

多発性硬化症における CD28⁻ CD4⁺ T 細胞に関する研究

分担研究者 菊地誠志¹⁾

共同研究者 宮崎雄生²⁾, 新野正明²⁾, 佐々木秀直²⁾, 宮岸隆司⁴⁾, 深澤俊行⁴⁾, 岩渕和也³⁾, 小野江和則³⁾

研究要旨

本研究では CD28⁻ CD4⁺ T 細胞の多発性硬化症 (MS) の病態への関与につき検討した。MS 患者末梢血 CD4⁺ T 細胞中における CD28⁻ CD4⁺ T 細胞の割合は 12.02±9.13%であり、健常者 (2.66±2.06%) と比べて有意に高かった。CD28⁻ CD4⁺ T 細胞の IFN- γ 産生率は MS 患者において健常者と比べて有意に高く、MS 患者では本細胞集団が Th1 偏倚していると考えられた。また、MS 患者 CD28⁻ CD4⁺ T 細胞中に CD45RA^{high} CCR7 の表現型を示し、さらに強く Th1 偏倚を示す亜集団が含まれていることが判明した。以上から、CD28⁻ CD4⁺ T 細胞が Th1 に偏倚していることが MS 病態に関与していると考えられ、本細胞の機能を制御することが新たな治療法開発につながるものと考えられた。

研究目的

慢性関節リウマチ、Wegener 肉芽腫症や強直性脊椎炎などの自己免疫疾患の患者血中に、CD28 の発現を欠く CD4⁺ T 細胞 (CD28⁻ CD4⁺ T 細胞) が増加していることが報告されている。これら患者の CD28⁻ CD4⁺ T 細胞は大量の IFN- γ を産生し、病態の増悪に関与していると考えられている。この研究は多発性硬化症 (MS) 患者における CD28⁻ CD4⁺ T 細胞の病態への関与を検討し、本細胞を介した治療法の開発を目的とした。

研究方法

寛解再発型通常型 MS 患者 9 名、健常対照者 10 名を対象とした。MS 患者はすべて寛解期にあり、IFN β -1b、ステロイドや免疫抑制剤を含めた治療を受けている者や、視神経脊髓型 MS は含まれていない。

MS 患者、健常者より末梢血単核細胞を分離し、表面抗原、PMA/ionomycin 刺激による IFN- γ 、IL-4 産生をフローサイトメトリーで解析した。

(倫理面への配慮) 本研究は北海道大学医学部の倫理委員会において承認を受けた。研究については患者本人へ十分に説明を行い、文書で同意を得ている。個人の情報は決して表に出ることがないように細心の注意を払い、プライバシーの保護には十分に配慮した。

-
- 1) 国立病院機構札幌南病院神経内科
 - 2) 北海道大学医学部神経内科
 - 3) 北海道大学遺伝子病制御研究所免疫性物分野
 - 4) 西円山病院神経内科

研究結果

健常者では CD28⁻ CD4⁺ T 細胞の全 CD4⁺ T 細胞に占める割合は $2.66 \pm 2.06\%$ (0.47–7.89%)であったが、MS 患者では $12.02 \pm 9.13\%$ (1.68–23.03%)であり、健常者と比較して優位に高かった($p < 0.01$)。PMA/ionomycin 刺激による IFN- γ 産生率は MS 患者 CD28⁻ CD4⁺ T 細胞で CD28⁺ 分画および健常者の両分画と比べて高値であった。IL-4 産生に関しては健常者と MS 患者の間に明らかな差は認めなかった。CD28⁻ CD4⁺ T 細胞上の表面抗原を検討した結果、MS 患者の本細胞中に CD45RA^{high} CCR7 の表現型を示す亜集団が増加していることが判明した。この亜集団は PMA/ionomycin 刺激により高い IFN- γ 産生率を示すものの IL-4 産生は認めず、強く Th1 に偏倚していることが判明した。

考察

CD28⁻ CD4⁺ T 細胞は繰り返し抗原刺激を受けた T 細胞が CD28 の発現を失って出現すると考えられている。これは本細胞のテロメアが短いことや本細胞の T 細胞抗原受容体レパトアに偏りがあることなどが根拠となっている。本研究では MS 患者 CD28⁻ CD4⁺ T 細胞中に CD45RA^{high} CCR7 の表現型を示す亜集団が増加していることが明らかとなったが、このことから本細胞が特異な分化段階に位置していることが考えられた。今後は本細胞の機能が可逆的であるかどうかの検討を含めて、本細胞の制御方法開発が必要であるが、本細

胞の分化段階を明らかにすることも重要であると考えられた。

結論

MS 患者末梢血中に CD28⁻ CD4⁺ T 細胞が増加し、Th1 偏倚していることを示した。また、MS 患者の本細胞中に CD45RA^{high} CCR7 の表現型と強い Th1 偏倚を特徴とする亜集団が増加していることを示した。CD28⁻ CD4⁺ T 細胞の機能を制御することで、MS の新たな治療法が開発できる可能性があると考えられた。

文献

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 CD4⁻CD8⁻ double-negative T 細胞の特徴

分担研究者 田中恵子¹⁾

共同研究者 河内 泉¹⁾、西澤正豊¹⁾

研究要旨

CD4⁻CD8⁻ double-negative T (DNT) は、CD1d 拘束性 V α 24 π , MR1 拘束性 V α 7.2 π , $\gamma\delta$ T をはじめとした innate T (π) が豊富に含まれる重要な細胞分画である。近年、 π は自然免疫と獲得免疫の橋渡しをすることで自己免疫疾患発症に関与する可能性が示唆されており、注目を浴びている。そこで、多発性硬化症 (MS) の発症機序を解明する目的で、 π を豊富に含む DNT の機能解析を試みた。MS, その他の炎症性神経疾患, 健常者由来の単核球に発現する CD3, CD4, CD8, IFN- γ , IL-17, Foxp3 分子を検討してみると、末梢血で T π 17 と推測される CD4⁺IL-17 産生細胞は各群で差を認めなかったが、DNT 分画に着目すると、MS 群でのみ IL-17 産生細胞頻度が増加していた。以上より、IL-17 産生に特化した活性化 π が、免疫動態を修飾し、MS を疾患誘導もしくは調節している可能性がある。今後、 π がどのように T π 17 及び T π 17 に関連し、MS 病理を形成するのか、その詳細な病態機序の解明が必要である。尚、今回の実験系は、MS 病変脱髄巣ではなく、末梢単核球である。よって、T π 17 による MS 病態機序形成の主体は、末梢単核球というよりも、MS 病変脱髄巣である可能性が推測された。

研究目的

Innate T (π) 細胞は、多様性の限定された semi-invariant TCR 鎖を有し、多様性の少ない抗原を認識することで、瞬時に独自の機能を発揮する一群の細胞群である。Conventional T 細胞群とは異なり、a) MHC class Ib 分子に拘束される、b) メモリー活性化マーカーを発現し、瞬時に刺激に反応する、c) 特定組織に分布する、d) auto-reactivity を有する、e) 自然免疫と獲得免疫の橋渡しをすることで免疫バランス制御機能を発揮することが示唆されている。1) TCR mV α 14/hV α 24 を有す CD1d 拘束性 NKT (NKT/mV α 14 π /hV α 24 π) 細胞、2) TCR mV α 19/hV α 7.2 を有す MR1 拘束性 mucosal associated invariant T (MAIT/mV α 19 π /hV α 7.2 π) 細胞、3) TCR $\gamma\delta$ を有する一部の $\gamma\delta$ T 細胞は、 π 細胞群に属すると考えられ、CD4⁻CD8⁻ double-negative T (DNT) 分画の主体を構成すると考えられる。 π 細胞のひとつ MAIT/hV α 7.2 π は多発性硬化症病変局所に浸潤している (Int Immunol 2003;16:223) とする報告からも、 π 細胞は多発性硬化症の病態形成に深く関与している可能性が強く示唆されている。そこで、我々は π 細胞を多く含む DNT 分画に注目し、多発性硬化症における特徴を抽出することを試みた。

