

氏 名（本籍） なが の いさお
永 野 功

学位の種類 博 士 （ 医 学 ）

学位記番号 医 第 2 4 3 4 号

学位授与年月日 平 成 4 年 2 月 26 日

学位授与の条件 学位規則第4条第2項該当

最 終 学 歴 昭 和 57 年 3 月 25 日
東北大学医学部医学科卒業

学位論文題目 Identification of Several Cytokines in Brain
Lesions in Subacute Sclerosing Panence-
phalitis
(亜急性硬化性全脳炎剖検脳における各種サイ
トカインの検索)

(主 査)

論文審査委員 教授 小 暮 久 也 教授 名 倉 宏

教授 岩 崎 祐 三

論文内容要旨

亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) は、麻疹ウイルスの変異株である SSPE ウイルスの持続感染による慢性進行性の脳炎である。SSPE 脳の病理学的変化は灰白質と白質にまたがる diffuse なもので、神経細胞の脱落とグリオシス、白質の広範な脱髄巣がみられる。これに加えて病巣内には多数の単核細胞の浸潤が認められ、SSPE 病巣内において活発な宿主免疫反応が起こっているものと推定される。今回の研究ではこの免疫反応の一環として産生されるサイトカインを免疫組織化学的に検出し、その SSPE 病巣形成における関与について検討した。

【方 法】

3 例の SSPE 凍結剖検脳 (前頭葉および後頭葉) から連続切片を作成し、ABC 法による免疫組織化学染色を行なった。サイトカインは、Interleukin (IL)-1 β , IL-2, IL-6, Tumor necrosis factor (TNF), Lymphotoxin (LT), Interferon (IFN)- γ の 6 種に対するモノクローナルおよびポリクローナル抗体を使用して検出した。すなわち、切片をアセトンで固定したのち H₂O₂ と 2 次抗体と同種の正常血清でブロッキングを行ない、希釈した抗サイトカイン抗体をかけて一晩 4 °C で反応させた。PBS で洗浄後ビオチン化 2 次抗体、次いで ABC 試薬を反応させて、ジアミノベンチジン (DAB) を発色させた。ヘマトキシリンで核染したのち、代表的な病変部において各サイトカイン陽性細胞の数をカウントした。

さらに各サイトカイン陽性細胞の種類を同定するため、PAP 法と APAAP 法を組み合わせた二重染色を行なった。細胞のマーカーとしては、astrocyte は抗 GFAP, macrophage/microglia は HAM56・Leu-M5・抗フェリチン, T 細胞は Leu-4, 血管内皮細胞はビオチン化 UEA 1 を使用した。各サイトカインに対する抗体と各細胞マーカーとの混合物を 1 次抗体として反応させ、モノクローナル抗体を APAAP 法で青色に、ポリクローナル抗体を PAP 法で褐色に発色させた。

対照疾患として、1 例の進行性多巣性白質脳症 (PML) の凍結剖検脳 (前頭葉) を、SSPE 脳と同様に抗サイトカイン抗体にて免疫染色した。正常対照には、非神経疾患で死亡した 3 例の凍結脳組織 (前頭葉) を使用した。

【結 果】

3 例の SSPE 脳組織は、いずれも病理学的には典型的な病変を呈していた。すなわち、灰白質では神経細胞の脱落とグリオシスがみられ、白質では著名な脱髄とグリオシスが観察された。単核細胞の浸潤は灰白質と白質の両方にわたってみられ、血管周囲では Perivascular cuffing が

観察された。各サイトカインの免疫染色では、IL-1 β 、IL-2、IL-6、TNF、LT、IFN- γ の6種とも、これらの病変部に検出された。各々の陽性細胞の数は症例によって若干の違いがあったが、一般にTNFが多く検出された。

各陽性細胞の同定では、IL-1 β はastrocyteとmacrophageおよび一部のmicrogliaに、IL-2はリンパ球に、IL-6はastrocyteとmacrophage、TNFはastrocyte、macrophageおよび血管内皮細胞に、LTはリンパ球(T細胞)とmacrophage、少数のastrocyteに、そしてIFN- γ はastrocyte、macrophage、T細胞と血管内皮細胞に認められた。

