

## 脊髓血管内皮細胞の膜成分の感作による 慢性自己免疫性脱髄疾患モデルの研究

井 上 敦  
信州大学医学部第3内科学教室  
(主任: 柳沢信夫教授)

### Chronic Experimental Allergic Encephalomyelitis Induced by Immunization with Spinal Cord Endothelial Cell Membrane

Atsushi INOUE

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

An experimental animal model of multiple sclerosis induced by immunization with spinal cord endothelial cell membrane is studied. We prepared spinal cord microvessels and cultured spinal cord endothelial cell membrane from rat spinal cord. Both were free from myelin components, such as myelin basic protein and proteolipid apoprotein.

The immunized animals developed chronic neurological illness. Histological examination of the spinal cord and brain stem in the acute stage revealed mononuclear cells and polymorphonuclear cells attached to the endothelial cell and infiltrated around blood vessels, and in the chronic phase showed widespread areas of demyelination. These lesions were similar to those in multiple sclerosis. The levels of anti-endothelial cell antibody and circulating immune complexes in the sera of animals with chronic neurological symptoms were increased significantly. The incidence of the disease was higher in the animals immunized with endothelial cell membranes than in those immunized with microvessels.

The results suggest that the cell membrane of cultured spinal cord endothelial cell possesses a demyelinating encephalitogenic activity.

This appears to be a useful new animal model for the investigation of the human demyelinating disease, multiple sclerosis. *Shinshu Med. J.*, 36: 369-381, 1988

(Received for publication December 3, 1987)

---

**Key words:** multiple sclerosis, spinal cord endothelial cells, demyelination

多発性硬化症, 脊髓血管内皮細胞, 脱髄

---

#### I 緒 言

慢性の脱髄疾患である多発性硬化症(以下MS)は中枢神経系に対する自己免疫疾患と考えられているがその成因は不明である。この疾患モデルとして実験的

アレルギー性脳脊髄炎(以下EAE)が挙げられ、従来抗原としてミエリンの主な構成タンパクの1つであるミエリン塩基性タンパク(以下MBP)等が検索されてきている。しかしMSとEAEとでは種々の点で相違が見られる。組織学的にはMSでは経過により

異なるが基本的な病像は広範な遠心性の脱髄である。EAE では炎症性細胞の浸潤がより著しく血管周囲の脱髄は認められない事が多い<sup>1)2)</sup>。臨床的には MS が寛解と増悪を繰り返して徐々に悪化する疾患であるのに対し、EAE は通常は急性単相性の経過を取り発症するとそのまま進行し死に至るか回復して再発しないことが多い。近年慢性再発性 EAE (CREAE) の研究が進み臨床的には MS に類似した実験モデルも作成されてきている<sup>3)-10)</sup>。この CREAE は同種脊髄全成分を幼若 Strain 13 モルモットに感作することによってひきおこされる。しかし他の動物、他の系のモルモットに CREAE をおこすことは難しく CREAE の発症には動物の種、抗原の量、感作の際に使用する complete Freund's adjuvant (CFA) 中の結核死菌の量、感作動物の中樞神経系の成熟度など種々の要因が満たされなければならない。また抗原の側も脊髄全成分の中のどの成分が慢性化、症状の増悪と寛解に関与しているのか不明である、一方 MS において血液脳関門 (以下 BBB) が破壊され、血管の透過性が亢進していることが知られている<sup>11)12)</sup>。BBB は主に脳血管内皮細胞により構成されているがこの内皮細胞は一般臓器のものとは異なり高度な酵素活性、代謝活性を持ち中樞神経系独自の毛細血管における水および電解質の透過性の動態や脳血流量の調節など中樞神経系のホメオスタシスに重要な役割を果たしていることが明らかになっている<sup>13)-16)</sup>。また EAE でも発症初期に毛細血管の透過性が亢進し血漿中の蛋白質が血管外に漏出することが知られ<sup>17)-21)</sup>この BBB を構成する血管内皮細胞を免疫学的に破壊させる因子を究明する事が脱髄機序を明らかにする上で重要である<sup>22)</sup>。近年塚田等はラット脳より分離、培養した血管内皮細胞膜成分をモルモットに感作することにより慢性の脱髄疾患モデルを作成し脳内に広範な脱髄をおこすと報告し注目されている<sup>23)</sup>。今回我々は脊髄血管内皮細胞の膜成分を用いることにより MS にきわめて類似した慢性自己免疫性脱髄疾患モデルを作成することに成功した。この実験モデルについて組織学的、免疫学的に検索したので報告する。