研究方法

対象は再燃寛解型多発性硬化症患者 (6 名)、他の炎症性神経疾患患者 (5 名)、健常者 (10 名) とした。対象者からの末梢血を採取し、単核球 (PBMC) を分離し、フローサイトメーターを使用し、CD3, CD4, CD8, IFN- γ , IL-17, Foxp3, 各種ケモカイン受容体分子の描出を試みた。DNT 分画の描出に関しては、CD3⁺CD4⁻CD8⁻細胞群を使用した。

研究結果

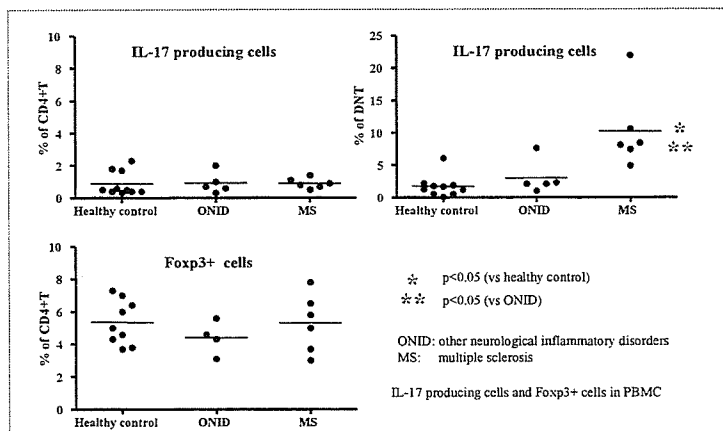
今回の実験系で得られた結果は以下の通りである。

- 1) PBMC CD4 陽性分画では、Foxp3 陽性細胞頻度に見出すことができなかった。
- 2) PBMC CD4 陽性分画では、IL-17 産生細胞頻度は各群で差を見出すことができなかった。
- 3) PBMC DNT 分画では、IL-17 産生細胞頻度は多発性硬化症群で高値であった。

考察

DNT 分画は、 $\gamma\delta$ T 細胞、MAIT/hV α 7.2 π , NKT/hV α 24 π などの innate T 細胞を多く含む分画であることから、多発性硬化症患者の末梢血には IL-17 を分泌する活性型 innate T 細胞が多く存在する可能性が示唆される。マウスで近年、同定された T π 17 細胞は、IL-17 を産生することを特徴とする CD4 陽性分画である。しかし、IL-17

1) 新潟大学脳研究所神経内科学分野



を産生する細胞は、 T_H17 系列にとどまらない。特に、マウスでは、 $\gamma\delta T$ 細胞の中に IL-17 を産生する亜群の存在および IL-23 による分泌誘導が複数の施設から報告されており、IL-17 産生 $\gamma\delta$ 細胞は何らかの特殊な機能を発揮する亜群であると推測されている。 T 細胞群は各細胞間で比較的類似の表現型を有することから、 $\gamma\delta T$ 細胞に限らず、NKT, MAIT 細胞においても IL-17 産生細胞が存在し、自己免疫疾患への関与など特殊な機能を発揮する可能性が推測される。今後は、ヒトにおいて IL-17 を産生する T 細胞の特殊性を描出すると共に、多発性硬化症をはじめとした自己免疫疾患への関与を検討する必要がある。

マウス実験的アレルギー性脳脊髄炎 (EAE) の発症機序を探る上で、新しい細胞系列の存在が明らかになっている。すなわち古典的 CD4 エフェクター細胞である T_H1 及び T_H2 に加え、新しい CD4 細胞系列 T_H17 (IL-17 産生 CD4 系列) の存在が明らかにされた。長い間、サイトカイン産生及びケモカイン受容体発現パターンから、EAE では T_H1 細胞が中枢神経組織に炎症、脱髄巣を形成すると信じられてきた。しかし、IFN- γ 受容体欠損マウス、IL-12p35 欠損マウスの解析より、 T_H1 /IFN- γ 系列細胞のみでは病態機序を説明できないという矛盾も指摘されていた。Cuoら (JEM 2005;201:233) は、IL-12 により誘導された proteolipid protein peptide (PLP) 特異的 T_H1 細胞の受動免疫では EAE を発症しないが、IL-23 により誘導された PLP 特異的 T_H17 細胞の受動免疫で重度の EAE を発症することを示している。以上より、マウスでは IL-23 及び T_H17 系列こそが「EAE 発症の鍵」となる細胞群であることが想

定されている。一方、今回、我々のヒトを対象とした実験系では、CD4 陽性分画において末梢血のレベルで多発性硬化症に特異的な IL-17 産生細胞分画を描出することができなかった。しかし、今回解析に使用した検体は末梢血であることから、病変局所である中枢神経内脱髄巣での T_H17 の存在を否定するものではない。更に、 T_H17 の描出にあたり、単一刺激ではなく、様々な刺激モジュールを検討する必要があると考える。今後は、 T_H17 にヒトホモログは存在するのか、もし存在

した場合は、ヒトホモログではどのような表現型を有するのか、ヒトでの基礎的な解析が重要であり、その上で多発性硬化症をはじめとする自己免疫疾患へ応用されるべきであると考え。

結論

多発性硬化症における CD4⁺CD8⁻ double-negative T 細胞分画には、IL-17 を産生する特殊な細胞群が存在する。

文献

1. Treiner E, Duban L, Bahram S, Radosavljevic M, Wanner V, Tilloy F, Affaticati P, Gilfillan S, Lantz O. Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1. Nat 2003;422(6928):164-169.
2. Kawachi I, Maldonado J, Strader C, Gilfillan S. MR1-restricted V α 19 μ mucosal-associated invariant T cells are innate T cells in the gut lamina propria that provide a rapid and diverse cytokine response. J Immunol 2006;176:1618-1627.
3. Croxford JL, Miyake S, Huang YY, Shimamura M, Yamamura T. Invariant V α 19 μ T cells regulate autoimmune inflammation. Nat Immunol. 2006;9:987-994.

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

多発性硬化症患者髄液中に存在する CD4⁺CD25⁺細胞測定 of 臨床的意義

分担研究者 松井 真¹⁾

共同研究者 荒谷信一¹⁾、北川陽子¹⁾、中西恵美¹⁾、松井 大¹⁾、小澤恭子²⁾、齋田孝彦³⁾

研究要旨

われわれはこれまでに、多発性硬化症患者（以下 MS）の末梢血および髄液中に存在するリンパ球の亜分画解析を行い、検査時点における疾患活動性の指標として有用ないくつかの項目を抽出することを試みてきた。今回、中長期的予後の指標として使用可能な検査項目を抽出することを目的に、入院中に末梢血および髄液検査を施行し得た症例で、その後1年以上にわたり再発の有無を追跡する調査を行った。その結果、末梢血中にはMSの中期的予後と関連するリンパ球亜分画は存在せず、唯一、髄液中のCD4+CD25+細胞の存在率が3ヶ月以内に起こる再発（疾患活動性の上昇）と関連していた。したがって、髄液CD4+CD25+細胞はongoingの疾患活動性上昇の指標であり、しかもCD4+CD25^{high}細胞に属するという従来のわれわれの知見を合わせ考えると、MS患者髄液中に存在するCD4+CD25+細胞の機能については、Foxp3遺伝子産物の有無などによる解析が急務であると考えられた。

研究目的

われわれはこれまでに、多発性硬化症（以下、MS）患者末梢血および髄液中に存在するリンパ球の亜分画解析を行い、検査時点における疾患活動性の指標として有用ないくつかの項目を抽出することを試みてきた。今回、中長期的予後の指標として使用可能な項目を選定することを目的に、以下の解析を行った。

研究方法

1) 対象

対象はIFN-βなどの免疫修飾薬治療を受けておらず、かつ安定期（3ヶ月以上神経学的に不変で、直近の頭部MRI検査でも造影病巣が検知されない）の再発寛解型MS患者（MS群）34名と、18名の非炎症性神経疾患患者（対照群）である。