PML脳組織は、白質にグリオシスをともなった多巣性および融合性の脱髄巣がみられ、病巣部には比較的少数のmacrophageの浸潤が観察された。各々のサイトカイン陽性細胞はSSPE脳に比べて明らかに少数であり、とくにIL-1 β 、IL-2、LTはまれであった。これに対してTNFは比較的多く、形態的にmacrophageと血管内皮細胞およびtransformed oligodendrocyteと考えられる細胞に検出された。IL-6は少数のmicrogliaに、IFN- γ はastrocyteとmicrogliaに見いだされた。これらのサイトカインは主として脱髄巣に認められた。

3例の正常対照脳組織は病理学的には所見がなく、また各サイトカインの免疫染色でも陽性細胞は観察されなかった。

【考 察】

SSPE脳内病巣に多数のCD4⁺T細胞とB細胞が存在し、加えて病巣内の多くの細胞がmajor histocompatibility complex (MHC) class II抗原を発現していることが、前回(副論文)の研究において示されている。今回検出された6種のサイトカインは互いに作用しあって病巣内の免疫反応をさらに活性化させ、class II抗原を誘導するものと推定される。さらにTNFとLTの直接的ミエリン障害作用や、IL-2、IL-6、IFN- γ の細胞障害性T細胞(CTL)誘導によるSSPE脳内病巣拡大の可能性が示唆される。PMLでは浸潤細胞が少数であることを反映してサイトカインは乏しかったが、SSPEと同様にTNFの脱髄への関与も推定される。

審査結果の要旨

亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) は、麻疹ウイルスの持続感染による慢性進行性の脳炎であり、その脳内病変部にはウイルス抗原に加えて多くの単核細胞浸潤がみられる。本研究はこの単核細胞浸潤に着目し、SSPE 脳内病巣形成における宿主免疫反応の関与について、SSPE 患者剖検脳を免疫組織化学的に分析検討したものである。

著者は3例のSSPE患者の凍結剖検脳から得た切片を用いて、まずT細胞 (CD3)・T細胞サブセット (CD4, CD8)・B細胞 (CD19, CD22)・major histocompatibility complex (MHC) class II 抗原を検索した。その結果、SSPE 病巣に浸潤している単核細胞が、マクロファージとCD4陽性T細胞およびB細胞であり、特にCD4陽性T細胞は実質病巣とperivascular cuffの両者において主要な構成成分であることが示された。さらに、数多くのMHC class II 抗原陽性細胞が病巣内に観察され、これからSSPE病巣が免疫学的に活性化した状態であることを示唆するとしている。

つぎに著者は、これらの免疫反応を継続・進展させるファクターとしてサイトカインを取り上げ、同じ3例の脳組織を用いて6種のサイトカイン、すなわちinterleukin (IL)-1 β , IL-2, IL-6, tumor necrosis factor (TNF), lymphotoxin (LT), interferon (IFN)- γ を検索し、1例の進行性多巣性白質脳症 (PML) の凍結剖検脳での結果と比較した。さらに、二重染色法にてこれらのサイトカイン陽性細胞の種類を調べている。その結果は、正常対照脳では検出されなかったこれらの6種のサイトカインが、3例のSSPE脳病変部においてはすべて検出された。そして各陽性細胞の密度は異なるものの、分布はお互いに類似していた。陽性細胞については、IL-1 β はアストロサイト、マクロファージ、一部のミクログリアに、IL-2はリンパ球に、IL-6はアストロサイト、マクロファージに、TNFはアストロサイト、マクロファージ、血管内皮細胞に、LTはリンパ球、マクロファージ、アストロサイトに、そしてIFN- γ はアストロサイト、マクロファージ、リンパ球、血管内皮細胞に認められた。PML脳組織では、脱髄巣においてTNFとIFN- γ 陽性細胞を検出しているが、これらはSSPE脳に比べて明らかに少数であり、IL-1 β , LT陽性細胞についてはまれであったとしている。

以上の結果から著者は、SSPE 脳内病巣においては麻疹ウイルスによって惹起された宿主免疫反応が終息せずに継続しており、それがサイトカインの局所的産生によって維持されていると推定している。このような免疫反応は組織障害を引き起こす可能性があり、SSPE 病巣の形成に関与するとも考えられる。したがって、本研究はSSPEの脳内病巣の形成機序の一つの可能性を与えるものと評価し得るので、学位論文に値するものである。