信州医誌，40(6)：567～575，1992

多発性硬化症における cytokine の研究

宮　城　浩　一
信州大学医学部第3内科学教室
（主任：柳澤　信夫教授）

Cytokines in Patients with Multiple Sclerosis

Koichi MIYAGI
Department of Medicine (Neurology), Shinshu University School of Medicine
(Director : Prof. Nobuo YANAGISAWA)

It has been suggested that several cytokines, such as tumor necrosis factor (TNF), interleukin (IL)-1, interleukin (IL)-2, and activated monocyte/macrophages play important roles in demyelination in multiple sclerosis (MS).

We assessed ① production of IL-1 in the supernatants of mononuclear cells in the peripheral blood of patients with MS, ② TNF levels in the sera and CSF by ELISA, ③ soluble IL-2 receptor (sIL-2R) levels in the sera by ELISA, and ④ the percentage of CD14 positive cells (monocyte/macrophages) in mononuclear cells of peripheral blood by flow cytometry, and compared them in different stages and types of MS.

Levels of IL-1α were significantly increased in MS patients as a whole compared with controls ($p<0.05$), and especially in acute relapsing MS during an exacerbation ($p<0.01$). Levels of TNF were also significantly increased in both CSF and sera of patients with MS ($p<0.01$), especially during exacerbation of the acute relapsing type. Serum levels of sIL-2R were significantly increased in the exacerbations of acute relapsing type and chronic progressive type ($p<0.05$, $p<0.05$). The percentage of CD14 positive cells was also increased in MS patients as a whole, in particular during the exacerbation of acute relapsing type ($p<0.01$).

These results suggest that these cytokines and monocyte/macrophages may play important roles in the demyelination process in MS. *Shinshu Med. J., 40 : 567—575, 1992*

(Received for publication April 28, 1992)

Key words : multiple sclerosis, cytokine, interleukin-1, tumor necrosis factor, soluble interleukin-2 receptor
多発性硬化症，サイトカイン，インターロイキン1，腫瘍壊死因子，可溶性インターロイキン2受容体

I　はじめに

近年，多発性硬化症（MS）において，活性化されたリンパ球，macrophage, monocyte などから放出される各種の cytokine が脱髄に関与している可能性が示唆され，MS の病因を検討するうえで重要な要素として注目されている。その代表的な cytokine である interleukin-1（IL-1）は，macrophage，好中球などの食細胞をはじめ NK 細胞，樹状細網細胞，B細胞，T細胞，血管内皮細胞，ランゲルハンス細胞，線維芽細胞など多様な細胞によって産生される cytokine で，炎症の急性期蛋白合成の誘導，T細胞・NK 細胞・線維芽細胞などの活性化作用，筋組織・骨・軟骨などの異化作用亢進，好中球増多症など多彩な生物学的活性を示し，生体防御あるいは生体恒常性維持の目的で働くことが知られている[1]。本物質は中枢神経内でも産

生されることが報告されており，MSでのその動態が注目されている。さらにtumor necrosis factor（TNF）は，主としてmonocyte/macrophage系の細胞から産生される他，NK細胞，NC細胞，さらに近年，中枢神経において，astrocyte・microglial cellからも産生されている可能性が指摘されている[2)3)]。TNFは，ヒト血管内皮細胞の表面抗原提示能を持ち[4)]，その結果リンパ球の内皮細胞への接着を高める作用を持つことが報告されている[5)]。また，MS患者の脳内脱髄斑にTNF陽性細胞を認めた報告もあり[6)]，脱髄の過程において重要な役割を果たしている可能性が示唆され[7)]，また，monocyte/macrophage系の細胞の活性化が，これらの脱髄過程の初期に引き金として働く可能性が考えられている[8)]。

Interleukin-2（IL-2）は，macrophageの協力の下に抗原やmitogenで刺激された成熟T細胞によって産生され，それに呼応してIL-2 receptor（IL-2R）が，T細胞系のみならず，B細胞系，NK様細胞に出現する。さらに，IL-2Rは，細胞表面だけではなく，soluble IL-2R（sIL-2R）としてT細胞培養上清にも出現する。IL-2，IL-2R，sIL-2Rは，ATLをはじめとする血液系悪性腫瘍，SLE，RAなどの自己免疫疾患の活動性を示すことが知られており、MSにおいてsIL-2R，IL-2が高値を示す報告がある[9)-12)]。

今回，MS患者および対照について，これらのcytokineのうち，血清，髄液中のIL-1，TNF，血清中のsIL-2Rおよび抹梢血中のmonocyte/macrophage数について測定を行い，MSの病型，病勢との関係について検討した。

II 対象と方法

A IL-1

対象としたMS患者はRoseら[13)]の診断基準に合致した22例で，さらにSchumacherら[14)]の分類に従ってacute relapsing typeの増悪期8例，寛解期6例，chronic progressive type 8例に分類した。Acute relapsing typeの増悪期と寛解期の1例ずつを除いて全例が過去に3年以上にわたるステロイド療法を受けていたが，本検査時にはいずれも服薬を中止していた。22例はいずれもHTLV-1抗体陰性であった。また，対照として健常人10例を対象とした。

