俊秀、平賀陽之、三澤園子、服部孝道

### 研究要旨

細胞外マトリックスの一部は血液脳関門 (BBB) を構成する基底膜の構成因子であるため、それらを分解するマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)、特に MMP-9 が多発性硬化症 (MS) の発症に関与していると考えられている。今回、MMP-9 以外に BBB を分解し得る MMP-3 に特に注目し、47 名の再発寛解型 MS における 48 回の再発前後の経時的な変化を検討した。その結果、血清 MMP-3 は再発後に有意な上昇を認め、血清 MMP-3 は MS の再発に関連して上昇し、その経時的測定は MS の疾患活動性評価の指標として応用できる可能性が示された。

### 研究目的

細胞外マトリックスは組織の細胞を取り巻く環境物質であり、コラーゲンやエラスチンなどの線維性蛋白、プロテオグリカンなどの複合糖質、ファイブロンネクチンやラミニンなどの糖タンパク質を含み、細胞・組織の支持のみならず、細胞の移動・増殖・分化に関与し、ひいては腫瘍・炎症などの病態においても重要な役割を担っている。この細胞外マトリックスの分解に強く関与しているのがマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) であり、MMP ごとにその分解基質は異なっている。多発性硬化症 (MS) との関連では、細胞外マトリックスの一部は血液脳関門を構成する基底膜の構成因子であるために、それらを分解する MMP、特に MMP-9 と MS との関連についての研究が盛んに行われ、関連を支持する結果が多く報告されている。我々は血液脳関門を構成する細胞外マトリックスを分解する、もう一つの MMP である MMP-3 に注目し、血清 MMP-3 と多発性硬化症の疾患活動性との関連があるかを検討した。

### 研究方法

対 象: 2002 年 7 月から 2004 年 2 月にかけて千葉大学附属病院で診療した再発寛解型 MS 47 例 (女性 40 例、男性 7 例)。

方 法: 再発は McDonald らの定義を使用した。2002 年 9 月から 2003 年 12 月にかけての 15 ヶ月間、4 週間毎および再発時に血清 MMP-3 を測定し、同時に血清および血漿を  $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結保存。保存検体から再発時 (再発前後 1 ヶ月以内のもの) および寛解期 (前後 2 ヶ月に再発のないもの) を選び、血清 MMP-1、MMP-2、血漿 MMP-9 を測定した。MMP の測定には EIA 法を用いた。

### 研究結果

(1) 観察期間中、MS 患者 47 例のうち 22 例で 48 回の再発がみられた。48 回の再発のうち、前後 2 ヶ月に再発のないものが 40 回認められた。

(2) 血清 MMP-3 と再発からの日数との関係: 血清 MMP-3 レベルを再発からの日数に応じてプロットすると再発付近でピークを有する一峰性の散布像が得られた。

(2) 血清 MMP-3 の経時的変化: 血清 MMP-3 の経時的変化をみると再発後 1 ヶ月以内に有意な ( $p=0.04$ ) 上昇をみた。

(3) 血清 MMP-3、MMP-1、MMP-2 と血漿 MMP-9 の再発期 (再発前後 1 ヶ月間) と寛解期 (前後 2 ヶ月に再発のない時期) の比較: 再発期と寛解期の比較では MMP-3 及び MMP-9 は有意に再発時に高値を示した (MMP-3,  $p=0.008$ ; MMP-9,  $p=0.03$ )。

---

千葉大学医学研究院神経病態学 (神経内科)

## 考察

今回の我々の結果では、MS の再発時に血清 MMP-3 値が有意に上昇し、疾患活動性と平行して推移することが示された。血液脳関門 (BBB) を形成する基底膜の構成因子として、細胞外マトリックスのラミニン、ファイブロネクチン、コラーゲン IV などが知られているが、これらは全て MMP-3 によって分解される基質であることから、MS 再発時、BBB を炎症細胞が通過する際に、MMP-3 が関与していることは充分考えられる。実際に MS 患者や動物モデルで、MMP-3 の脱髄病変における発現や炎症細胞での活性亢進が報告されており、これを支持する。また、MMP-3 は proMMP-9 を活性化し MMP-9 にすることが報告されており、MMP-3 が MMP-9 の上昇を介して MS の病態に関連する可能性もある。

## 結論

血清 MMP-3 は MS の再発に関連して上昇し、その経時的測定は MS の疾患活動性評価の指標として応用できる可能性が示された。

## 健康危険情報

特になし

## 知的所有権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし

## 活動期多発性硬化症患者髄液中に増加するCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>細胞の解析

分担研究者 松井 真<sup>1)</sup>

共同研究者 荒谷信一<sup>1)</sup>、王会雲<sup>1)</sup>、小澤恭子<sup>1)</sup>、齋田孝彦<sup>1)</sup>

### 研究要旨

われわれは、本班会議において、フローサイトメトリーの手法を用いて髄液中に存在するCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>細胞の存在率を測定することは、多発性硬化症（MS）患者の疾患活動性を知る上で有益な情報を提供し得ることを報告してきた。近年、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>細胞が免疫制御性の機能を担う分画であることが明らかにされたため、従来測定してきたCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>細胞を表面抗原の点からCD25<sup>high</sup>とCD25<sup>low</sup>に区別し得る新規のプロトコルを作成して再評価を試みた。その結果、従来法により検知される細胞集団は、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>細胞であることが判明した。また、CD45RO抗原の発現を伴っている点からもregulatory T cellとされる分画であることが確認された。しかし本細胞分画は活動期MS髄液において明らかな上昇を示すことを考えあわせると、MS患者のCD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>細胞には機能不全があるか、あるいは同細胞は中枢神経内では十分に機能し得ないかのいずれかの可能性が示唆された。

