

多発性硬化症と調節性 NK 細胞 : CD95 high CD11c+ NK 細胞の役割

分担研究者 山村隆

共同研究者 荒浪利昌、三宅幸子

国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部

研究要旨

多発性硬化症 (MS) は、自己反応性 CD4T 細胞の介在する代表的な自己免疫疾患である。多くの症例で再発と寛解を繰り返すが、寛解維持機構に関する研究は遅れていた。我々は近年、MS 寛解期には IL-5 産生能の亢進と CD95 分子の発現を特徴とする NK 細胞 (NK2) が誘導され、寛解の維持に積極的に関与する可能性を示してきた。最近、CD95 陽性 NK 細胞の割合が特に高い患者では、NK 細胞が自己抗原 (ミエリン塩基性蛋白、MBP) 反応性メモリー CD4 陽性 T 細胞の迅速な活性化を抑制することを示し、我々の仮説の妥当性が確認された。

近年自己免疫性糖尿病モデルにおいて、CD11c 陽性の NK 細胞が調節性細胞として働くことが報告された。また、ヒトにおいても、NK 細胞の一分画が CD11c を発現し、ウイルス感染急性期にその発現量が増加することが報告されており、NK 細胞の中でも機能的に特異な集団であることが考えられる。本研究は、調節性 NK 細胞をより詳細に捉えるためのバイオマーカーの確立のため、MS 寛解期 NK 細胞における CD11c の発現パターンを解析し、同時に MS 寛解期の活動性の評価を行った。その結果、MS 寛解期 NK 細胞において CD11c の有意な発現上昇を認めた。NK 細胞における、CD95 と CD11c 発現の特徴から、MS 寛解期は 4 群に分けられた。この内、CD95 陽性 NK 細胞の頻度が高く、CD11c の発現上昇を認める群 (CD95 high CD11c high MS-rem) のみに、末梢血中の活性化 T 細胞、特に活性化 CD4 陽性 T 細胞の有意な増加が認められた。更に、この群は、3 ヶ月以内の再発率が CD95 high CD11c low MS-rem に比べ高い傾向が見られた。以上より、CD95 high MS-rem のうちでも、CD95 high CD11c high MS-rem 群においては、自己反応性 CD4 陽性 T 細胞の活動性が特に高まっており、NK 細胞がそれに対して counter-regulatory cell として働いている可能性を示唆する。

研究目的

多発性硬化症 (MS) は、自己反応性 CD4T

細胞の介在する代表的な自己免疫疾患である。多くの症例で再発と寛解を繰り返

すが、寛解維持機構に関する研究は遅れていた。我々は近年、MS 寛解期には IL-5 産生能の亢進と CD95 分子の発現を特徴とする NK 細胞 (NK2) が誘導され、寛解の維持に積極的に関与する可能性を示してきた。最近、CD95 陽性 NK 細胞の割合が特に高い患者では、NK 細胞が自己抗原 (ミエリン塩基性蛋白、MBP) 反応性メモリー CD4 陽性 T 細胞の迅速な活性化を抑制することを示し、我々の仮説の妥当性が確認された。

近年自己免疫性糖尿病モデルにおいて、CD11c 陽性の NK 細胞が調節性細胞として働くことが報告された。また、ヒトにおいても、NK 細胞の一分画が CD11c を発現し、ウイルス感染急性期にその発現量が増加することが報告されおり、NK 細胞の中でも機能的に特異な集団であることが考えられる。本研究は、MS 寛解期の NK 細胞の調節機能のメカニズム解明を最終目標とし、それに必要となる、調節性 NK 細胞をより詳細に捉えるためのバイオマーカーの確立のため、MS 寛解期 NK 細胞における CD11c の発現パターンを解析し、同時に MS 寛解期の活動性の評価を行った。

研究方法

1) 対象は健常者 10 例 (HS、男性：女性 = 3 : 7、年齢 37 ± 10 歳) と MS 寛解期患者 20 例 (MS-rem、男性：女性 = 7 : 13、年齢 41 ± 12 歳、少なくとも 1 ヶ月間インターフェロン、ステ

ロイド投薬なし) とした。

2) 末梢血単核細胞 (PBMC) を蛍光標識抗 CD11c、CD3、CD56、CD95 抗体等により染色し、フローサイトメトリーにより解析、CD3- CD56+ NK 細胞上の細胞表面抗原を測定した。

研究結果

1) MS 寛解期の NK 細胞の特徴として、HS に比較し、CD11c の有意な発現上昇が認められた。

2) NK 細胞に占める CD95 陽性細胞の頻度と CD11c の発現量に従い、MS 寛解期は 4 群 (CD95 high CD11c high、CD95 high CD11c low、CD95 low CD11c high、CD95 low CD11c low) に分けられた。

3) CD95 陽性 NK 細胞の割合が高く且つ CD11c の上昇が認められる一群 (CD95 high CD11c high MS-rem) では、HLA-DR 陽性活性化 T 細胞、特に活性化 CD4 陽性 T 細胞の増加が認められた。

4) 採血より 3 ヶ月以内の再発率は、CD95 high CD11c low に比べ CD95 high CD11c high において高い傾向が見られた。

考察

これまで我々は、MS 寛解期において、CD95 陽性 NK 細胞の増加が認められる一群 (CD95 high MS-rem) を同定してきた。この一群では、MBP 反応性メモリ

—CD4 陽性 T 細胞の頻度が高く、疾患活動性が比較的高い状態にあり、それに対して NK 細胞が調節性細胞として機能していることが示唆された。今回我々が、マウスの自己免疫疾患モデルで報告のあった、調節性 NK 細胞の特徴である、CD11c の発現を検討したところ、MS 寛解期 NK 細胞において有意な発現上昇を認めた。NK 細胞における、CD95 と CD11c 発現の特徴から、MS 寛解期は 4 群に分けられた。この内、CD95 陽性 NK 細胞の頻度が高く、CD11c の発現上昇を認める群（CD95 high CD11c high MS-rem）のみに、末梢血中の活性化 T 細胞、特に活性化 CD4 陽性 T 細胞の有意な増加が認められた。更に、この群は、3 ヶ月以内の再発率が CD95 high CD11c low MS-rem に比べ高い傾向が見られた。以上より、CD95 high MS-rem のうちでも、CD95 high CD11c high MS-rem 群においては、自己反応性 CD4 陽性 T 細胞の活動性が特に高まっており、NK 細胞がそれに対して counter-regulatory cell として働いている可能性を示唆する。

結論

NK 細胞上の CD11c は、MS 寛解期のうち、活動性の特に高い一群を捉える良いバイオマーカーとなりうると考えられる。NK 細胞上の CD95、CD11c の発現量によって、MS 寛解期をより詳細に捉えることが可能となると考えられる。