末梢血をヘパリン採血後，Ficoll-Hypaque法で単核球を分類し，Hank's balanced salt solution（HBSS, Gibco, Grand Island, NY）で3回洗浄し，ナイロンファイバーカラムを通してBリンパ球を除去した後，10% heat-inactivated fetal bovine serum（Gibco）を加えた199 medium（Gibco）中に浮遊させた。2×10^6/mlの単核球に調整しIL-2（Electro-Nucleonics, MD）を50ng加えてFalcon microtiter platesの100 μlwell中で37°Cで72時間培養，1,700×gで30分間遠心し上清を得た。上清中のIL-1α，IL-1βを市販のヒトIL-1測定キット（Ohtsuka, Tokyo, Japan）を用いELISA法により測定した。第1抗体として抗ヒトIL-1α（IL-1β）モノクローナル抗体をプレートの各wellに加えて固相化し，phosphate buffered saline（PBS）で3回洗浄した。さらにブロッキング溶液を加えて室温で4時間静置し，PBSで3回洗浄し，標準液と検体を200μlずつ各wellに加え，室温で一晩反応させた後，PBSで3回洗浄した。第2抗体として抗ヒトIL-1α（IL-1β）家兎血清を100μlずつ各wellに加え室温で2時間静置した後PBSで3回洗浄し，第3抗体としてPOD標識抗家兎IgG山羊抗体を100μlずつ加えて室温で2時間反応後，PBSで3回洗浄した。基質溶液を100μl加え，室温で10～20分反応させ，酵素反応停止液を100μl加えて反応を停止させ，Beckman LS-5800 spectrophotometerで492nmにおける吸光度を測定した。標準曲線を作成後，各検体のIL-1α，IL-1β濃度を算出した。

B TNF

MS患者髄液29例，血清26例，対照として変性疾患，脳血管障害等の神経疾患患者の髄液18例，血清6例について，human recombinant TNF（rTNF）（Teijin, Tokyo, Japan）に対するモノクローナル抗体を用いたサンドイッチ法によるELISA法により，TNF-αの測定を行った（測定感度は3.4pg/ml）[15)]。MSのうちacute relapsing typeは髄液22例，血清20例，chronic progressive typeは髄液7例，血清6例であった。Acute relapsing typeのうち，検体採取時に増悪期だったものは髄液7例，血清11例であった。また，増悪期の髄液15例については，髄液中の細胞数とTNFの相関についても検討した。

測定方法は，抗ヒトTNFモノクローナルIgGで被覆されたポリスチレンボールにrTNFまたは検体0.15mlを加え，20°Cで20時間保温し，PBSで2回洗浄した後，ポリスチレンボールを新たな試験管に移し，POD標識抗ヒトTNF抗体と20°Cで4時間反応させた。ポリスチレンボールを再び2回洗浄した後，基質液と30°Cで60分反応させ，405nmの吸光度を測定し

標準曲線を作成し，測定値を求めた。

C　sIL-2R

MS患者26例（acute relapsing type 22例，chronic progressive type 4例），健常者6例を対象に血清sIL-2Rの測定を行った。Acute relapsing typeのうち，増悪期にあるものは10例，寛解期にあるものは12例であった。

測定は，sIL-2R測定キット（T Cell Sciences, USA）を用いて行った。標準液または検体50μlに，POD標識マウス抗ヒトIL-2Rモノクローナル抗体150μlずつを加え，マウス抗ヒトIL-2Rモノクローナル抗体被覆ポリスチレンビーズを1個加えて，150～200rpmで遠心し，22～26°Cで90分間反応させた。反応終了後，3回洗浄しOPD基質溶液200μlずつをポリスチレンボールに加え，22～26°Cで30分間反応させ，1N硫酸1 mlを加えて反応停止後，spectrophotometerで492nmの吸光度を測定し，標準曲線を作成後，各検体のsIL-2R濃度を算出した。

D　CD14陽性細胞

対象は，acute relapsing type 13例，chronic progressive type 6例，さらにacute relapsing typeのうち，増悪期にあるものは8例，寛解期にあるものは5例であった。また，対照として健常人10例を対象とした。

対象より採取したヘパリン加末梢血4mlをPBSにより2倍に希釈後，ポリスピッツ管に分注したFicoll 2ml上に重層し，2,000rpmで10分間遠心した。分離した単核球層をPBSで3,000rpmで4分間洗浄した後，単核球浮遊液200μlにFITC標識Mo2（CD14）モノクローナル抗体（Coulter Immunology, Hialeah, FL）20μlを加え，4°Cで30分間反応させた後，flow cytometryにより，単核球中に占めるCD14陽性細胞（monocyte/macrophages）の相対的な割合を測定した。

E　統計学的処理

IL-1α，IL-1β，sIL-2R，CD14陽性細胞の各測定値の統計学的有意差の検定，および相関係数の有意性の検定はunpaired Student's t testにより行った。また，TNFの測定値はMann-WhitneyのU検定を用いて検定を行った。それぞれ$p<0.05$で統計学的に有意な差があると判定した。