2) 臨床的指標

診断を確かなものとするために、あるいは疾患活動性の評価を行う目的で、入院中

- 1) 金沢医科大学脳脊髄神経治療学神経内科学
- 2) 洛和会音羽病院リハビリテーション部
- 3) 国立病院機構宇多野病院神経内科

に末梢血および髄液の免疫学的な検索を施行した。退院後、MS群では最低1年間、原則として1-3ヶ月ごとに撮像される造影MRIと神経学的診察で臨床経過を追跡調査した。

臨床的に神経症状の増悪が認められるか、あるいはMRI上に造影病巣が検知されるまでの期間を非再発期間と定義した。

3) フローサイトメトリー

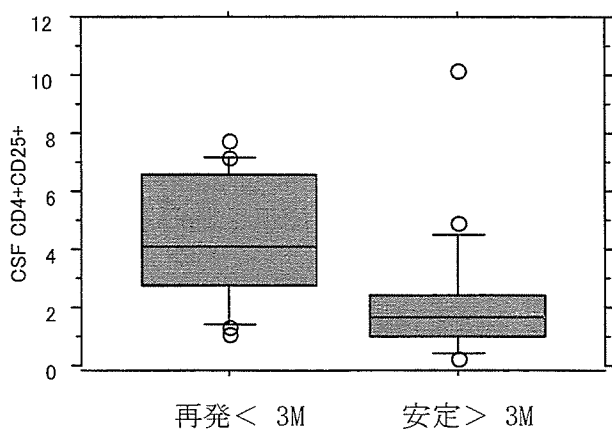
末梢血サンプルからはFicoll-Paque比重遠沈法で、髄液サンプルからは低温低速遠沈法で単核球を分離後、CD4およびCD8細胞表面上におけるCD11a, CD25, CD26, CD29, CD45RA, CCR4, CXCR3等の抗体を用いて4℃で30分間染色し、フローサイトメトリーにより蛍光陽性細胞を算定した。（倫理面での配慮）

本研究は、主として宇多野病院で行われ、同院の倫理委員会で承認を受けた。患者さんからはインフォームド・コンセントを得、同意を得られた場合にのみ検査を行うとともに、プライバシーの保護には十分に配慮した。

	A	B	C	D	E	対照群	p value
	再発 ≤ 1M	1M < 再発 ≤ 3M	3M < 再発 ≤ 6M	6M < 再発 ≤ 12M	非再発 > 12M		
CD4 ⁺	66.8	63.6	58.6	64.7	71.3	62.0	NS
CD4 ⁺ CD25 ⁺	3.7*	4.9*	3.3	1.3	1.8	1.9	0.0024
CD4 ⁺ CD26 ⁺	39.4	37.2	37.2	35.0	37.7	41.9	NS
CD4 ⁺ CD29 ⁺	63.4	59.1	57.3	58.7	63.2	54.6	NS
CD4 ⁺ CD45RA ⁺	22.5	19.8	18.9	19.8	24.8	20.6	NS
CD4 ⁺ CCR4 ⁺	3.6	3.4	1.9	3.8	3.5	NT	NS
CD4 ⁺ CXCR3 ⁺	53.2	48.9	41.1	59.4	57.6	35.9	NS
CD8 ⁺	20.0	27.5	29.2	21.6	23.8	26.7	NS
CD8 ⁺ CD11a ⁺	7.4	13.2	28.5	8.7	21.6	19.5	NS
CD8 ⁺ CXCR3 ⁺	27.2	24.6	42.1	21.1	14.9	9.6	NS

統計学的解析はまず Kruskal-Wallis 検定を施行し、つぎに Mann-Whitney U 検定を行った。

* D と E および対照群に対して有意差あり。



研究結果

27名のMS患者が1年以内に疾患活動性の上昇を示した。そこに至るまでの期間でサブグループ解析をすると、髄液CD4+CD25+細胞存在率のみが各群間を識別し(表)、さらに対照群の平均値+2SD値を越えると3ヶ月以内の再発リスクが高かった(図)。

表は髄液細胞の検索結果を示す。

A群：1ヶ月以内に再発

B群：1～3ヶ月で再発

C群：4～6ヶ月で再発

D群：7～12ヶ月で再発

E群：1年を越えて再発なし

結論

末梢血中にはMSの中期的予後と関連するリンパ球亜分画は存在せず、唯一、髄液中のCD4+CD25+細胞の存在率が3ヶ月以内に起こる再発(疾患活動性の上昇)と関連していたことから、髄液中に存在する同細胞中のFoxp3遺伝子産物発現の有無を確認することが急務である。

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

ヒトの Th17 細胞は CCR 2 陽性 CCR 5 陰性の表現型を示す

分担研究者 山村 隆¹⁾

共同研究者 佐藤 和貴郎¹⁾、荒浪 利昌¹⁾

研究要旨

IL-17 産生性 CD4 陽性 T 細胞は、臓器特異的自己免疫疾患の発症に重要な細胞として最近注目されている。この CD4 陽性 T 細胞は Th1 細胞や Th2 細胞と異なる分化経路を辿ることがマウスの *in vitro* の系で証明され、Th17 と呼ばれている。この Th17 細胞がどのようなケモカイン受容体を発現しているかについての報告はまだない。今回我々はヒトの Th17 細胞が CCR2 陽性 CCR5 陰性の表現型をもつことを報告する。メモリー CD4 陽性 T 細胞を CCR2 陽性と陰性に分離して刺激すると、CCR2 陽性細胞の方が IL-17 および IFN- γ を多く産生した。この CCR2 陽性細胞は CCR5 陽性と CCR5 陰性の亜集団にさらに分離することができ、CCR2 陽性 CCR5 陽性細胞(ダブルポジティブ細胞)は主として IFN- γ を産生するのに対し、CCR2 陽性 CCR5 陰性細胞(シングルポジティブ細胞)は主として IL-17 を産生した。また T-bet の発現をみるとシングルポジティブ細胞の T-bet の発現はダブルポジティブ細胞に比べて低かった。以上から、ヒトの Th17 細胞は CCR2 陽性 CCR5 陰性メモリー CD4 陽性 T 細胞(シングルポジティブ細胞)として同定・分離可能である。

研究目的

IL-17 産生性 CD4 陽性 T 細胞 (Th17 細胞) は、多発性硬化症のマウスモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) では発症に必須であるが、多発性硬化症における意義は不明である。マウスでは Th17 細胞は IFN- γ 産生性の Th1 細胞とは別の分化経路を辿ることが証明されているが、ヒトにおける確かな知見はまだない。今回、ヒトの Th17 細胞が、ケモカイン受容体の発現パターンによって Th1 細胞と区別・分離が可能であることを報告する。

研究方法

健康人の末梢血からリンパ球を分離後、磁気ビーズにて T 細胞やメモリー CD4T 細胞を分離した。ケモカイン受容体の発現をフローサイトメトリーで調べた。さらに磁気ビーズにて CCR5 および CCR2 の有無で細胞を分けた。CCR2 陽性細胞についてはセル・ソーターを用いて CCR5 の有無で細胞を分離した。得られた細胞を PMA とイノマイシンで 24 時間刺激し、上清中のサイトカイン量を ELISA を用いて測定した。CCR2 陽性および陰性の細胞については、ELISPOT 法で IFN- γ と Th17 の産生細胞数を調べた。最後に、Th1 細胞の分化に必須である T-bet の発現を細胞内サイトカイン法で調べた。

1) 国立精神・神経センター 神経研究所
免疫研究部

(倫理面への配慮) 本研究は、国立精神・神経センターの倫理規定を遵守して行った。血液サンプルはボランティアからの提供である。

研究結果

T 細胞を CCR5 陽性と CCR5 陰性細胞に分離した場合、CCR5 陽性細胞の方が CCR5 陰性細胞に比べ、IFN- γ の産生は高かったが、IL-17 の産生は差がなかった。一方、CCR2 陽性と CCR2 陰性細胞に分離した場合は、CCR2 陽性細胞の方が CCR2 陰性細胞に比べ、IFN- γ だけではなく、IL-17 も高かった。この結果はメモリーCD4T 細胞を CCR2 陽性と陰性細胞に分離した場合も同様であった。また、ELISPOT 法で産生細胞の頻度をみても同様の結果であった。すなわち、Th1 および Th17 は CCR2 陽性分画に主として含まれていると考えられた。