多発性硬化症患者における TRAIL および TRAIL レセプター遺伝子多型の検討

分担研究者 菊地 誠志¹⁾

共同研究者 宮岸 隆司²⁾、深澤 俊行³⁾、宮崎雄生¹⁾

1) 北海道大学神経内科 2) 西円山病院神経内科 3) 北祐会神経内科病院

研究要旨

TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) は、TRAIL レセプターを発現する細胞にアポトーシスを誘導するリガンド分子であり、多発性硬化症(MS)患者においてインターフェロンβの治療効果の予測マーカーとして報告された。今回我々は通常型MS 122 例および健常者 158 名において TRAIL および TRAIL-R1(DR4)の遺伝子多型について検討した。TRAIL exon5 (3'非翻訳領域) 1595C/TsNP の genotype frequency は通常型 MS 患者群では CC genotype の出現頻度が高く有意差を認めロジスティック解析でも通常型MS と CC genotype との有意な相関を認めた。IFN β 治療反応症例 (responder) 17 例、IFN β 治療非反応症例 (non-responder) 16 例での比較では両群間にて有意差は認めなかった。1595CC 多型が MS 発症のリスク因子であることが示されたが、その機序は明らかでない。日本人では欧米人と比較して genotype として CT を有する割合が高く、日本における有病率が低いことと関連している可能性も考えられた。

研究目的

TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) は腫瘍に対して選択的に細胞死を誘導する分子として注目をあびているが、最近、多発性硬化症(MS)患者においてインターフェロンβの治療効果の予測マーカーとして報告された。今回我々は MS 患者において TRAIL および TRAIL-R1(DR4)の遺伝子多型について PCR-RFLP 解析を行い疾患感受性、臨床像との関連を検討した。

研究方法

対象は1年以上経過観察している臨床的に診断確実な通常型MS 122 例および健常

者 158 名。MS患者は男性 42 名、女性 80 名、発症年齢 26.4±9.2 歳、再発寛解型 85 例、二次進行型 37 例、EDSS 3.3±2.8、progression index 0.46±0.76 である。MS患者と対照群にて男女比、年齢などの差は認めない

TRAIL 遺伝子多型は、プロモーター領域-665T/CsNP、-597A/GsNP、exon1 の A/GcNP、exon3 の T/CcNP、および exon5 (3'非翻訳領域) の 1525A/GsNP、1595C/TsNP について、TRAIL-R1(DR4)は exon3 の 422G/AcNP、exon4 の 626T/CcNP について検討した。

研究結果

TRAIL 1595C/TsSNP の genotype frequency, allele frequency は通常型 MS 患者群では CC genotype の出現頻度が高く有意差を認めた。発症年齢、経過、重症度に関しては有意差は認められなかった。ロジステック解析でも通常型MSと CCgenotype との有意な相関を認め、これは DRB1*1501 と交絡されない独立した有意性であることが示された。さらに IFN β 治療の反応性と遺伝子多型について検討した。IFN β 治療反応症例 (responder) 17 例、IFN β 治療非反応症例 (non-responder) 16 例で 1595C/T 多型を検討したが両群間にて有意差は認めなかった。1525A/GsSNP は通常型 MS 患者と対照群にて有意差は認めなかった。プロモーター領域の-665C/TsSNP、-597A/GsSNP、および exon1 の A/GcSNP、exon3 の T/CcSNP は MS およびに対照群にて多型は認められなかった。

TRAIL-R1(DR4) 422G/AcSNP、626T/CcSNP は有意差は認めなかった。

考察

実験アレルギー性脳脊髄炎では TRAIL によるシグナルを阻害することにより重症化することが示されており TRAIL は自己反応性 T 細胞の活性化を抑制する可能性が指摘されている。最近、MS 患者では IFN β responder では治療早期に TRAIL の上昇がみられることが示され MS の疾患感受性や治療反応性に関して重要な因子と考えられる。今回 1595CC 多型が MS 発症のリスク因子

であることが示されたが、その機序は明らかでない。また IFN-responder と non-responder にて多型を比較したが症例数も少なく有意な結果には至っていない。日本人では欧米人と比較して genotype として CT を有する割合が高く、日本における有病率が低いことと関連している可能性も考えられる。

健康危険情報

なし

研究発表

なし

知的財産権の出願・登録状況

なし

小児神経疾患患者の髄液中神経栄養因子の検討

—急性散在性脳脊髄炎を中心に—

分担研究者 原 寿郎¹⁾

共同研究者 鳥巢浩幸¹⁾、武本環美¹⁾、吉良龍太郎¹⁾、石津尚明²⁾、吉良潤一²⁾、
松尾宗明³⁾、下野昌幸⁴⁾、花井敏男⁵⁾

研究要旨

我々は小児の神経疾患、主に中枢神経系の炎症性疾患における髄液中神経栄養因子の検討を行った。対象は小児神経疾患患者 51 名（急性散在性脳脊髄炎 (ADEM) 7 名、無菌性髄膜炎 22 名、細菌性髄膜炎 14 名、ギランバレー症候群 2 名、フィッシャー症候群 2 名、横断性脊髄炎 1 名、てんかん 3 名：男性 32 名、女性 19 名、平均年齢 4.9 歳）と多発性硬化症 (MS) 患者 22 名（男性 5 名、女性 17 名、平均年齢 33 歳）で、脳由来神経栄養因子 (BDNF)、神経成長因子 (NGF)、白血病抑制因子 (LIF) の髄液中濃度を測定した。結果は NGF と LIF で全例感度以下、BDNF では無菌性髄膜炎 11 名 (50%)、細菌性髄膜炎 4 名 (29%)、ADEM 1 名、MS 1 名で上昇を認めた。神経栄養因子が主に脳実質や脊髄内の炎症局所で産生される ADEM や MS では、くも膜下腔に炎症の場が存在する髄膜炎と異なり、産生された神経栄養因子が髄液中濃度に反映されにくいと考えられる。また、神経栄養因子の髄液中濃度は人種差や病型が影響する可能性がある。

研究目的

神経栄養因子は主に神経系の細胞より分泌され、神経系の細胞の生存と機能維持に関わることが知られている。近年、神経栄養因子が免疫系の細胞からも分泌され、免疫系の細胞にも作用することが明らかとなり、多発性硬化症 (MS) や実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) などの中枢神経系内での炎症では、神経栄養因子の一つであるニューロトロフィンがニューロンに作用して神経の保護や再生を促し、オリゴデンドログリアに作用して保護や再髄鞘化を促す一方で、免疫細胞にも作用し、免疫細胞の移動や抗原提示に影響を与え、免疫反応を修飾することが確かめられている¹⁾。

今回、我々は小児神経疾患、主に中枢神経系の炎症性疾患における神経栄養因子の関与を検討するために急性散在性脳脊髄炎 (ADEM) 患者を中心に髄液中の神経栄養因子の測定を行った。