III　結　　果

A　IL-1

1　培養単核球上清中のIL-1α

MS患者全体で180.2±177.5(mean±SD)pg/mlと対照（66.2±66.0pg/ml）と比較して有意（$p<0.05$）な上昇がみられた（図1）。さらにMS患者をacute relapsing typeの増悪期と寛解期，chronic progressive typeの3群に分類すると，acute relapsing typeの増悪期で360.1±130.0pg/mlと対照と比較して有意（$p<0.01$）に高値を示したが，その寛解期（65.3±

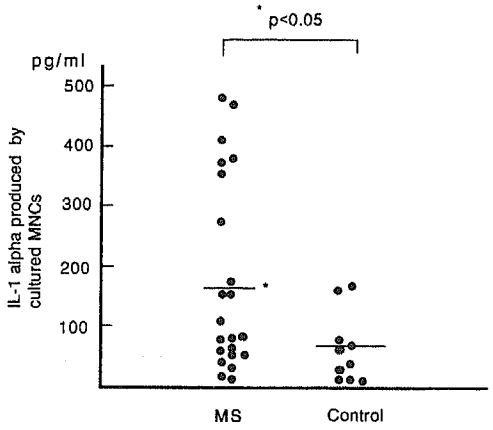

図1　培養単核球上清中のIL-1αの測定値
MS患者全体では対照と比較して有意な上昇がみられた（$p<0.05$）。

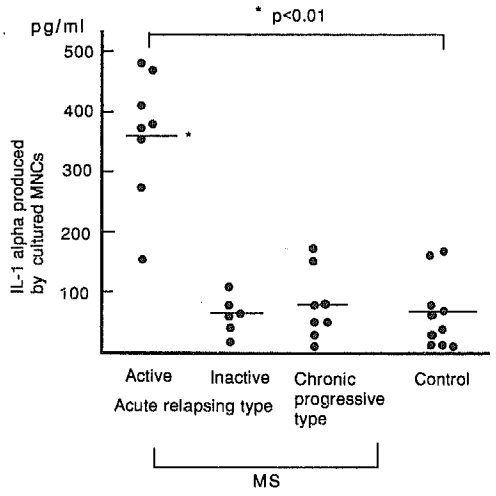

図2　病勢，病型別にみた培養単核球上清中のIL-1αの測定値
Acute relapsing typeの増悪期で対照と比較して有意（$p<0.01$）に高値を示したが，その寛解期とchronic progressive typeでは対照と有意差を認めなかった。

52.8pg/ml）と chronic progressive type（80.9±71.9pg/ml）では対照との間に有意差を認めなかった（図2）。

2 培養単核球上清中の IL-1β

MS 患者全体と対照との比較で有意差は認められなかった。IL-1α の場合と同様に病型分類により検討したが acute relapsing type の増悪期で48.2±45.6pg/ml，その寛解期で32.2±17.8pg/ml，chronic progressive type で49.0±56.2pg/ml と，対照（16.2±17.4pg/ml）との比較で有意差は認められなかった（図3）。

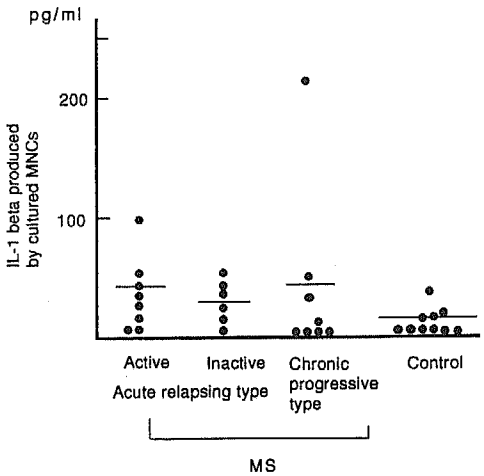

図3 培養単核球上清中の IL-1β の測定値
MS 患者各群と対照の比較で有意差は認められなかった。

B TNF

1 髄液中の TNF

MS 患者29例の髄液中 TNF は，8.8±5.0pg/ml，対照18例では3.0±3.9pg/ml と，対照に比べ，MS 患者で有意な高値を示した（p<0.01）（図4）。なお，測定値3.4pg/ml 以下は検出不能なため，測定値 0 と