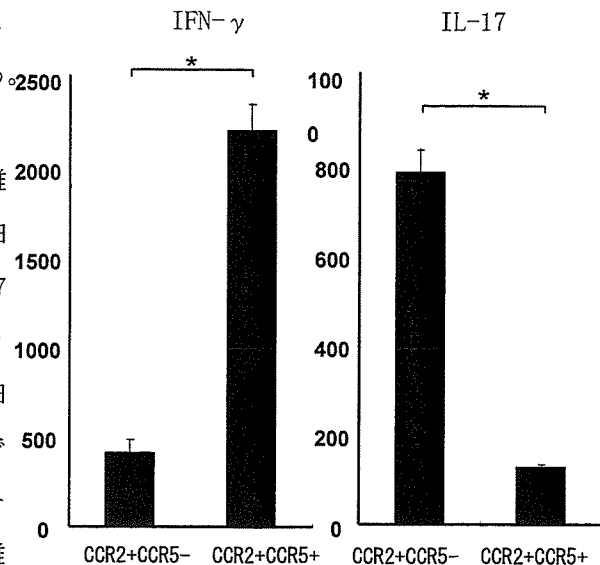
CCR2 陽性細胞は CCR2+CCR5- (シングルポジティブ: SP) と CCR2+CCR5+ (ダブルポジティブ: DP) の2つの分画から成り、SP の細胞は主として IL-17 を、DP の細胞は主として IFN- γ を産生していた。(図1)

T-bet の発現を SP と DP の二つの分画で比較したところ、SP の分画の細胞は DP の分画の細胞に比べて T-bet の発現が有意に低かった。

考察

Th1 は CCR2 陽性 CCR5 陽性の分画に存在するのに対し、Th17 は CCR2 陽性 CCR5 陰性の分画に存在することが判明した。Th17 と Th1 はケモカイン受容体の発現パターンにより区別可能であり、両者の生体内での動態が異なることや分化経路が異なる可能性を示唆する。

図1



ヒトの末梢血からメモリーCD4陽性T細胞を分離後、セル・ソーターを用いてケモカイン受容体の発現によって細胞を分離し、PMAとionomycinで24時間刺激し産生されたサイトカインをELISA法にて測定した。*P<0.01

結論

ヒトのTh17はケモカイン受容体の発現で見るとCCR2陽性CCR5陰性の分画に含まれる。

文献

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 CD69 陽性 T 細胞の診断および再発マーカーとしての有用性

分担研究者 松尾秀徳¹⁾

共同研究者 松屋合欽¹⁾、溝田貴光¹⁾、川村和之¹⁾、近藤誉之¹⁾、澁谷統壽¹⁾、小森美華²⁾、
田中正美³⁾、齊田孝彦³⁾

多発性硬化症において、MRI 以外の簡便な手法で再発の診断が可能となるマーカーの確立は有用と考えられる。今回、我々は T 細胞の早期活性化マーカーとして知られる CD69 分子の発現を健常人、多発性硬化症寛解期、再発時で解析した。また、T 細胞をミエリン抗原で刺激した 4 時間後の CD69 発現の変化が再発の指標となるかを検討した。同一の MS 患者においては寛解期に比して再発時に CD4 陽性 CD69 陽性 T 細胞の増加を認めた。また再発時にミエリン抗原で刺激すると刺激前に比して CD69 陽性 T 細胞の減少がみられた。

CD69 陽性 T 細胞の頻度は MS の診断、再発の指標となる可能性がある。CD69 陽性 T 細胞のペプチドによる抑制は MS 再発の指標となりうると考えられた。

研究目的

多発性硬化症 (MS) はミエリン抗原特異的 T 細胞が活性化して関与する自己免疫疾患と考えられている。MS の再発の診断には、MRI がもっとも確実な検査所見として用いられるが、MRI で陽性所見が得られない症例もある。また、症例によっては MRI 検査自体が施行できない場合がある。

CD69 分子は、*in vivo* および *in vitro* において活性化した T 細胞で特に早期に発現する細胞表面糖タンパクである。今回、我々は健常人と再発時および寛解期の MS 患者で CD69 の発現頻度を比較することで、CD69 が MS 再発時のマーカーとして有用か否かの検討を行った。

また、ミエリン塩基性蛋白 (MBP)、ミエリン希突起膠細胞糖蛋白ミエリン抗原 (MOG) などのミエリン抗原を添加した場合、CD69 の発現頻度に変化がみられるかどうか併せて検討した。

研究方法

MS 患者 3 名と、健常人 3 名より分離し凍結保存した PBMC を対象とした。このうち MS 患者 3 名については、インフォームドコンセントを得て再発時、寛解期の両方で検体を採取した。

未刺激 T 細胞の解析：抗 CD69-FITC (HN50, BD)、抗 CD3-PE (UCHT1, BD)、抗 CD4-PE cy5 (RPA-T4, BD) で染色した後に flow cytometry (FACS Calibur、BD Biosciences) にて解析した。

ペプチド刺激後 T 細胞の解析：10 μ g/ml の MBP83-99 (ENPVVHFFKNIIVTPRTP) を刺激ペプチドとして AIM-V (Invitrogen) 内の 5x10⁵ の PBMC に添加し、4 時間後に CD3、

-
- 1) 国立病院機構長崎神経医療センター神経内科・臨床研究部
 - 2) 京都大学神経内科
 - 3) 国立病院機構宇多野病院神経内科

表 1. MS 患者(MS1-3)、健康人(HS1-3)の CD69+T 細胞

患者	年齢	性	再発 /寛解	CD4+CD69 + /CD3+**	CD4-CD69+ /CD3+**	*/**
MS1	51	女性	再発	9.74	3.40	2.86
			寛解	0.49	0.37	1.32
MS2	14	男性	再発	2.15	1.85	1.16
			寛解	1.52	1.98	0.77
MS3	53	女性	再発	0.41	0.31	1.32
			寛解	0.26	1.28	0.20
HS1	45	男性		0.00	0.48	0.00
HS2	35	男性		0.26	1.12	0.23
HS3	22	女性		4.36	1.71	2.55

CD4、CD69 の発現を解析した。

いずれも解析はリンパ球ゲートした後に CD3+細胞を選択した上で、CD69+細胞の発現頻度と、その中で CD4+細胞と CD4-細胞の頻度を比較して行った。

(倫理面への配慮) 血液の採取に当たっては、研究の目的・意義、検体の使用・保存について説明し同意を得て行った。

研究結果

表 1 に示すように、MS 患者のうち 1 名 (MS1)では CD4+CD69+T 細胞の頻度が、寛解期 0.49%に比して再発時 9.74%と著明に増加していた。MS2、3 でも寛解期と再発時の差は著明ではないものの再発時に CD4+CD69+T 細胞の増加傾向がみられた。

また、MS 患者では CD4+CD69+ T 細胞の CD4-CD69+に対する比が再発時に増加していた。

MBP83-99 刺激 4 時間後の解析結果を未刺激状態と比較すると、MS1 の再発時には CD4+CD69+T 細胞が MBP 刺激後に 2.71%と減少を示した。MS2、3 の症例でも再発時に MBP 刺激によって CD4+CD69+T 細胞の減少がみられたが、寛解期、および健康人の PBMCではこのような減少はみられなかった。

MBP の他、MOG13-28、PLP139-154 で刺

激した場合も、MS 再発時の PBMC において刺激後の CD4+CD69+T 細胞の減少を同様に認めた。

この反応はペプチドを加えた結果、活性化されている CD69+T 細胞の細胞死が誘導された結果によるものである可能性があり、抗原特異性といえるかどうかは検討の必要がある。