研究方法

【対象・方法】

対象は九州大学病院、福岡市立こども病院、産業医科大学病院、佐賀大学病院に入院した小児神経疾患患者 51 名（男性 32 名、女性 19 名、平均年齢 4.9 歳）と MS 患者 22 名（男性 5 名、女性 17 名、平均年齢 33 歳）。小児神経疾患の内訳は ADEM 7 名（男性 2 名、女性 5 名、平均年齢 7.0 歳、表）、無菌性髄膜炎 22 名（男性 15 名、女性 7 名、平均年齢 6.3 歳）、細菌性髄膜炎 14 名（男性 10 名、女性 4 名、平均年齢 2.0 歳）、ギランバレー症候群 2 名、フィッシャー症候群 2 名、横断性脊髄炎

1) 九州大学大学院医学研究院 成長発達医学分野

2) 九州大学医学部 神経内科

3) 佐賀大学医学部 小児科 4) 産業医科大学 小児科

5) 福岡市立こども病院 小児神経科

神経内科医によって行った。

方法は主に急性期 (MS では再発時) に採取した凍結保存脳脊髄液を用いて脳由来神経栄養因子 (BDNF)、神経成長因子 (NGF)、白血病抑制因子 (LIF) の 3 種類の神経栄養因子の髄液中濃度を ChemiKine ELIZA Kit (CHEMICON International, Inc., USA) により測定した。尚、ADEM 患者のうち 3 名は経過中の髄液濃度の測定を行った。

研究結果

1) BDNF の測定 (表、図)

無菌性髄膜炎患者では 11 名 (50%) に髄液中 BDNF 濃度の上昇を認め、平均±標準偏差は 27.7 ± 22.6 pg/ml であった。ついで、細菌性髄膜炎患者では 4 名 (29%) に上昇を認め、平均±標準偏差は 13.7 ± 15.2 pg/ml であった。さらに、ADEM 患者 1 名 (表の患者 2)、MS 患者 1 名に上昇を認めた。ADEM 患者上昇例で特徴的な髄液所見は認められなかったが、病変部位は最も広範であった。他の ADEM 患者、MS 患者、ギランバレー症候群患者、フィッシャー症候群患者、横断性脊髄炎患者、てんかん患者に関しては全て感度以下であった。また、ADEM 患者で経過中に上昇したものはなかった。

2) NGF の測定

全例で感度以下であった。経過中の検体でも上昇は認められなかった。

3) LIF の測定

全例で感度以下であった。経過中の検体でも上

昇は認められなかった。

考察

本研究では無菌性髄膜炎・細菌性髄膜炎において多数例の髄液中 BDNF の上昇を認めた。我々は既にこれらの髄膜炎で髄液中のニューロトロフィン 3 (NT-3)、ニューロトロフィン 4/5 (NT-4/5) が上昇することを報告しており^{2,3}、これらの髄膜炎では、主な炎症の場であるくも膜下腔内で神経栄養因子が産生され、神経保護に働くことが予想される。ただし、髄液中の NGF、LIF では上昇を認めず、以前の報告でグリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) や毛様体神経栄養因子 (CNTF) の上昇が認められないことから^{3,4}、神経栄養因子の産生は非特異的ではないと考えられる。

また、本研究では脳実質や脊髄に炎症が存在する ADEM や MS での髄液中 BDNF の上昇はほとんど認められなかった。MS 患者や EAE の検討で脱髄局所における BDNF の産生は病的に証明されていることを考慮すると、脳実質や脊髄において産生される BDNF は髄液中に反映されにくいと考えられる。ただし、報告されている MS 患者の髄液中 BDNF 濃度は対照を含めて本結果よりも高いことから⁴、髄液中の BDNF 濃度には人種差や病型の差が関与する可能性があると考えられる。また、ADEM 患者の回復期に髄液中 CNTF 濃度が上昇する報告があることから⁴、ADEM でも特異的な神経栄養因子が産生される可能性はある。

表. 急性散在性脳脊髄炎患者のプロファイルと髄液中BDNF値

患者	年齢 (歳)	性	亜分類	病変部位	採取日 (病日)	細胞数 (/mm ³)	蛋白 (mg/dl)	BDNF (pg/ml)
1	0	F	予防接種後	SCWM, PVWM, 脳幹	6, 21	2, 0	41, 19	0, 0
2	3	F	特発性	SCWM, PVWM, 基底核, 脳幹, 脊髄	10	32	43	29
3	6	M	感染後	SCWM, 脊髄	1	192	46	0
4	6	F	感染後	SCWM, PVWM, 脳幹, 小脳, 脊髄	20, 26	220, 10	36, 33	0, 0
5	9	M	感染後	SCWM, 脊髄	12	17	26	0
6	10	F	特発性	SCWM, PVWM, 脊髄	26, 111	13, 1	17, 12	0, 0
7	12	F	感染後	SCWM, PVWM, 視神経	14	15	46	0