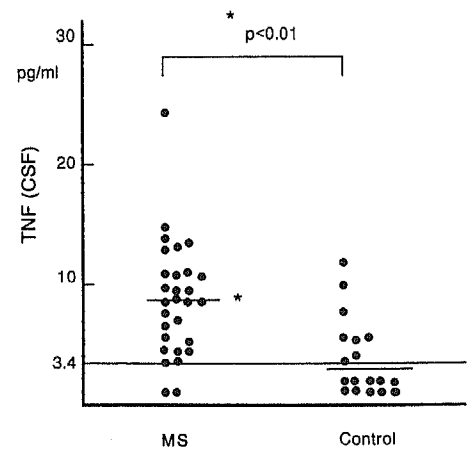

図4 髄液中 TNF の測定値
MS 患者では対照群に比べて有意（p<0.01）な高値を示した。

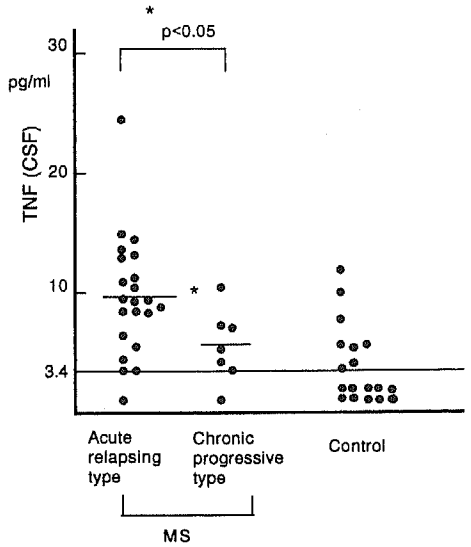

図5 病型別にみた髄液中 TNF の測定値
Acute relapsing type は chronic progressive type に比べて有意（p<0.05）な高値を示した。

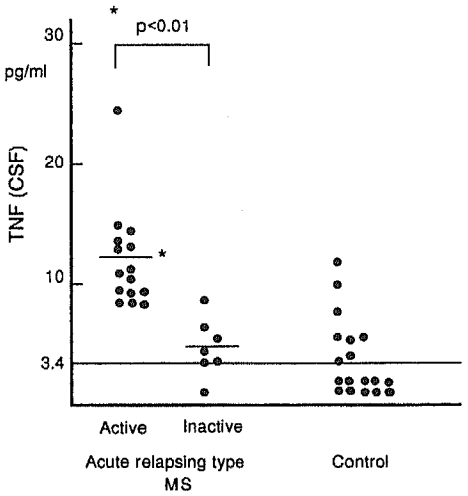

図6 病勢別にみた髄液中 TNF の測定値
増悪期の TNF は寛解期に比べて有意（p<0.01）に高値を示した。

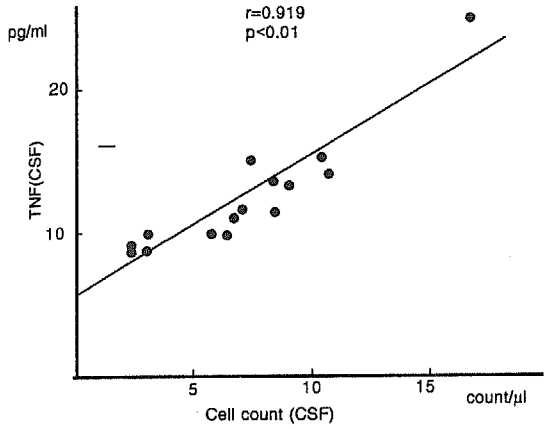

図7　増悪期患者の髄液中 TNF と細胞数の関係
相関係数0.919と，両者に有意（$p<0.01$）な相関を認めた。

して計算した。

Acute relapsing type 22例，chronic progressive type 7例の髄液中 TNF を比較すると，acute relapsing type の髄液中 TNF は9.8±5.1pg/ml，chronic progressive type の髄液中 TNF は5.7±3.4pg/ml で，acute relapsing type は，chronic progressive type に比べ，有意に高値を示した（$p<0.05$）（図5）。

Acute relapsing type22例のうち，増悪期15例と寛解期7例について，髄液中の TNF を比較した。増悪期では，12.2±4.1pg/ml，寛解期では4.8±2.8pg/ml と，寛解期に比べ増悪期で有意に高値を示した（$p<0.01$）（図6）。

増悪期の15例の髄液中 TNF と細胞数の比較では，相関係数0.919と，有意な相関を示した（$p<0.01$）（図7）。

2　血清 TNF

MS 患者26例，対照6例について，血清中の TNF について比較した。MS 患者中，acute relapsing type20例で10.3±19.4pg/ml，chronic progressive type では1.1±2.7pg/ml，対照6例は全例検出濃度以下だった。Acute relapsing type20例のうち，増悪期にあるもの9例は22.0±24.7pg/ml，寛解期の11例では，0.8±1.7pg/ml で，全検体中，acute relapsing type の増悪期のみが対照に比較して有意（$p<0.01$）に高値を示した。また，acute relapsing type のうち，50pg/ml 以上と著明な高値を示す例が2例あったが，いずれも急激な神経症状の増悪とともに全身症状の悪化がみられ，死亡に至った例の検体であった（図8）。