考察

これまで MS の再発のマーカーとされたものに髄液中 CD25 がある。しかし末梢血では再発時と寛解期で CD25 の発現に明らかな変動はみられなかった。今回検討した CD69 は同一の MS 患者より得られた PBMC にて再発時の上昇がみられたことから、より簡便な手法で得られる再発のマーカーとなる可能性があると考えられた。

今回は症例が非常に少なく、最終的な結論を得るにはさらに症例数を増やして検討する必要があると思われる。

結論

同一の MS 患者においては再発時に CD4+CD69+T 細胞の増加がみられた。CD69+T 細胞の頻度は MS の診断、再発の指標となる可能性がある。また CD69+T 細胞のペプチドによる抑制は MS 再発の指標となりうる。ミエリン抗原による CD69+T 細胞の抑制が抗原特異的反応であるかどうかは今後検討が必要である。

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

実用新案登録：なし

末梢血樹状細胞分画検索ルーチン化の試み

分担研究者 松井 真¹⁾

共同研究者 荒谷信一¹⁾、北川陽子¹⁾

研究要旨

多発性硬化症 (MS) 患者の病型を規定する要因として、Th2 細胞の誘導を行うとされる II 型樹状細胞の前駆細胞である natural interferon-producing cell (IPC) の機能の相違が挙げられることを平成 17 年度の班研究で指摘した。今年度は、IPC 検索に加えて、lineage-specific marker を持たない白血球を、IL-3 レセプター α 鎖 (CD123) と CD11c および HLA-DR 抗原の発現により plasmacytoid DC (P-DC) と myeloid DC (M-DC) に識別する方法をルーチン検査化し、MS や神経感染症患者の病態把握の一助とすることを試みた。その結果、P-DC および M-DC の末梢血での存在率の測定はむしろ母集団をどのようなものとするかが課題であることが判明した。一方、末梢血 IPC 存在率のモニタリングは、中枢神経感染症の予後の推定に役立つ可能性が示唆された。

研究目的

H17 年度の班会議では、II 型樹状細胞 (DC) の前駆細胞とされる natural interferon (IFN)-producing cell (IPC) について、再発寛解型多発性硬化症患者では活動性に関わらず健常人よりも低い値を示し、健常人と同レベルを示す一次性進行型 MS 患者とは DC の関与が異なる可能性を指摘した。今回、IPC 検索に加えて、lineage-specific marker を持たない白血球を、IL-3 レセプター α 鎖 (CD123) と CD11c および HLA-DR 抗原の発現により plasmacytoid DC (P-DC) と myeloid DC (M-DC) に識別する方法をルーチン検査化し、MS や神経感染症患者の病態把握の一助とすることを試みた。

研究方法

1) 対象

対象は活動期 MS 患者 3 名、ウイルス性髄膜炎 7 名、ALS などの非炎症性神経疾患 (疾患対照群) 5 名である。

2) IPC の解析

末梢血より Ficoll-Paque 比重遠沈法を用

1) 金沢医科大学脳脊髄神経治療学神経内科学

いて単核球を分離し、洗浄して一部を 50 μ l の PBS に浮遊させた後、昨年度報告書の通り、4 $^{\circ}$ C で 30 分間染色した。IPC-enriched zone に焦点を当て、BD 社製のフローサイトメーター Canto を使用して、以下のリストに示すモノクローナル抗体を使用して CD4+CD3-CD11c-CD14-CD16-CD20- の表面抗原を備えた IPC を同定し存在率を測定した。

Anti-CD3-FITC (BD)

Leu3a (CD4)-PE (BD)

Anti-CD11c-FITC (DAKO)

Anti-CD14-FITC (BD)

Anti-CD16-FITC (Coulter)

Anti-CD20-FITC (Coulter)

3) DC の解析

全血を用い、FITC 標識の抗 CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56 の各抗体に染まらない lineage-negative 細胞集団に的を絞り、その中で、CD123^{high}CD11c-HLA-DR+ を P-DC、CD11c^{high}CD123^{low}HLA-DR+ を M-DC と同定した。使用抗体は、以下の通りである。

Anti-CD123-PE (BD)

Anti-CD11c-APC (BD)

Anti-HLA-DR-PerCP (BD)

表：末梢血IPCおよびDC存在率(%)

患者	IPC	P-DC	M-DC
MS（活動期）	0.89 ± 0.77	0.09 ± 0.06	0.18 ± 0.13
神経感染症	1.33 ± 1.16	0.09 ± 0.07	0.19 ± 0.16
非炎症性神経疾患	2.10 ± 1.58	0.11 ± 0.08	0.21 ± 0.09

IPCはIPC-enriched zone内の単核球に対して、またDCは全白血球に対しての存在率で表示している。

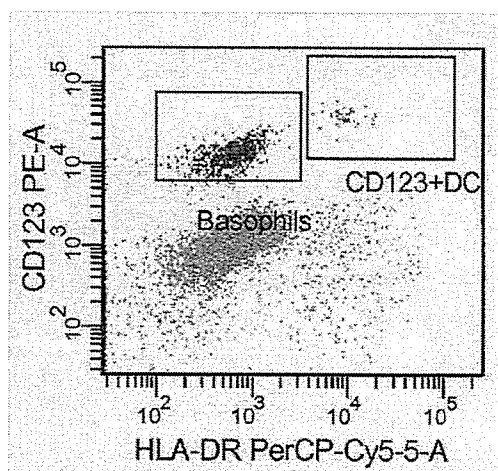


図1：P-DCの同定（右上の枠内）

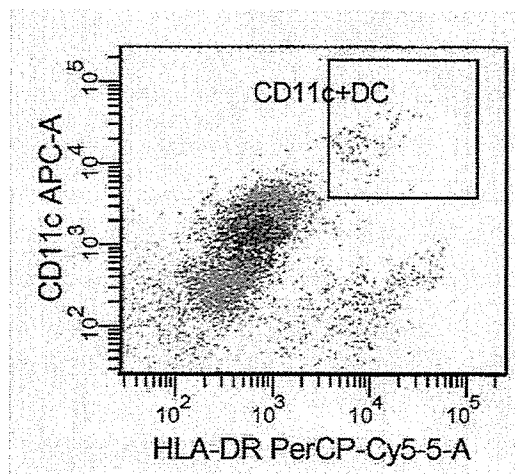


図2：M-DCの同定（右上の枠内）

倫理指針を遵守して行った。患者からはインフォームド・コンセントを得て、同意を得られた場合にのみ検査を施行した。個人情報として特定されぬよう、プライバシー保護には十分に配慮した。

研究結果と結論

P-DCは図1のような、またM-DCは図2のような、明確な細胞集団として同定可能であった。

IPC、P-DC、M-DCのいずれも上記3群の間に有意差は認められなかった(表)。しかし、経過を追えたウイルス性髄膜炎患者では、病極期にはIPCが激減し、症状の回復とともに疾患対照群のレベルに近づいた。

P-DCおよびM-DCは、IPCが全単核球に対する割合ではパラメータとして有用ではなかったのと同様に、全白血球よりもnon-lineage細胞を母集団として存在率を計測することを試みるべきであると考えられた。

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

(倫理面での配慮)

多発性硬化症における髄液中のアンジオテンシ II 濃度

分担研究者 吉良潤一³⁾

共同研究者 川尻真和¹⁾, 茂木正樹²⁾, 小副川学³⁾, 松岡隼³⁾, 堀内正嗣²⁾, 三木哲郎¹⁾

研究要旨

背景: 神経細胞の分化, 保護, 再生へのレニン-アンジオテンシン系(RAS)の関与が報告されているが, 脱髄性疾患における RAS についての検討は少ない。

目的: 脱髄性疾患における RAS の関与について検討。

対象と方法: 多発性硬化症(MS)21 例, 炎症性ニューロパチー23 例(CIDP15 例, ギラン・バレー症候群 8 例), other non-inflammatory neurologic disease (OND)15 例(脊髄小脳変性症 9 例, 非神経疾患 6 例)の髄液中のアンジオテンシン2 (Ang2)を ELISA 法で測定し, 有意差を検討。