SCWM: 皮質下白質 PVWM: 側脳室周囲白質

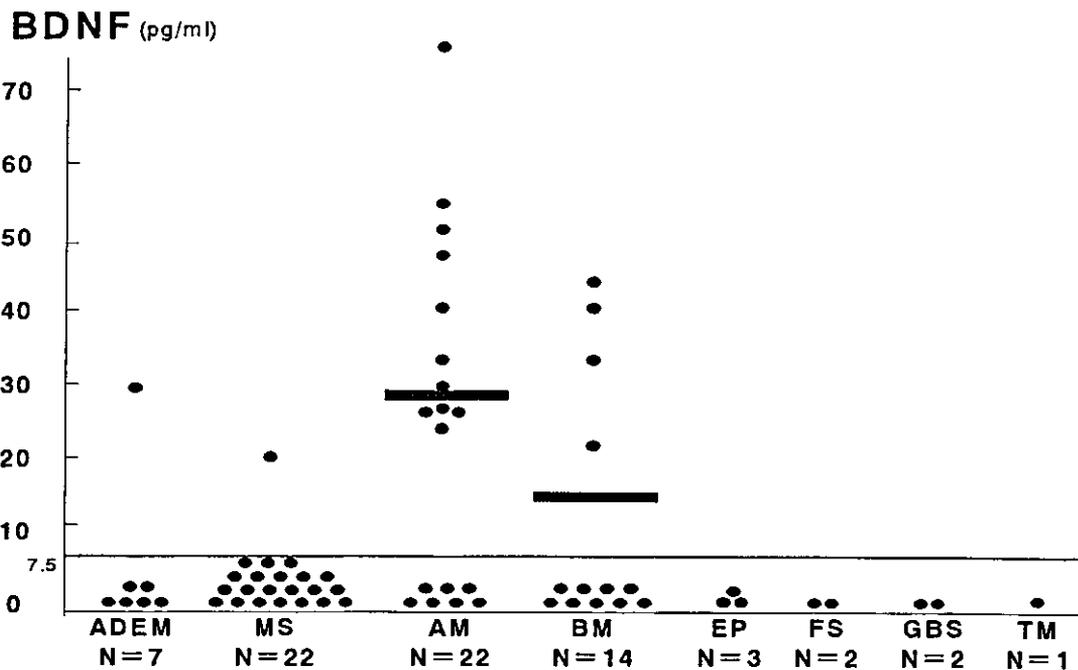


図 小児神経疾患患者と多発性硬化症患者における髄液中脳由来神経栄養因子(BDNF) 濃度

AM:無菌性髄膜炎 BM:細菌性髄膜炎 EP:てんかん FS:フィッシャー症候群 GBS:ギランバレー症候群 TM:横断性脊髄炎

結論

- 1) 本研究で測定した髄液中の神経栄養因子 (NGF, LIF, BDNF) では、BDNFのみ無菌性髄膜炎、細菌性髄膜炎で多数例の上昇を認めた。髄膜炎では、主な炎症の場であるくも膜下腔内で神経栄養因子が産生され、神経保護に働くことが予想される。
- 2) ADEMやMSなどの多くの神経疾患患者では明らかな上昇を認めなかった。神経栄養因子が主に脳実質や脊髄内の炎症局所で産生されるADEMやMSでは産生された神経栄養因子が髄液中濃度に反映されにくいと考えられる。
- 3) 神経栄養因子の髄液中濃度に関しては人種差や病型などの影響も考慮する必要がある。

文献

1. Kerschensteiner M, et al. *Ann Neurol*. 53:292304, 2003
2. Mizuno Y, et al. *J Child Neurol*. 15:191, 2000.
3. Tokunaga Y, et al. *Pediatr Neurol*. 27:10205, 2002.
4. Ichiyama T, et al. *J Neurol Sci*. 177:14649, 2000
5. Sarchielli P, et al. *J Neuroimmunol*. 132:18088, 2002.

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

急性散在性脳脊髄炎の髄液サイトカイン・ケモカインプロフィール

分担研究者 村井弘之¹⁾

共同研究者 石津尚明¹⁾、三野原元澄¹⁾、市山高志²⁾、吉良龍太郎³⁾、田中正人¹⁾、小副川学¹⁾、原寿郎³⁾、古川漸²⁾、吉良潤一¹⁾

研究要旨

急性散在性脳脊髄炎 (acute disseminated encephalomyelitis: ADEM) の免疫病態を明らかにすることを目的とし、蛍光ビーズサスペンションアレイシステムを用いて髄液サイトカイン・ケモカインの多項目同時測定を行った。ADEM 活動期の髄液では、IFN- γ 、TNF- α 、IL-2 といった Th1 サイトカインや IL-1 β 、IL-6、IL-8 といった炎症性サイトカインが有意に上昇しており、また同時に、IL-4、IL-5、IL-10、G-CSF といった Th2 サイトカインの有意な上昇もみられた。中でも IFN- γ 、IL-6、IL-8 は髄液細胞数や蛋白量と有意に相関しており、ADEM の炎症病態形成への関与が示唆された。一方でメモリーTh細胞から産生される IL-17 は ADEM 患者では全く上昇しておらず、特徴的な所見と考えられた。

研究目的

急性散在性脳脊髄炎 (acute disseminated encephalomyelitis: ADEM) は、感染症やワクチン接種などを契機に中枢神経系白質が散在性に侵される脱髄性炎症性疾患であり、主に小児や若年者に発症する。ADEM の病態は、EAE との類似性等から、ミエリン抗原に対する一過性の自己免疫反応と理解されており、感染した病原体の抗原とミエリン抗原との分子相同性

(molecular mimicry) 等により自己反応性 T 細胞が活性化すると推察されている。しかし、その免疫学的機序は未だ不明な点が多く、特に髄液サイトカイン・ケモカインを検討した報告は極めて少ない。今回我々は、ADEM 活動期の髄液サイトカイン・ケモカインを多項目同時測定し、併せて種々の臨床パラメータとの相関を検討した。

研究方法

対象は活動期の急性散在性脳脊髄炎 (ADEM) 患者 14 名 (男 6 名、女 8 名、年齢 0~16 歳、平均 6.5 歳) で、発症から髄液採取までの平均日

数は 8.5 日 (全例未治療) である。コントロール群は、検査時年齢をほぼ一致させた非炎症性神経疾患 (OND) 患者 20 名 (男 6 名、女 14 名、年齢 0~13 歳、平均 4.1 歳) とし、感染症を併発しているものは除いた。

(1) 髄液サイトカイン・ケモカイン測定：蛍光ビーズサスペンションアレイシステム (Bio-Plex) を用いて、-80°C 保存の髄液 50 μ l を使用し、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12 (p70)、IL-13、IL-17、IFN- γ 、TNF- α 、G-CSF、MCP-1、MIP-1 β の 16 種のサイトカイン・ケモカイン濃度を同時測定した。統計学的検討には non-parametric Mann-Whitney U test を用いた。

(2) 臨床パラメータとの相関：ADEM で上昇を認めたサイトカイン・ケモカインと、年齢、性別、発症から髄液採取までの日数、髄液細胞数、髄液蛋白量との相関を、Spearman's rank correlation analysis を用いて検討した。

研究結果

(1) 髄液サイトカイン・ケモカイン測定
ADEM 群では OND 群に比し、IL-1 β ($P < 0.0001$)、IL-2 ($P = 0.0008$)、IL-4 ($P = 0.005$)、IL-5 ($P = 0.01$)、IL-6 ($P < 0.0001$)、IL-8 ($P = 0.0008$)、IL-10 ($P < 0.0001$)、IFN- γ ($P = 0.01$)、TNF- α ($P = 0.001$)、G-CSF ($P < 0.0001$)、MIP-1 β

¹⁾ 九州大学医学部神経内科

²⁾ 山口大学医学部小児科

³⁾ 九州大学医学部小児科

($P=0.004$) が有意に高値であった (図)。IL-7、IL-12 (p70)、IL-13、IL-17、MCP-1 は有意差を認めなかった。

(2) 臨床パラメータとの相関

ADEM で上昇したサイトカイン・ケモカインのうち、IFN- γ と IL-6 が髄液細胞数と有意な正の相関を示した (IFN- γ : $r=0.69$, $P=0.021$, IL-6: $r=0.61$, $P=0.043$)。また、IL-8 が、髄液蛋白量と有意な正の相関を示した ($r=0.67$, $P=0.026$)。年齢、性別、発症から髄液採取までの日数と有意な相関を示したサイトカイン・ケモカインはなかった。

考察

ADEM は自己免疫性炎症性疾患であるにも関わらず、過去の髄液サイトカイン・ケモカインの報告は極めて少なく、IL-6、IL-10 の上昇と、一部の患者で TNF- α の上昇を ELISA 法を用いて検討したものが存在するのみである^{1,2}。今回の我々の検討では、ADEM 活動期において IFN- γ 、TNF- α 、IL-2 といった Th1 サイトカインの活性化を認め、それに伴い IL-1 β 、IL-6、IL-8 といった炎症性サイトカインの活性化も確認された。しかし、OS-MS や CIDP の髄液で高値を示しメモリー Th 細胞から産生される IL-17 の上昇はみられなかった。IFN- γ 、IL-6、IL-8 は髄液細胞数や蛋白量と相関しており、ADEM の炎症病態形成に重要な役割を果たしているといえる。一方で、ADEM 活動期では IL-4、IL-5、IL-10、G-CSF といった Th2 サイトカインも同時に活性化していた。これらの Th2 サイトカインの上昇は、中枢神経系の急性炎症に対する counteraction として抗炎症性に働いている可能性も考えられるが、また一方で、ADEM において抗体等を介した液性免疫の関与を示唆する報告^{3,4}もあり、炎症の増悪に関与している可能性もある。今後、継続的な変化を含めた更なる検討が必要であると考えられる。