### 研究目的

再発寛解型多発性硬化症（RRMS）患者の治療選択には、疾患活動性の正確な把握が必要である。われわれは、フローサイトメトリーによる髄液中のCD25陽性CD4ヘルパーT細胞存在率の測定の有用性を指摘してきた。近年、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>細胞がregulatory T cellを含んでいる事実が明らかにされたことを踏まえ、従来われわれが測定してきたCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>細胞の意義を再評価にすることを試みた。

### 研究方法

#### 1) 対象

RRMS患者14名（男女3：11）。うち8名は活動期に、6名は非活動期に、同日採取した末梢血および髄液サンプルを用いて検索した。また、健常成人10名（男女4：6）の末梢血を対照群として解析した。

#### 2) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>細胞の解析

末梢血よりFicoll-Paque比重遠沈法で分離した単核球の一部を50 μl の2.5%FCS添加PBSに浮遊させ、以下に示すような抗体の組み合わせを用いて4°Cで45分間、

2重もしくは3重染色し、フローサイトメトリー（EPICS XL, Beckman Coulter社）でリンパ球分画にゲートをかけて解析した。

髄液細胞は、髄液採取後に4°C下800rpmの低速遠沈で回収した後、末梢血単核球と同様の方法で解析した。解析対象と使用抗体の組み合わせは以下の通りである。

a) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>細胞解析用旧プロトコル  
抗CD4・・・T4-FITC（Beckman Coulter社）  
抗CD25・・・anti-IL-2R-PE（BD社）

b) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>細胞解析用プロトコル  
抗CD4・・・T4-FITC（Beckman Coulter社）  
抗CD25・・・anti-CD25-PE（Immunotec社）

c) CD45RO抗原の共発現についての解析  
抗CD4・・・anti-CD4-PC5（Immunotec社）  
抗CD25・・・anti-IL-2R-PE（BD社）  
抗CD45RO・・・UCHL-1-FITC（ニチレイ社）

### 研究結果

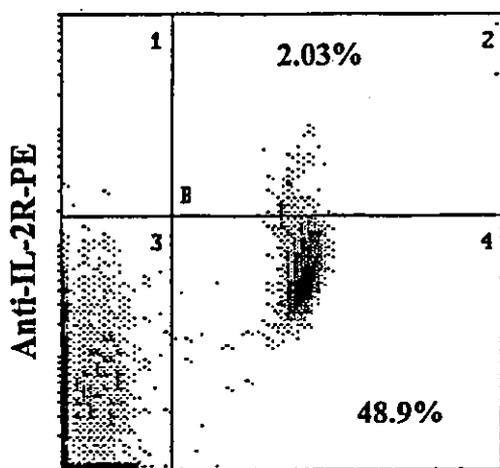
1) 10名の健常人末梢血における旧プロトコルによるCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>細胞存在率は1.96 ± 0.67%に対して、新プロトコルによるCD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>細胞存在率は2.01 ± 0.62%で

<sup>1)</sup> 国立病院機構宇多野病院臨床研究部・神経内科

## CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells vs. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> cells in Blood

### Original protocol

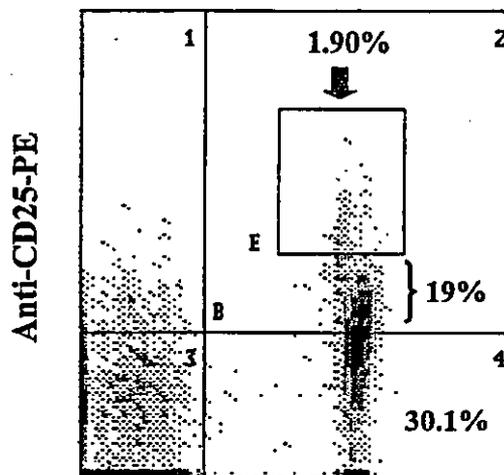
T4-FITC (Beckman Coulter)  
Anti-IL-2R-PE (BD)



T4-FITC

### New protocol

T4-FITC (Beckman Coulter)  
Anti-CD25-PE (Immunotec)



T4-FITC

ほぼ同様の数値を示し、蛍光パターンの点からも両者は同一の分画であると推定された(図)。

2) 活動期MS髄液におけるCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>細胞存在率は $5.14 \pm 1.61\%$ 、非活動期では $1.06 \pm 0.48\%$  ( $p < 0.0001$ )、さらにCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>細胞存在率は活動期MS髄液で $4.05 \pm 1.66\%$ 、非活動期髄液で $2.74 \pm 1.02\%$  ( $p = 0.0211$ )と、両分画ともに活動期MS髄液中で有意の増加を示した。末梢血側の各々の分画は活動期・非活動期で差を認めなかった。

3) MS末梢血および髄液のいずれにおいても、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>細胞存在率の測定結果とCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>細胞の検索結果は強い正の相関を示した。

考察

われわれの旧プロトコルで捉えられたCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>細胞は、新規解析プロトコルによる比較対照においても、CD45RO抗原

との共発現 (Dieckmannら, 2001) という点においても、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>とされる分画である。しかし、今回の検討でも再確認できたように、RRMS活動期の髄液中ではCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>細胞の明らかな増加が認められることを考え合わせると、MS患者の中中枢神経組織において同細胞がregulatory T cellとして機能していると結論することは尚早である。今後、Foxp3遺伝子の発現や、GITRあるいはCD223などの表面抗原の発現などの点から検討する必要があると考えられる。

結論

活動期MS髄液中に増加するCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>細胞は、regulatory T cellとされるCD25<sup>high</sup>分画と同一のものであるが、その意義については、今後遺伝子発現を含めた詳細な検討が必要である。

健康危険情報

なし

知的財産権の出願・登録状況

該当せず