結果: 髄液中 Ang II は, MS 群で 3.79 ± 1.54 pg/ml, 炎症性ニューロパチー群で 5.13 ± 2.27 pg/ml, OND 群で 6.77 ± 2.39 pg/ml であった。

結論: 髄液中 Ang2 は, MS 群で OND 群に対して有意に低下していた($P=0.00276$)。Ang2 が MS の病態に関与している可能性が示唆された。

研究目的

アンジオテンシン II (Ang II) は, レニン・アンジオテンシン系 (RAS) の主要な働きを持つ血管作動性物質で, 循環 RAS は血圧調節やアルドステロンの分泌作用などにより心血管系疾患の発症・進展に影響を与えているが, 最近様々な組織における“組織 RAS”の働きが注目され, 中枢神経においても RAS が何らかの働きを持つことが示唆されている。Ang II は主に 1 型 (AT_1) と 2 型

(AT_2) の受容体に結合するが, AT_2 受容体のノックアウトマウスでは中大脳動脈閉塞による脳梗塞モデルを作成すると梗塞巣の大きさが拡大することや⁽¹⁾, 梗塞後の認知機能がより低下する⁽²⁾。また, AT_2 受容体からのシグナルの活性化により神経の分化が促進されることもわかってきた^{(3) (4)}。そのメカニズムとして AT_2 受容体シグナルの下流にユビキチン結合酵素のバリエーションの一つである MMS2 という蛋白の上昇が関連し, MMS2 の上昇には AT_2 受容体関連蛋白 (ATIP) とチロシン脱リン酸化酵素 (SHP-1) の活性化と複合体の形成が必要ながわかってきた⁽⁵⁾。

1) 愛媛大学医学部老年内科神経内科

2) 愛媛大学医学部分子心血管生物・薬理学

3) 九州大学医学部神経内科

SHP-1 は AT₂ 受容体で活性化することが以前から報告されてきたが, SHP-1 の欠如した me(v+/-) マウスで自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) モデルを作成すると EAE の症状が悪化することが報告されており⁽⁶⁾, Ang II により活性化する SHP-1 と EAE マウスとの間に何らかの関連がある可能性が示唆される。しかし, これまでに多発性硬化症 (MS) と RAS についての検討はほとんど行われておらず, 今回我々は MS 患者における脳脊髄液中の Ang II の濃度について検討を行ったのでここで報告する。

研究方法

多発性硬化症 (MS) 21 例 (CMS 15 例, OSMS 6 例, 男性 5 例, 女性 16 例, 15 歳～68 歳, 平均 39.9 歳, EDSS 4.3±2.6, 離病期間 36±39 ヶ月, 再発寛解型 20 例, 1 次進行型 1 例, 髄液は初発時あるいは再発時で, ステロイド薬や免疫抑制薬による治療前のもの, IFN-β 投与例は 2 例のみ), 炎症性ニューロパチー 23 例 (CIDP 男性 13 例, 女性 2 例, ギラン・バレー症候群 男性 5 例, 女性 3 例, 16 歳～78 歳, 平均 51.3 歳), other non-inflammatory neurological diseases (OND) 15 例 (脊髄小脳変性症 (SCD) 9 例, 非神経疾患 6 例, 男性 5 例, 女性 10 例, 24 歳～77 歳, 平均 47.9 歳) である。全例とも RAS に影響を与える可能性のあるステロイド薬, 降圧薬の投与は行われていない時期の髄液を用いた。OSMS に NMO や NMO-IgG 陽性例は含まれていない。

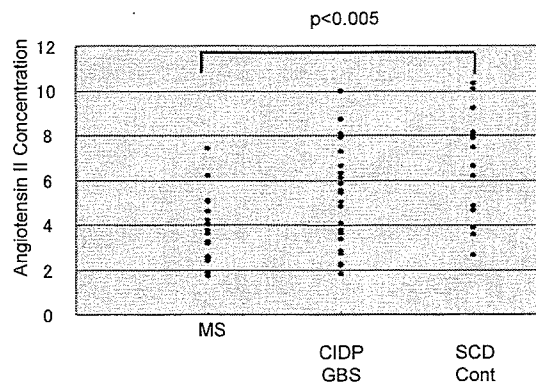
方法: 髄液中の Ang II を ELISA 法で測定し,

3 群比較で Kruskal-Wallis H test で有意な差を認めた場合に, Mann-Whitney U test を行い, Bonferroni-Dun's correction にて補正し有意差を検討した。

本研究は, 九州大学の倫理規定を遵守して行った。患者さんからはインフォームド・コンセントを得, 同意を得られた場合にのみ研究をおこなった。

研究結果

髄液中 Ang II は, MS 群で 3.79±1.54 pg/ml, 炎症性ニューロパチー群で 5.13±2.27 pg/ml, OND 群で 6.77±2.39 pg/ml であった。したがって, 髄液中 Ang II は, MS 群で OND 群に対して有意に低下していた (P=0.00276)。



結論

髄液中 Ang II は, MS 群で OND 群に対して有意に低下していることから, Ang II が MS の病態に関与している可能性が示唆された。

文献

1. Iwai, M. et al :Circulation 110, 843-848, 2004
2. Mogi, M. et al : Hypertension 48, 141-148,2006

3. Li, J. et al : FASEB J 19, 617-619,2005
4. Reinecke, K. et al : FASEB J 17, 2094-2096,2003
5. Li, J. et al : Stroke 37, 677,2006
6. Deng, C. et al : J Immunol 168, 4511-4518,2002
7. Constantinescu, C. S. et al : Immunopharmacol Immunotoxicol 17, 471-491,1995

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

MxA 遺伝子調節領域における一塩基変異の多発性硬化症に対する病理学的意義の検討<第2報>

分担研究者 千葉 進¹⁾
共同研究者 古山裕康^{1,2)}、松下隆司²⁾、岡林環樹³⁾、横田伸一³⁾、野中道夫²⁾、
今井富裕²⁾、藤井暢弘³⁾、下濱 俊²⁾

研究要旨

目的: I 型インターフェロン(IFN)で誘導される MxA 蛋白は、多発性硬化症(MS)の IFN 療法に対する中和抗体の間接マーカーとして使用される一方、アポトーシスを含む細胞機能を修飾する事によってウイルスの増殖を抑制していると考えられている。今回、遺伝学的/病理学的要素としての MxA 蛋白の MS における役割を検討した。 **方法:** MS 群および対照群について MxA 調節領域の一塩基変異(SNP)を比較した。次いで、SNP の機能面を検討するため患者由来および変異を加え増幅した種々の長さの MxA 調節領域についてルシフェラーゼアッセイを行った。 **結果:** MS 群において、MxA の過剰発現に關与するハプロタイプが高頻度に観察された。また、IFN 処理状態においては nt-88 の SNP が主に発現を修飾するのに対し、未処理状態では nt-123 の SNP が主体となる事が明らかとなった。 **結論:** MxA 調節領域の SNP は MS の病態生理に關与している可能性が示唆され、また、その発現制御が MS の治療戦略に新たな方向性を提供しうる可能性も示された。

目的

Myxovirus resistance protein A (MxA)は I 型 IFN (IFN- α / β) によって誘導される、ダイナミンスーパーファミリーに属する GTPase であり、インフルエンザウイルス等一本鎖 RNA ウイルスの増殖を抑制すると考えられている。MxA 遺伝子あるいは MxA 蛋白の発現量は、多発性硬化症(MS)に対する IFN- β 治療の効果を減弱せしめる中和抗体の間接指標として有用であり、また MxA 遺伝子の調節領域の SNP によって type I IFN への反応性が異なることが示されている。更に、MxA はアポトーシスを含めたシグナル伝達に影響を及ぼしている可能性も示されている。昨年我々は、この MxA 調節領域において -88T と -123A という SNP の頻度が MS において正常対象に比べ有意に高頻度であることを示した¹⁾。その後、Cunningham²⁾らにより、MxA 調節領域-123 の SNP が MS における IFN- β 治療の反応性に關与する因子の一つであることが示された。今回、これら SNP の意義を明確にするため更なる検討を加えた。