結論

ADEM 活動期では、髄液にて多数の Th1 および Th2 サイトカインの有意な上昇がみられるが、メモリー Th 細胞の産生する IL-17 の有意な上昇はみられない。

文献

1. Ichiyama T, et al. Cerebrospinal fluid levels of cytokines and soluble tumor necrosis factor receptor in acute disseminated encephalomyelitis. *Eur J Pediatr* 161: 133-7, 2002.
2. Dale RC, et al. Interleukin-6 and oligoclonal IgG synthesis in children with acute disseminated encephalomyelitis. *Neuropediatrics* 34: 141-5, 2003.
3. Dale RC, et al. Poststreptococcal acute disseminated encephalomyelitis with basal ganglia involvement and auto-reactive antibasal ganglia antibodies. *Ann Neurol* 50: 588-95, 2001.
4. Jorens PG, et al. Encephalomyelitis-associated antimyelin autoreactivity induced by streptococcal exotoxins. *Neurology* 54: 1433-41, 2000.

健康危険情報

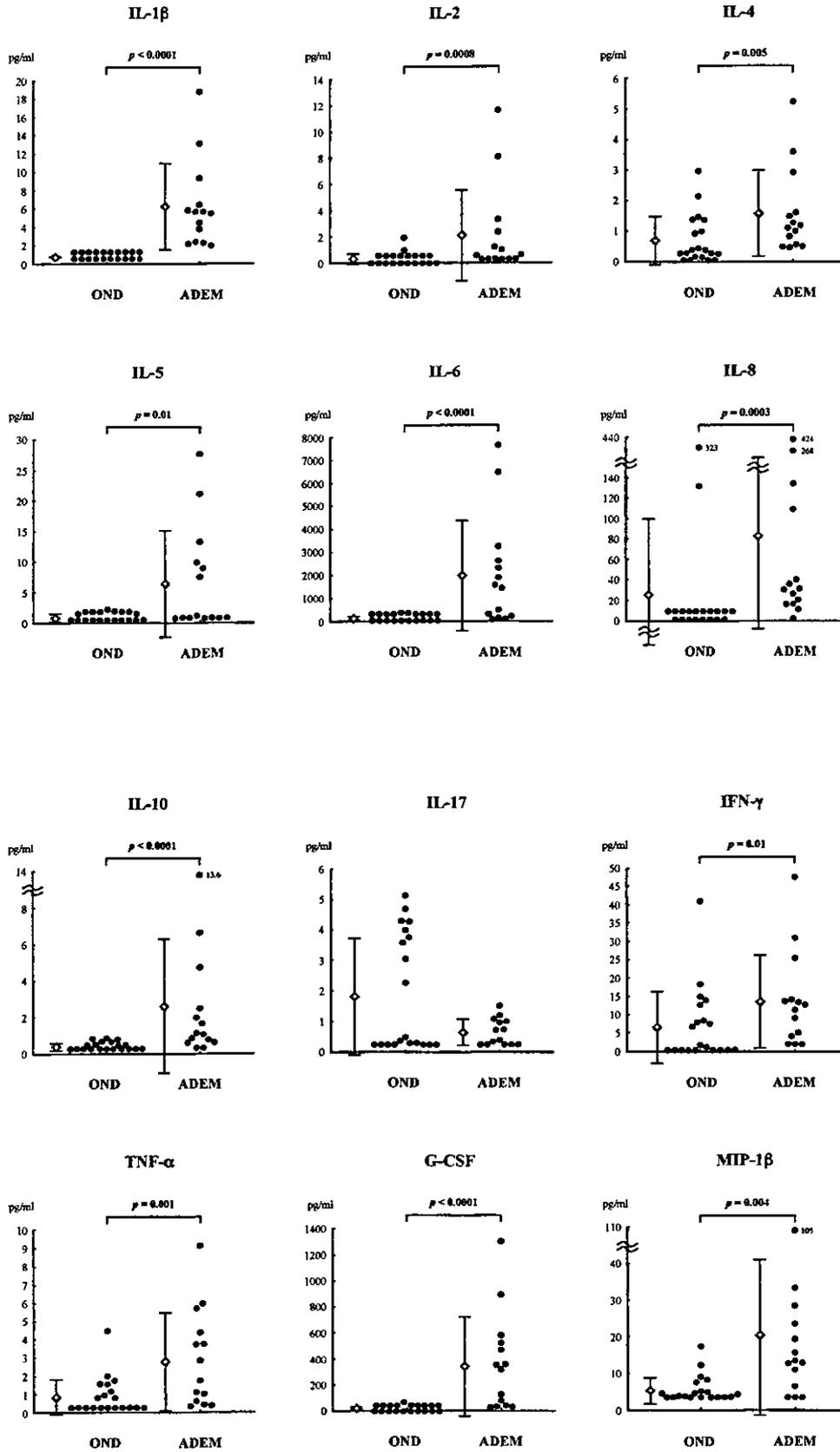
なし

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

図 ADEMの髄液サイトカイン・ケモカイン



非ヘルペス性辺縁系脳炎の髄液中サイトカインの検討

分担研究者 古川 漸¹⁾

共同研究者 市山高志¹⁾、松藤博紀¹⁾、末永尚子¹⁾、庄司紘史²⁾

研究要旨

非ヘルペス性辺縁系脳炎 (NHLE) の病因、病態は未だ明らかでない。髄液中サイトカインを測定し、本症の免疫病態を検討した。

対象は 1996 年 1 月～2004 年 11 月までに山口大学医学部附属病院小児科および久留米大学医学部附属病院第一内科に入院した NHLE 8 例。疾患コントロールとして単純ヘルペス脳炎 (HSE) 10 例、ムンプス髄膜炎 (MM) 16 例、エコーウイルス 30 型髄膜炎 (EM)。方法は髄液を用いて interleukin-6 (IL-6)、interferon- γ (IFN γ) を ELISA キットで測定した。

NHLE では髄液中 IL-6 は全例で上昇をみとめたが、髄液中 IFN γ の上昇はみられなかった。HSE では 10 例中 8 例で髄液中 IL-6 の上昇があり、その 8 例中 6 例で髄液中 IFN γ の上昇をみとめた。MM では髄液中 IL-6 は全例で上昇をみとめ、髄液中 IFN γ も 16 例中 15 例で上昇をみとめた。EM では髄液中 IL-6 は全例で上昇をみとめ、髄液中 IFN γ も 34 例中 20 例で上昇をみとめた。