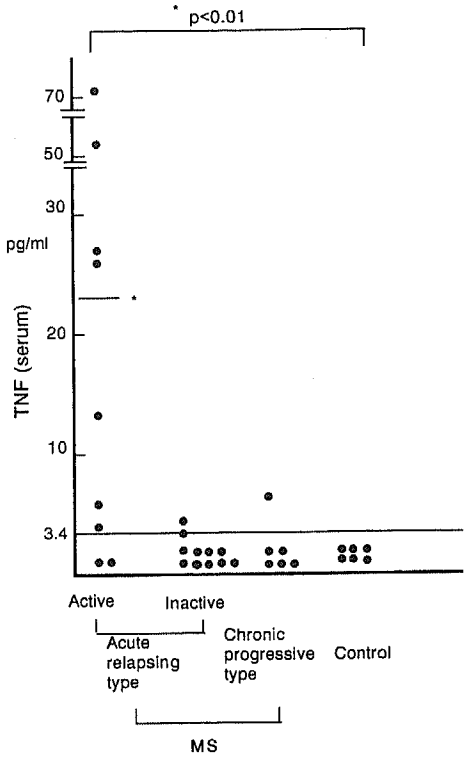

図8　血液中 TNF 測定値
Acute relapsing type の増悪期では，対照に比較して有意（$p<0.01$）に高値を示した。

C　sIL-2R

MS の acute relapsing type のうち，増悪期は366.9±153.6U/ml，寛解期は248.2±74.6U/ml，chronic progressive type は297.0±76.8U/ml で，対照の204.3±16.7U/ml と比較して acute relapsing type の増悪期および chronic progressive type で有意（いずれも $p<0.05$）に高値を示したが，acute relapsing type の寛解期では，有意な差を認めなかった。また，acute relapsing type の増悪期では，寛解期に比べても有意（$p<0.05$）な上昇を示した（図9）。

D　CD14陽性細胞

MS の acute relapsing type のうち，増悪期は26.8±6.8%，寛解期は9.7±1.1%，chronic progressive type は25.6±7.8%，対照では10.9±4.9%であった。増悪期では，対照と比較して有意（$p<0.01$）に高値を示したが，寛解期では有意な差を認めなかった。また，chronic progressive type でも対照に比較して有意（$p<0.01$）に高値を示した（図10）。

また，MS 患者10例については，CD14陽性細胞の

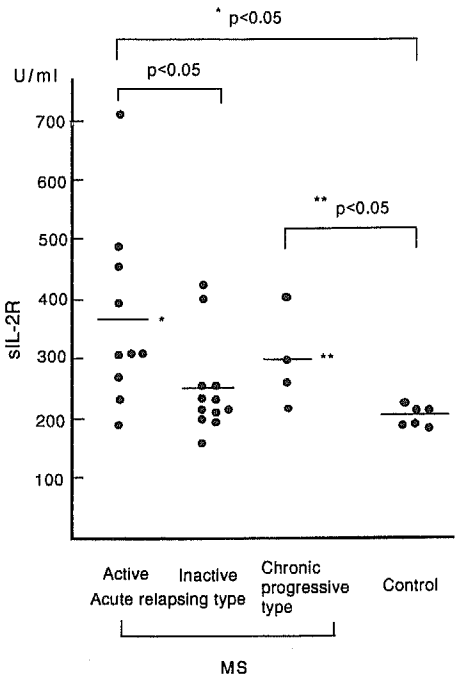

図9　血清 sIL-2R の測定値

Acute relapsing type の増悪期と chronic progressive type では対照に比べ，それぞれ有意に高値を示した（$p<0.05$, $p<0.05$）。

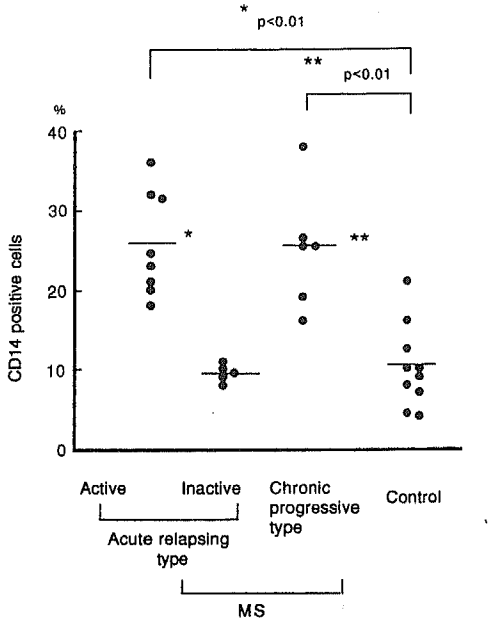

図10　末梢血単核球中の CD14陽性細胞（monocyte/macrophage）の割合

Acute relapsing type の増悪期および chronic progressive type は，対照に比較して有意（$p<0.01$, $p<0.01$）に高値を示した。

測定と同時に，前述の方法によって血清中の TNF を測定したが，いずれも対照と比較すると高値を示したが，両者に有意な相関はみられなかった（図11）。

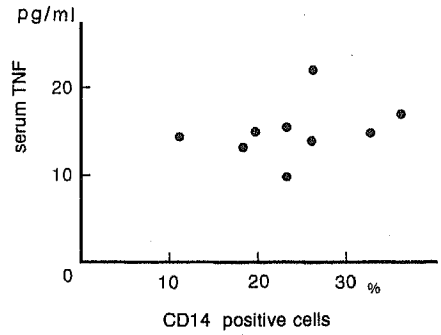

図11　MS 患者の血清 TNF および CD14陽性細胞の関係

両者に有意な相関は認められなかった。

Ⅳ 考　　察

今回の検討では，培養単核球上清中の IL-1 産生能については，IL-1β に関しては有意差は認めなかったが，IL-1α は MS 患者で有意に高値を示し，特に acute relapsing type の増悪期には著しい上昇を認めた。IL-1 は等電点5.0である IL-1α と，等電点7.0である IL-1β に分類されているが，その生物学的活性はほとんど同一で，レセプターも同一であることが知られている。