方法

患者および正常人の末梢血リンパ球から抽出された、nt-88/-123 が各々 T/C、T/A および G/C である、-532 から +4 に至る MxA の調節領域を PCR にて増幅した。加えて、臨床検体では見いだされなかった G/A のハプロタイプをもつ調節領域を、QuikChange

Site Directed Mutagenesis Kit によって作成した。これらの断片を更に、図1のごとく SNP と ISRE の有無等で区別しうる様々な長さの断片として増幅し、これらを pGL3-basic vector に挿入し、これらの組み替えプラスミドを pRL-SV40 plasmid と共に Hela 細胞に導入した。これに IFN- β -1b (ベタフェロン) (1000 IU/ml)を加えて、24 時間インキュベートした後、Dual-Luciferase Reporter Assay System と Fluoroskan Ascent FL を用いて、ルシフェラーゼアッセイを行った。

結果

図 2 に結果を示す。IFN- β 添加によるハプロタイプ別の反応性の変化はほぼ既報告のものと同様であった。IFN- α についても新規に検討したが、IFN- β との間に明らかな差異は認められなかった。これに加え、新たに nt-88 と nt-123 の SNP がそれぞれ独自の役割を担っている事を明らかにした。IFN を処理しない状態では nt-123 の SNP が主に調節領域の活性に關与していることが示された。すなわち、-123A をもつハプロタイプは -123C をもつものよりも高い活性を持っていた。一方、IFN 処理した場合は、-88T を有するハプロタイプが -88G を持つものよりも高い活性を示し、nt-88 が主たる因子であると考えられた。

1) 札幌山の上病院
2) 札幌医科大学医学部神経内科
3) 札幌医科大学医学部微生物学講座

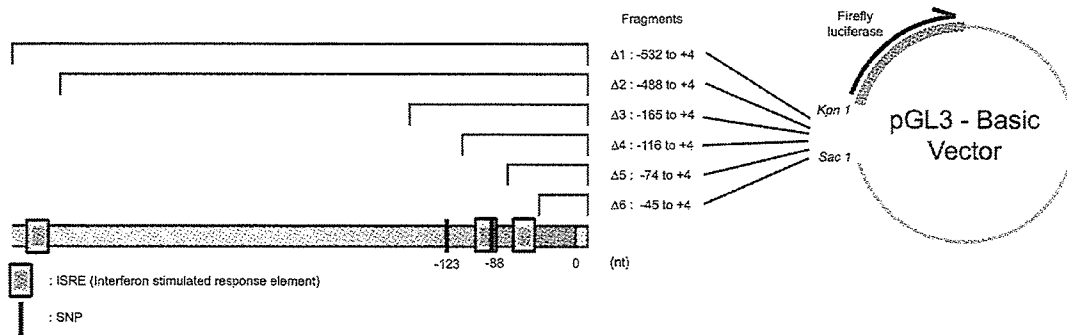


図1 MxA調節領域の部分的増幅とpGL3-Basic Vectorへの挿入

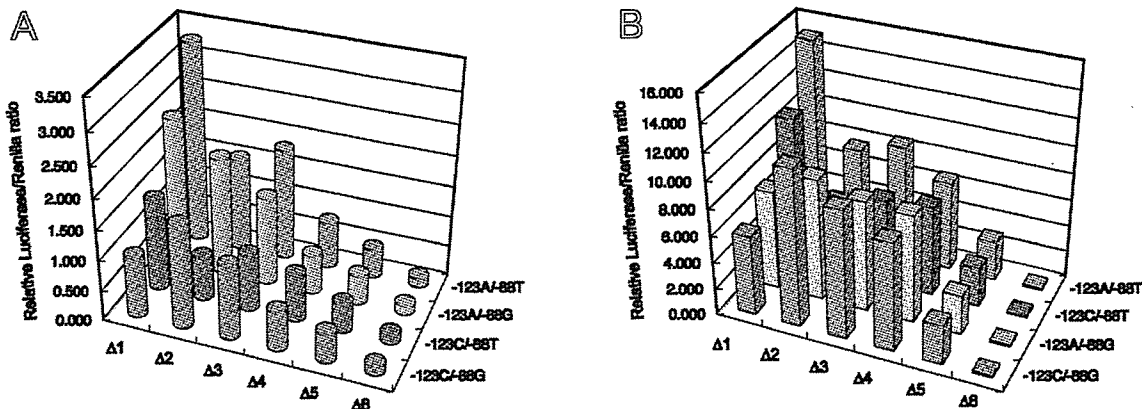


図2 各ハプロタイプ/断片のルシフェラーゼアッセイ
A: IFN 未処理 B: IFN 処理

考察

本研究においてはMSにおいてnt-88Tとnt-123Aが高頻度に観察され、更にこのMSで多いハプロタイプはIFN投与下と非投与下いずれにおいてもMxAをより強く発現する事が示された。すなわち、MxAの相対的高発現はMSの危険因子である可能性があるということになる。これを支持するものとして、Cunninghamらの-123AはIFN治療のnon-responderでより高頻度に見られるという所見²⁾、およびMibayashiらが示した、MxAによるアポトーシスの促進作用はMxAの発現程度に依存しているという所見³⁾が得られている。また、Chieuxらは、IFN治療を受けていないMS患者でMxAの発現が増加している事⁴⁾を蛋白レベルで示している。これらのことから導かれる仮説として、MxAはMSの病態進展において促進的な役割を担っている可能性があり、またIFN治療においてもMxAの過剰誘導がIFNのメリットを低減している可能性がある。そのため、MxAの発現レベルを調節できればIFN治療の反応性のみならず、IFN非治療下のMSの病態をも改善しうる可能性がある。これらの効果は脳血管閉塞の血管内皮細胞や神経膠細胞のアポトーシス抑制によって達せられると予測される。逆に、免疫担当細胞においてMxAによるアポトーシス促進が誘導された場合はむしろMSを改善させる方向に働くという仮説も考えうるが、MSの脱髄過程のなかにはリンパ球浸潤に

依存しない病変も見いだされるなどのデータもあり、現時点においてはMxAはMSの病態促進因子である可能性が強いと考えられる。今後は、多発性硬化症におけるMxAの役割について、in vivoも含め更なる検討が必要である。そこにおいては、病型、病期、組織別の詳細な検討が要求されると考えられる。

文献

- 1) Furuyama H, Chiba S, Okabayashi T, Yokota S, Nonaka M, Imai T, Fujii N and Matsumoto H. Single nucleotide polymorphisms and functional analysis of *MxA* promoter region in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2006;249:153-157.
- 2) Cunningham S, Graham C, Hutchinson M, Droogan A, O'Rourke K, Patterson C, et al. Pharmacogenomics of responsiveness to interferon IFN-beta treatment in multiple sclerosis: a genetic screen of 100 type I interferon-inducible genes. *Clin Pharmacol Ther* 2005;78:635-46.
- 3) Mibayashi M, Nakad K, Nagata K. Promoted cell death of cells expressing human MxA by influenza virus infection. *Microbiol Immunol* 2002;46:29-36.
- 4) Chieux V, Chehadeh W, Hautecoeur P, Harvey J, Wattré P, Hober D. Increased levels of antiviral MxA protein in peripheral blood of patients with a chronic disease of unknown etiology. *J Med Virol* 2001;65:301-8.