IL-6 は炎症の鋭敏なマーカーである。IFN γ は抗ウイルス作用を有するサイトカインでウイルス感染症患者の血清や髄液で上昇することが知られている。HSE はウイルスの中樞神経系への直接侵襲による急性脳炎であり、髄液中 IL-6 の上昇がみられた炎症期において髄液中 IFN γ の上昇が 75% でみられた。またウイルス性髄膜炎でも髄液中 IFN γ の上昇を MM で 94%、EM で 59% でみとめた。私共はウイルスの中樞神経系への直接侵襲ではないインフルエンザ脳症において、髄液中 IFN γ の上昇がないことを報告した。NHLE でも、まだ少数例の検討ではあるが、髄液中 IFN γ の上昇はみとめず、本症の病態はウイルスの中樞神経系への直接侵襲でない可能性が示唆された。

研究目的

非ヘルペス性辺縁系脳炎 (NHLE) は近年神経内科領域で注目されつつある疾患で、様々な呼称や分類が行われているが、いまだ本症

の病因、病態は明らかでない。髄液中サイトカインを測定し、他の中樞神経系ウイルス性感染症の成績と比較検討し、本症の免疫病態を検討した。

-
- 1) 山口大学医学部小児科
 - 2) 久留米大学医学部第一内科

研究方法

対象は 1996 年 1 月～2004 年 11 月までに

山口大学医学部附属病院小児科および久留米大学医学部附属病院第一内科に入院した NHLE 8 例 (18~73 歳、平均 43 歳、男性 4 例、女性 4 例)。疾患コントロールとして単純ヘルペス脳炎 (HSE) 10 例 (26~76 歳、平均 58 歳、男性 7 例、女性 3 例)、ムンプス髄膜炎 (MM) 16 例 (2~10 歳、平均 6.3 歳、男児 15 例、女児 1 例)、エコーウイルス 30 型髄膜炎 (EM) 34 例 (1 ヶ月~8 歳、平均 5.2 歳、男児 25 例、女児 9 例)。コントロールは神経疾患の精査で採取した無熱、非感染症の 25 例 (2~14 歳、平均 5.8 歳、男性 12 例、女性 13 例)。

方法は髄液を用いて interleukin-6 (IL-6)、interferon- γ (IFN γ) を ELISA キットで測定した。

研究結果

NHLE では髄液中 IL-6 は全例で上昇をみとめたが、髄液中 IFN γ の上昇はみられなかった。HSE では 10 例中 8 例で髄液中 IL-6 の上昇があり、その 8 例中 6 例で髄液中 IFN γ の上昇をみとめた。MM では髄液中 IL-6 は全例で上昇をみとめ、髄液中 IFN γ も 16 例中 15 例で上昇をみとめた。EM では髄液中 IL-6 は全例で上昇をみとめ、髄液中 IFN γ も 34 例中 20 例で上昇をみとめた。

考察

IL-6 は炎症の鋭敏なマーカーである。IFN γ は抗ウイルス作用を有するサイトカインでウイルス感染症患者の血清や髄液で上昇することが知られている。HSE はウイルスの中樞神

経系への直接侵襲による急性脳炎であり、髄液中 IL-6 の上昇がみられた炎症期において髄液中 IFN γ の上昇が 8 例中 6 例 (75%) でみられた。またウイルス性髄膜炎でも髄液中 IFN γ の上昇を MM で 16 例中 15 例 (94%)、EM で 34 例中 20 例 (59%) でみとめた [1, 2]。私共はウイルスの中樞神経系への直接侵襲ではないインフルエンザ脳症において、髄液中 IFN γ の上昇がないことを報告した [3]。NHLE でも、まだ少数例の検討ではあるが、髄液中 IFN γ の上昇はみとめず、本症の病態はウイルスの中樞神経系への直接侵襲でない可能性が示唆された。

結論

NHLE の急性期における髄液中サイトカインを解析した。IL-6、の上昇にもかかわらず、IFN γ の上昇はみられず、本症の病態はウイルスの中樞神経系への直接侵襲でない可能性が示唆された [4]。

文献

- [1] Matsubara T, Matsuoka T, Katayama K, Yoshitomi T, Nishikawa M, Ichiyama T, Furukawa S. Mononuclear cells and cytokines in the cerebrospinal fluid of echovirus 30 meningitis patients. *Scand J Infect Dis* 2000; 32: 471-474.
- [2] Ichiyama T, Yoshitomi T, Nishikawa M, Saito K, Matsubara T, Furukawa S. Analysis of cytokine levels in cerebrospinal fluid in mumps meningitis: comparison with

echovirus type 30 meningitis. Cytokine in press

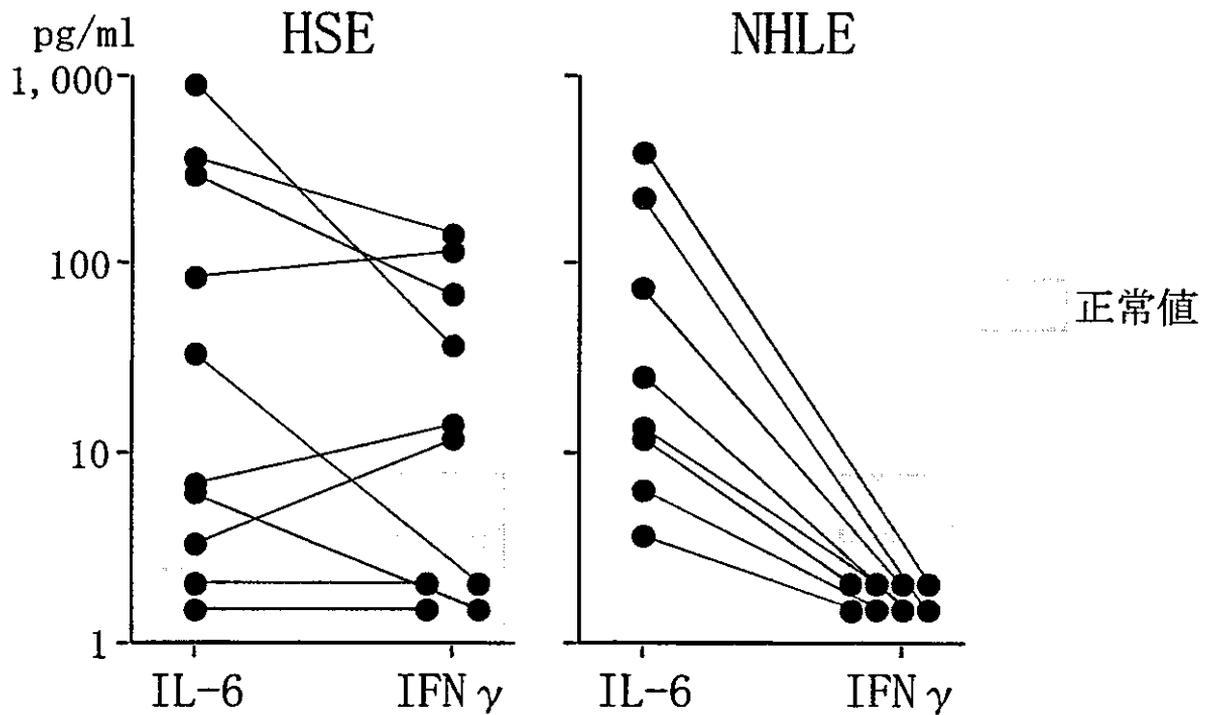
[3] Ichiyama T, Morishima T, Isumi H, Matsufuji H, Matubara T, Furukawa S. Analysis of cytokine levels and NF- κ B activation in peripheral blood mononuclear cells in influenza virus-associated encephalopathy. Cytokine 2004; 27: 31-37.
 [4] Asaoka K, Shoji H, Nishizaka S, Ayabe M, Abe T, Ohori N, Ichiyama T, Eizuru Y. Non-herpetic acute limbic encephalitis:

cerebrospinal fluid cytokines and magnetic resonance imaging findings. Intern Med 2004; 43: 42-48.

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

CSF IL-6 and IFN γ in HSE and NHLE



免疫性疾患に合併した辺縁系脳炎 3 例の特異的抗神経抗体の検討

班 員 齋藤豊和¹⁾

共同研究者 ○井出俊光²⁾, 荻野美恵子²⁾, 滝山容子²⁾, 塚原信也²⁾, 飯塚高浩²⁾, 坂井文彦²⁾

研究要旨

自己免疫疾患を伴った辺縁系脳炎の 3 症例につき特異的抗神経抗体の有無を検討した。

症例1,2はシェーグレン症候群を基礎疾患にもつ辺縁系脳炎, 症例3は重症筋無力症を基礎疾患にもち辺縁系に主病変を認めたヘルペス脳炎である。患者血清の検索では, 既存の抗神経細胞抗体(Hu,Yo,Ri抗体)はすべて陰性であった。また, ウエスタンブロットを用いたラット大脳組織に対する IgG 自己抗体の検索では, 症例1, 2, 3に共通する神経特異的抗体は認めなかった。しかし, ABC 法で発色させたラット大脳皮質を用いた免疫染色の結果では, 症例1および2は神経細胞体に染色性を認め, 症例3では神経細胞体は染まらず, 神経線維のみが染色された。このことから, 未知の抗体の関与が示唆された。

研究目的

自己免疫疾患を伴った辺縁系脳炎の特異的抗神経抗体の有無を検討した。対象として, 北里大学病院および北里大学東病院にて入院加療した自己免疫疾患を伴った辺縁系脳炎の3症例につき特異的抗神経抗体の有無を検討した。症例1および2はシェーグレン症候群を, 症例3は重症筋無力症を基礎疾患にもちヘルペス抗体価の変動を認め, 後日前立腺癌の存在が明らかとなった辺縁系脳炎である。なお, 症例1, 2の臨床像についてはすでに報告した^{1,2)}。

症例提示

症例1は 35 歳女性。感冒症状後, 記憶力障害で急性発症したが, 頭痛, 発熱, 痙攣, せん妄を認めなかった。髄液細胞数は正常, 単純ヘルペスウイルス抗体価の有意上昇は認めず, 髄液中 PCR は陰性。頭部 MRI, FLAIR 画像で両側海馬・扁桃に異常信号域を認めたが, 造影効果は欠いていた。悪性腫瘍の所見はなく, 抗 SS-A/SS-B 抗体は陽性, 小唾液腺にリンパ球浸潤を認め, 原発性シェーグレン症候群と診断した。ステロイド剤投与により画像所見と記憶力障害は徐々に改善した。

症例2は 33 歳男性。シェーグレン症候群の既往歴あり。感冒症状後, 頭痛, 発熱, 意識障害で急性発症し痙攣を認めた。髄液細胞数は 620/mm³。単純ヘルペスウイルスの抗体価に有意変動なく, PCR 法も陰性であった。頭部 MRI, 拡散強調画像, FLAIR 画像で両側側頭葉内側に異常高信号域を認めたが, 造影効果は欠いていた。悪性腫瘍の所見はなく, 抗 SS-A/SS-B 抗体は陽性であり, 脳炎発症時の

1) 北里大学医療衛生学部リハビリテーション科

2) 北里大学医学部神経内科学

抗体価が上昇を示していた。PSLパルス療法および後療法により髄液所見の速やかな改善を認めた。病変部は経過で萎縮を認め、記憶力障害を残し痙攣を繰り返した。

症例3は64歳男性。重症筋無力症(眼筋型)が基礎疾患にあり、発熱と下痢を契機に異常言動、記憶障害を主体とし急性発症した。MRIでは両側側頭葉内側、島を中心に異常信号を認め、造影効果を認めなかった。経過を通し側頭葉外側には異常所見は認めなかった。入院時髄液は細胞 $21/\text{mm}^3$ 、蛋白 49 mg/dl と軽度細胞増多を認めた。髄液IL-6は 192 pg/ml であった。入院時HSV-PCRは陰性であったが、後日ヘルペスウイルス抗体価(EIA)に有意上昇が認められた。脳炎症状はアシクロビルを使用し、PSLパルス療法および後療法で改善が認められ、抗Ach-R抗体価が脳炎発症時に上昇していること、阻止抗体も陽性であったことから辺縁系脳炎の発症に感染を契機とした何らかの免疫学的機序が関与している可能性も考えられた。なお、本例では回復期に前立腺癌の存在が明らかになり傍腫瘍性辺縁系脳炎である可能性も示唆されたが、辺縁系脳炎は前立腺腫瘍の摘出前に軽快を認めた。経過では病変部の萎縮を認め、高次機能障害が軽度残存したものの予後良好な症例である。本例はヘルペス脳炎であるが、急性非ヘルペス性辺縁系脳炎、傍腫瘍性辺縁系脳炎の鑑別を要する症例と考えられた。

研究結果

上記3症例につき抗神経抗体につき検索を行った。患者血清での抗体結果を示す(表)。抗VGKC抗体は症例1および3では陰性。抗Hu抗体、抗Yo抗体、抗Ri抗体は3症例とも陰性であった。抗CV2(CRMP-5)抗体、抗Tr抗体、

抗Ma-2抗体、抗amphiphysin抗体は症例3では陰性であった。その他については、現在検索中である。

正常ラット大脳を抗原としたウエスタンブロットではこれら3例に共通した特異抗原と思われるバンドは認められなかった(図1)。

また、ラット大脳を用いた免疫染色では症例1および2は神経細胞体に染色性を認め、症例3では神経細胞体は染まらず、神経線維のみが染色された(図2)。

考案

既報の自己免疫疾患を背景に発症した辺縁系脳炎には、基礎疾患としてSLE、シェーグレン症候群、橋本病、再発性多発軟骨炎などがあり、関与する抗体として抗VGKC抗体のほか未知の抗体が考えられている。今回の我々の検討では既存の既知の抗神経抗体は陰性であったが、ラット大脳を用いた免疫染色では神経細胞体、神経線維に結合する未知の抗体が認められ、今後の更なる検討を要すると考えられた。