Selmaj ら[16]は MS 患者末梢血から得られた単核球を培養し，IL-1 産生能を調べたが有意な上昇がみられなかったと報告している。それに対し，Merrill ら[17]は血中と髄液中の培養 macrophage の IL-1 産生能について検討し MS 患者で有意な上昇が見られたことを報告しており，MS 患者の IL-1 の動態に関しては一定の結論は得られていない。両者の結果はいずれも biological assay に基づく測定によるものだが，今回のヒト IL-1 に対するモノクローナル抗体を用いた ELISA 法による測定の結果，MS 患者末梢血単核球の IL-1 産生能が，MS の病勢を反映して高値を示したことは注目すべき点である。MS 患者の脱髄斑周辺部で macrophage が有髄神経線維に付着し貪食像が認められ，局所的に IL-1 を産生しているという報告も

あり[18]，IL-1 が病変形成に関与している可能性が考えられる点からも，興味深い。さらに IL-1 は，TNF と同様に，培養ヒト血管内皮細胞に対し，表面抗原提示能をもち，内皮細胞に対するリンパ球の接着を増加させ，内皮細胞を障害することによって，脱髄の機序に深く関与していることが注目されている[19]。

MS における TNF の動態に関しては，Beck ら[20]が患者の macrophage の TNF 産生能が亢進していることを報告しており，また Hofman ら[6]は免疫組織学的に，MS 患者の脳内脱髄斑に TNF 陽性細胞を証明している。Selmaj と Raine[21]は，*in vitro* で TNF が myelin および oligodendrocyte を障害することを証明しており，さらに IL-1 と同様に内皮細胞の表面抗原提示能，リンパ球接着能の増強作用があることが報告されており[22]，TNF が脱髄の機序において果たす役割の重要性が注目されている。しかし，MS 患者の血清・髄液中の TNF を直接測定した結果では，必ずしも病勢に対応した所見は示されていない[23][24]。本報告において，human recombinant TNF に対するモノクローナル抗体を用いた ELISA 法により，MS 患者の髄液・血清中の TNF が MS の病勢をよく反映して高値を示し，さらに増悪期の MS 患者の髄液の細胞数が髄液中の TNF と相関することは TNF が MS の病因に関与している可能性が考えられる。

抗原や mitogen によって活性化された T 細胞は IL-2 および IL-2R を誘導し，T 細胞表面からの IL-2R の放出は，sIL-2R の増加と相関することが知られている[25]。そのため，血清中の sIL-2R の上昇は，末梢血中の活性化 T 細胞の増加を示していると考えられる[26][27]。今回，MS 患者血清中で，病勢を反映して sIL-2R の上昇がみられたことは，従来から知られているように，MS の病勢に T 細胞の活性化が関与していることを裏付けるものである。

従来より MS 患者の中枢神経脱髄巣において，形態学的に macrophage が活性化され myelin を貪食することが基本的な所見とされているが[28]，近年，Merrill ら[17]は MS 患者の末梢血および髄液中の macrophage の，prostaglandin E, IL-1, TNF の産生能が上昇しており，MS 患者で macrophage の活性化がみられ，脱髄に関与している可能性を指摘している。今回得られた，MS 患者末梢血単核球中で monocyte/macrophage 系細胞が相対的に増加している所見は，MS 患者で macrophage の機能的活性化が行われているだけでなく，量的にも MS の活動性を反映している可能性が示唆される。

本研究では，MS における cytokine の動態について検討した。MS における脱髄の機序については未だ不明な点が多いが，従来から MS における免疫学的異常の基盤に，T 細胞の活性化が関与していることが指摘されており[29]，sIL-2R が MS の病勢を反映して高値をとったことは，これを裏付けるものと考えられる。また，近年，中枢神経系の脱髄の機序として血液脳関門の破綻が重要視されており，各種の cytokine の血管内皮細胞へ及ぼす作用が注目されている。特に従来から注目されていたリンパ球だけでなく，monocyte/macrophage 系細胞の活性化と，それに伴う monokine の作用により，血管内皮細胞の抗原提示が促され，リンパ球の血管内皮への接着が増加し，その結果内皮細胞の障害により血液脳関門が破綻し，脱髄の初期の過程に重要な役割を果たすことが示唆されている[30][31]。なかでも TNF は，*in vitro* で myelin および oligodendrocyte を障害する報告があり，その MS の病因としての重要性が注目されている[32]。今回，monocyte/macrophage 系細胞により産生される，IL-1，TNF が MS の病勢を反映して高値を示し，また末梢血単核球中で，monocyte/macrophage の相対的な増加を示したことは，脱髄過程における monocyte/macrophage の重要性を，臨床的な面から裏付けるものといえる。