健康危険情報

なし

知的財産の出願・登録状況

特許取得、実用新案登録：なし

多発性硬化症における末梢神経脱髄

分担研究者 桑原 聡¹⁾
共同研究者 三澤園子¹⁾、森 雅裕¹⁾、早川 省¹⁾、服部 孝道¹⁾、Hugh Bostock²⁾

研究要旨

多発性硬化症 (MS) における末梢神経脱髄病変の頻度について系統的に検討した。MS 患者 56 名、正常対照 53 名において正中、尺骨、腓骨、脛骨運動神経伝導検査を、正中、尺骨、浅橈骨、腓腹感覚神経伝導検査を施行した。脱髄を鋭敏に反映するとされる軸索興奮性検査 (supernormality 測定) を正中神経手首部運動軸索、浅橈骨神経感覚軸索で行った。MS 患者において神経伝導検査で多巣性脱髄所見を 3 名 (5%) に認めた。3 名とも MS が先行し、数年後に脱髄性ニューロパチーを合併していた。Supernormality は MS 群と正常対照群で有意差を認めなかった。これらの所見は MS において普遍的に軽微な脱髄所見を伴うことはないが、MS 患者の数%では通常の神経伝導検査で明確に判定できる脱髄を合併することを示していた。MS の経過中に epitope spreading が起こることにより、中枢性髄鞘と末梢性髄鞘に共通する蛋白が epitope として認識されて両者が合併する可能性が考えられた。脱髄性ニューロパチーの治療反応性は良好であるため、合併を検出することは臨床的に重要と思われる。

研究目的

多発性硬化症と慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチーの合併例の報告は 20 例以上あり、中枢神経と末梢神経の脱髄の機序に共通の免疫異常があることが提唱されている。また、多発性硬化症患者において普遍的に軽微な末梢神経の脱髄を合併するとの報告は 1970 年代から複数なされている。もっとも系統的な検討は Eisen ら (Muscle Nerve, 1982) によってなされ、40 名の MS 患者において正中神経感覚線維において刺激間隔 6ms で二重刺激で記録された supernormality が MS 患者では正常者と較べて有意に小さいことを報告している。Supernormality は活動電位発生時の電流が一部傍絞輪部に store され、これが 5-10ms 後に絞輪部にもどってくることにより一過性に軸索興奮性が増大するために生じる。理論上、傍絞輪部に限局する軽微な脱髄が生じた場合には傍絞輪部に store されるべき電流が散逸するために supernormality が減少することが予想され、上記の結果はこの仮説を支持するものである。結論として通常の神経伝導検査では検出できない軽微な脱髄が多く、多発性硬化症患者において

起こっている可能性が示されたが、1992 年代以後の追試はなく、この問題について結論をみていない。本研究では多発性硬化症連続症例において系統的に神経伝導検査と軸索興奮性測定を行い、末梢神経脱髄の頻度、程度を明らかにすることを目的とした。

研究方法

(1) 対象: 2005 年から 2006 年の間に千葉大学医学部附属病院で診療をおこなった再発寛解型多発性硬化症患者 54 名。Poser の診断基準の「臨床的に確実な多発性硬化症」に該当し、2001 年の McDonald の診断基準においても、三椎体以上の長い脊髄病変の除外規定を除き、基準を満たしている症例を対象とした。

(2) 方法: 正中、尺骨、脛骨、腓骨神経で F 波を含めた運動神経伝導検査を、正中、尺骨、浅橈骨、腓骨神経において感覚神経伝導検査を行った。脱髄の判定には米国神経学会の電気診断基準を用いた。軸索機能検査は正中神経手首部の運動軸索、浅橈骨感覚軸索において閾値追跡法 (Copyright、英国国立神経研究所 Hugh Bostock) を用いて supernormality、threshold electrotonus を記録した。正常対照には年齢を一致させた健常成人 70 名を用いた。

1) 千葉大学大学院医学研究院 神経内科

2) 英国国立神経研究所

倫理面への配慮

本研究は千葉大学医学部倫理委員会において承認を受けた。研究については患者本人へ十分に説明を行い、同意を得た。個人の情報は決して表に出ることがないように細心の注意を払い、プライバシーの保護には十分に配慮した。また患者側の通院の負担を増やさぬよう、通常の外來受診日に合わせて電気生理検査を行った。

研究結果

(1) 神経伝導検査：神経伝導異常は5名で認められた。その内1名は手根管症候群の合併、1例は腓骨神経複合筋活動電位の低下の単独異常で腓骨神経の軸索変性の合併と思われた。脱髄基準を満たす神経伝導異常は3名(5%)で認められた。この3名中臨床的に明らかな慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー(CIDP)の合併例が2名存在した。残りの1名では明らかなCIDPの病歴はとれず、四肢腱反射低下のみが末梢神経障害を示唆する所見であった。脱髄基準を満たす3例の神経伝導異常はいずれも神経幹中間部における多巣性伝導ブロックであり、遠位部神経終末や根の脱髄所見は認められなかった。

(2) Supernormality：正中神経手首部運動軸索における supernormality は正常対照 $26\pm 7\%$ (平均 \pm SD)、多発性硬化症患者 $24\pm 6\%$ であり、差を認めなかった。浅撓骨神経感覚軸索の supernormality にも両群間で差を認めなかった。神経伝導検査で脱髄性異常を呈した3名の supernormality も正常範囲にあった。

考察

今回の検討では多発性硬化症患者54名中3名(6%)でCIDPの基準を満たす、末梢神経伝導異常がみられた。その他の症例では軸索興奮性も含めて全く正常であり、多発性硬化症一般に軽微な脱髄を有するという仮説は否定的であった。一方CIDPを合併していると思われる3名中臨床的に明らかなCIDPの症状を呈したものは2名であり、残りの1名では腱反射低下を除くと末梢神経症状は中枢症状にマスクされていた。ただし末梢神経脱髄の所見は確実であり、多発性硬化症患者の数%で末梢神経の脱髄を合併することが示された。合併例では多発性硬化

症が数年先行することから、このサブグループでは再発寛解を繰り返す経過中の epitope spreading などにより中枢性髄鞘と末梢性髄鞘に共通するエピトープを認識する自己免疫反応が生じた可能性を示すと思われる。多発性硬化症とCIDPとでは免疫治療が異なり、後者では十分な改善が見込まれるため、この合併に留意することは臨床的に重要である。

結論

多発性硬化症では末梢神経脱髄は普遍的には生じていない。臨床的に明らかな慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチーを合併するサブグループが数%の頻度で認められる。

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・実用新案登録：なし

多発性硬化症の診断のもとに IFN-β 治療を行い 急性増悪を認めた 7 症例の臨床像解析

班 員 東京大学神経内科 清水潤
共同研究者 東京大学神経内科 ○長谷川路子、後藤順、
杉本泉、岩田淳、辻省次
帝京大学神経内科 畑中裕己、園生雅弘、清水輝夫
東京通信病院神経内科 高津成美

研究要旨

当施設では多発性硬化症への IFN-β 使用経験の中で、それまで経過からは予想できない症状増悪を認めた 3 症例を経験した。IFN-β 使用後に多発性硬化症の増悪を認めた先行報告として、杉本ら（第 169 回神経学会関東地方会）、畑中ら（第 44 回神経学会総会）の報告がある。IFN-β 使用後の多発性硬化症の増悪が、自然経過としての再発を見ているか、IFN-β 投与と関係があるかは明確でない。しかし、同様の症例の有無、増悪症例の特徴を明らかにすることは、多発性硬化症に対する IFN-β の適応を考えるにあたり重要と考えた。

研究目的

IFN-β 使用後に予想できない多発性硬化症の症状増悪を認めた症例の臨床像の特徴を明らかにする。

セントを得、同意を得て研究をおこなった。個人の情報は決して表に出ることがないように細心の注意を払い、プライバシーの保護には充分配慮した。

研究方法

当施設および協力 8 施設で、IFN-β 導入後に主治医の判断で予想できない症状増悪を認めた多発性硬化症症例を、アンケート調査より抽出し臨床像を解析した。

（倫理面への配慮）

本研究は、東京大学、帝京大学、東京通信病院および協力施設の倫理規定を遵守して行なった。患者さまからはインフォームド・コン

研究結果

アンケート調査の結果、9 施設 50 症例中、7 例の症状増悪例が存在した。うち 1 例（症例 5）は、IFN-β 投与後に lip biopsy で Sjögren 症候群が判明した症例で、投与前より視神経病変と 3 椎体以上の脊髄病変を有し、投与後に腫瘍様大脳病変による精神症状と脊髄病変の拡大による四肢麻痺を呈した。本症例は今回の検討からは除外することとした。

増悪を認めた 6 症例のうち 5 例が女性、1