結論

免疫性疾患に合併した辺縁系脳炎3例の特異的神経抗体の検討を行った。シェーグレン症候群を基礎疾患にもつ症例1、2では神経細胞体に染色性を認めた。重症筋無力症を基礎疾患にもちヘルペス抗体価の変動が認められた症例3では、神経線維に染色性を認めた。このことより辺縁系脳炎の病態に何らかの未知の抗体が関与していることが示唆された。

謝辞

今回の発表にあたり、抗VGKC抗体を測定していただいた鹿児島大学神経内科・老年病学 松浦英治、渡邊 修、有村公良先生。また、各種

抗神経細胞抗体を測定していただいた新潟大学 神経内科 田中恵子 先生に深謝いたします。

引用文献

- 1) 井出俊光, 飯塚高浩, 鈴木則宏: 自己免疫疾患を背景にもつ辺縁系脳炎. 神経内科 59: 31-37, 2003.
- 2) 井出俊光, 飯塚高浩, 塚原信也, ほか: Sjögren 症候群を合併した急性辺縁系脳炎の 2 例. 神経内科 59: 121-127, 2003.

健康危険情報

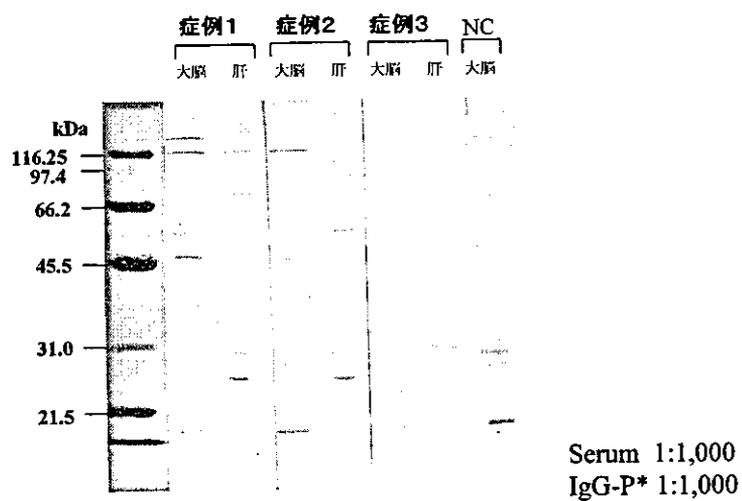
なし

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

図1

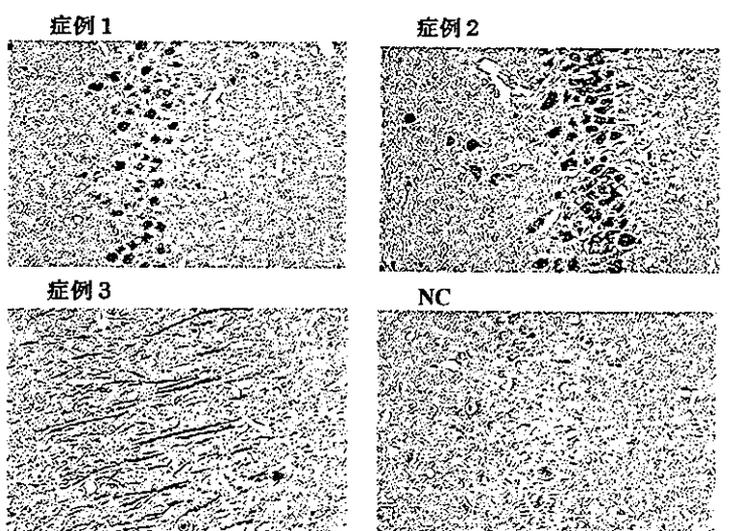


(表) 抗神經抗体 結果

	症例1	症例2	症例3
抗VGKC抗体	陰性	N	陰性
抗Hu抗体	陰性	陰性	陰性
抗Yo抗体	陰性	陰性	陰性
抗Ri抗体	陰性	陰性	陰性
抗CV2(CRMP-5)抗体	檢索中	N	陰性
抗Tr抗体	檢索中	N	陰性
抗Ma-2抗体	檢索中	N	陰性
抗amphiphysin抗体	檢索中	N	陰性

N:未檢索

図2



Serum 1:200 (x40)

と神経栄養因子 G-CSF の選択的な上昇がみられた(図 1)。IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ , TGF- β 1 は、虚血で変化がみられなかった。

2) Dexamethasone 処理により、炎症促進性サイトカイン(IL-1 β , IL-6, IL-12, GM-CSF, TNF- α)が抑制された。G-CSF は Dexamethasone 処理により分泌に影響がみられなかった。

考察

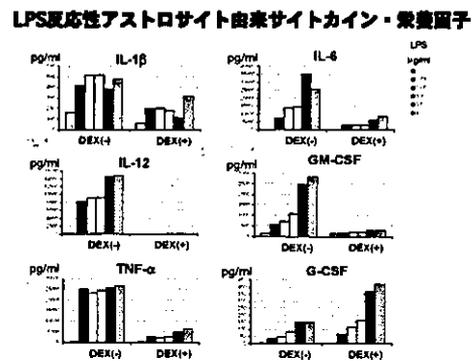
最近、マウス EAE の急性期脳で栄養因子 G-CSF の発現増強がみられ、さらに G-CSF の投与がマウス EAE に治療効果をもたらすという報告がある。我々の *in vitro* アストロサイト由来液性因子の解析結果も、炎症性サイトカインとともに G-CSF が病態の修飾因子として関与する可能性を示した。MS 急性増悪期のステロイド療法の有効性はすでに確立されているが、G-CSF の分泌増強との関連の有無や G-CSF の治療薬としての作用機序についての研究はあまりなされていない。G-CSF は造血系だけでなく神経保護作用も報告されている。脱髄疾患の病態制御の観点から G-CSF の分子機序解明は今後の課題であると考えられる。

結論

in vitro LPS 刺激培養アストロサイト由来液性因子のサイトカイン・栄養因子プロフィールの解析結果から、アストロサイトから分泌される脳炎惹起性、グリオシス誘導性サイトカインが、脱髄疾患の病態に関与している可能性が示唆された。神経栄

養因子 G-CSF は治療の点から注目され、今後の解析が必要と考えられる。

図 1



文献

Lock C. et al. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalitis. *Nature Medicine* 8: 500-507, 2002

Zayala F. et al. G-CSF therapy of ongoing experimental allergic encephalomyelitis via chemokine- and cytokine-based immune deviation. *Journal of Immunology* 169: 2011-2019, 2002

Konishi Y. et al. Trophic effect of erythropoietin and other hematopoietic factors on central cholinergic neurons *in vitro* and *in vivo*. *Brain Research* 609: 29-35, 1993

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