V 結　　語

1　MS 患者の培養単核球上清中の IL-1α は対照と比較して有意に高値を示し，特に acute relapsing type の増悪期で有意な上昇がみられたが，IL-1β は，対照と有意差を認めず，各病型ごとの比較でも有意差を認めなかった。

2　MS 患者髄液中の TNF は対照と比較して有意に上昇を認め，特に acute relapsing type の増悪期に有意に高値を示した。また，増悪期の MS 患者の髄液中 TNF は，髄液細胞数と有意な相関を示した。血清中の TNF は，MS 患者のうち，acute relapsing type の増悪期のみで著しい高値を示した。

3　MS 患者血清中の sIL-2R は，acute relapsing type の増悪期と chronic progressive type で有意な高値を認めた。

4　MS 患者末梢血単核球中の CD14陽性細胞の割合は，acute relapsing type の増悪期および chronic progressive type で，対照に比較して有意に高値を

示した。

本稿の要旨は，平成2年5月，第31回日本神経学会総会および平成3年5月，第32回日本神経学会総会で発表した。

稿を終えるにあたり，御指導と御校閲を賜りました，柳澤信夫教授に深甚なる謝意を表します。また，御教示，御指導下さいました信州大学保健健康管理センター所長，塚田直敬先生に深く感謝いたします。

文　献

1) Oppenheim, J. J., Kovacs, E. J., Matsushima, K. and Durum, S. K.: There is more than one interleukin 1. Immunol Today, 7: 45-56, 1986
2) Robbins, D. S., Shirazi, Y., Drysdale, B.-E., Lieberman, A., Shin, H. S. and Shin, M. L.: Production of cytotoxic factor for oligodendrocytes by stimulated astrocytes. J Immunol, 139: 2593-2597, 1987
3) Frei, K., Siepl, C., Groscurth, P., Bodmer, S., Schwardel, C. and Fontana, A.: Antigen presentation and tumor cytotoxicity by interferon-gamma treated microglial cells. Eur J Immunol, 17: 1271-1278, 1987
4) Pober, J. S., Bevilacqua, M. P., Mendrick, D. L., Lapierre, L. A., Fiers, W. and Gimbrone, M. A. Jr.: Two distinct monokines, interleukin 1 and tumor necrosis factor, each independently induce biosynthesis and transient expression of the same antigen on the surface of cultured human vascular endothelial cells. J Immunol, 136: 1680-1687, 1986
5) Cavender, D., Saegusa, Y. and Ziff, M.: Stimulation of endothelial cell binding of lymphocytes by tumor necrosis factor. J Immunol, 139: 1855-1860, 1987
6) Hofman, F. M., Hinton, D. R., Johnson, K. and Merrill, J. E.: Tumor necrosis factor identified in multiple sclerosis brain. J Exp Med, 170: 607-612, 1989
7) Brosnan, C. F., Selmaj, K. and Raine, C. S.: Hypothesis: A role for tumor necrosis factor in immune-mediated demyelination and its relevance to multiple sclerosis. J Neuroimmunol, 18: 87-94, 1988
8) Fisher, M., Levine, P. H., Weiner, B. H., Vaudreuil, C. H., Natale, A., Johnson, M. H. and Hoogasian, J. J.: Monocyte and polymorphonuclear leukocyte toxic oxygen metabolite production in multiple sclerosis. Inflammation, 12: 123-131, 1988
9) Selmaj, K., Plater-Zyberk, C., Rockett, K. A., Maini, R. N., Alam, R., Perkin, G. D. and Rose, F. C.: Multiple sclerosis, increased expression of interleukin-2 receptors on lymphocytes. Neurology (NY), 36: 1392-1395, 1986
10) Trotter, J. L., Clifford, D. B., Anderson, C. B., van der Veen, R. C., Hicks, B. C. and Banks, G.: Elevated serum interleukin-2 levels in chronic progressive multiple sclerosis. N Engl J Med, 318: 1206, 1988
11) Greenberg, S. J., Marcon, L., Hurwitz, B. J., Waldmann, T. A. and Nelson, D. L.: Elevated levels of soluble interleukin-2 receptors in multiple sclerosis. N Engl J Med, 319: 1019-1020, 1988
12) Sharief, M. K., Hentges, R. and Thompson, E. J.: The relationship of interleukin-2 and soluble interleukin-2 receptors to intrathecal immunoglobulin synthesis in patients with multiple sclerosis. J Neuroimmunol, 32: 43-51, 1991
13) Rose, A. S., Ellison, G. W., Myers, L. W. and Tourtellotte, W. W.: Criteria for clinical diagnosis of multiple sclerosis. Neurology (NY), 26: 20-27, 1976
14) Schumacher, G. A., Beebe, G., Kibler, R. F., Kurland, L. T., Kurtzke, J. F., McDowell, F., Nagler, B., Sibley, W. A., Tourtellote, W. W. and Willmon, T. L.: Problems of experimental trials of therapy in multiple sclerosis: Report by the panel on the evaluation of experimental trials of therapy in multiple sclerosis. Ann NY Acad Sci, 122: 522-570, 1965
15) Yone, K., Hashida, S., Tanaka, K., Ichikawa, Y. and Ishikawa, E.: Specific and sensitive sandwich enzyme immunoassay for human tumor necrosis factor-α. Clin Chem Enzym Comms, 3: 1-8, 1990

16) Selmaj, K., Nowak, Z. and Tchorzewski, H.: Interleukin-1 and interleukin-2 production by peripheral blood mononuclear cells in multiple sclerosis patients. J Neurol Sci, 85: 67-76, 1988
17) Merrill, J. E., Strom, S. R., Ellison, G. W. and Myers, L. W.: In vitro study of mediators of inflammation in multiple sclerosis. J Clin Immunol, 9: 84-96, 1989
18) Hofman, F. M., von Hanwehr, R., Dinarello, C. A., Mizel, S. B., Hinton, D. and Merrill, J. E.: Immunoregulatory molecules and IL-2 receptors identified in multiple sclerosis brain. J Immunol, 136: 3239-3245, 1986
19) Pober, J. S., Lapierre, L. A., Stolpen, A. H., Brock, T. A., Springer, T. A., Fiers, W., Bevilacqua, M. P., Mendrick, D. L. and Gimbrone, M. A. Jr.: Activation of cultured human endothelial cells by recombinant lymphotoxin: Comparison with tumor necrosis factor and interleukin 1 species. J Immunol, 138: 3319-3324, 1987
20) Beck, J., Rondot, P., Catinot, L., Falcoff, E., Kirchner, H. and Wietzerbin, J.: Increased production of interferon gamma and tumor necrosis factor precedes clinical manifestation in multiple sclerosis: Do cytokines trigger off exacerbations? Acta Neurol Scand, 78: 318-323, 1988
21) Selmaj, K. W. and Raine, C. S.: Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage in vitro. Ann Neurol, 23: 339-346, 1988
22) Hughes, C. C., Male, D. K. and Lantos, P. L.: Adhesion of lymphocytes to cerebral microvascular cells: effects of interferon-γ, tumor necrosis factor and interleukin-1. Immunol, 64: 677-681, 1988
23) Franciotta, D. M., Grimaldi, L. M. E., Martino, G. V., Piccolo, G., Bergamaschi, R., Citterio, A. and Melzi d'Eril, G. V.: Tumor necrosis factor in serum and cerebrospinal fiuid of patients with multiple sclerosis, Ann Neurol, 26: 787-789, 1989
24) Gallo, P., Piccinno, M. G., Krzalic, L. and Tavolato, B.: Tumor necrosis factor alpha (TNFα) and neurological diseases. Failure in detecting TNF α in the cerebrospinal fluid from patients with multiple sclerosis, AIDS dementia complex, and brain tumours. J Neuroimmunol, 23: 41-44, 1989
25) Rubin, L.A., Kurman, C.C., Fritz, M.E., Biddison, W.E., Boutin, B., Yarchoan, R. and Nelson, D.L.: Soluble interleukin 2 receptors are released by activated human lymphoid cells in vitro. J Immunol, 135: 3172-3177, 1985
26) Bellamy, A. S., Calder, V. L., Feldmann, M. and Davison, A. N.: The distribution of interleukin-2 receptor bearing lymphocytes in multiple sclerosis evidence for a key role of activated lymphocytes. Clin Exp Immunol, 61: 248-256, 1985
27) Hartung, H.-P., Hughes, R. A. C., Taylor, W. A., Heininger, K., Reiners, K. and Toyka, K. V.: T cell activation in Guillain-Barrē syndrome and in MS: Elevated serum levels of soluble IL-2 receptors. Neurology (NY), 40: 215-218, 1990
28) Prineas, J. W. and Graham, J. S.: Multiple sclerosis: Capping of surface immunoglobulin G on macrophages engaged in myelin breakdown. Ann Neurol, 10: 149-158, 1981
29) Hafler, D. A., Fox, D. A., Manning, M. E., Schlossman, S. F., Reinherz, E. L. and Weiner, H. L.: In vivo activated T-lymphocytes in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. N Engl J Med, 312: 1405-1411, 1985
30) Male, D., Pryce, G., Hughes, C. and Lantos, P.: Lymphocyte migration into Brain modelled in vitro: Control by lymphocyte activation, cytokines, and antigen. Cell Immunol, 127: 1-11, 1990
31) Raine, C. S., Cannella, B., Duijvestijn, A. M. and Cross, A. H.: Homing to central nervous system vasculature by antigen-specific lymphocytes. Lab Invest, 63: 476-489, 1990
32) Cavender, D. E., Edelbaum, D. and Ziff, M.: Endothelial cell activation induced by tumor necrosis factor and lymphotoxin. Am J Pathol, 134: 551-560, 1989

(4. 4. 28 受稿)