## II 方 法

### A 抗原の調製

生後10日前後の Osborne-Mendel ラット (静岡農協) の脊髄を無菌的に取り出し、硬膜成分を除去した後、Hepes 加乳酸加リンゲルを脊髄1本あたり0.5ml 加えホモゲナイズした。これを遠沈管にうつし4倍量

の Hepes 加乳酸加リンゲルを加えよく攪拌し 1,500 × g, 10分間遠心し上清を除去して洗浄した。この操作を2回行い上清を除去し洗浄したのち2倍量の0.25M の蔗糖液中にて攪拌後 1.0/1.5 M の蔗糖密度勾配上に静かに重層し 58,000 × g, 90分超遠心した。1.0M と 1.5 M の中間に浮遊する ミエリン成分を注意深く除去し遠沈管の底に沈澱した毛細血管成分を取り出した。これに4倍量のペニシリン、ストレプトマイシン、ファンギーゾン加 Hanks' balanced salt solution (HBSS) (Gibco 製) を加え 1,000 × g にて遠心し上清を除去し洗浄した。この洗浄を2回行い得た毛細血管成分で感作した群を group 1 とした。また一方洗浄した毛細血管成分を HBSS 中 0.01% トリプシン・コラゲナーゼにて 37°C, 1分間消化させ毛細血管内皮細胞を分離、30% 加熱 - 不活性化ウシ胎児血清、ペニシリン・ストレプトマイシン・ファンギーゾン、内皮細胞成長因子 (Collab 製) 加 199 培地 (Gibco 製) で培養を行い均一な脊髄血管内皮細胞を得た<sup>24)25)</sup>。この培養血管内皮細胞を Dounce homogenizer にて破碎したのち 0°C, 蒸留水中に1晩浮遊させて osmotic shock を加え 1,000 × g, 10分間遠心し上清を除去することにより可溶性の細胞質成分を除いた。この蒸留水による洗浄を2回繰り返した後 膜成分を HBSS 中に浮遊させ 10分間超音波破碎にかけてから 25,000 × g, 5分間超遠心し基底膜成分 (Pellet) を除去し上清中の血管内皮細胞膜成分をえた<sup>26)27)</sup>。この血管内皮細胞成分で感作した群を group 2 とした。

### B 抗原の検討

毛細血管成分と血管内皮細胞膜成分はスラブ-SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) にかけて検討した。SDS-PAGE は Laemmli の方法に従って行った<sup>28)</sup>。すなわち試料を SDS 化し、0.1% SDS を含む 13% ポリアクリルアミドゲル (厚さ 0.4mm) 上の 5% 濃縮ゲル上端にのせトリス緩衝液 (0.02M トリス, pH 8.3, 0.192M グリシン, 0.1% SDS) 中 25 mA 定電流でゲル下端より 1 cm の所まで泳動した。固定は水:エタノール:酢酸 (9:9:2, V/V/V) で行い、水:エタノール:酢酸 (83:10:7, V/V/V) 中 0.001% クマジーブリリアントブルー色素にて染色した。In vitro での血管内皮細胞の存在は血管内皮細胞に特有な酵素とされる  $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼおよびアルカリフォスファターゼ<sup>29)30)</sup> をカバースリップに付着した細胞を染色して証明する事により行った。さらに培養脊髄血管内皮細胞およびその膜

成分は電顕標本を作り観察した。

ミエリン塩基性タンパク (Myelin basic protein : MBP) の混入の可能性については enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) により検討した。ELISA は 25ng のミエリン塩基性蛋白まで検出可能な高力価の抗ラットミエリン塩基性蛋白モルモット血清を用いて行った。

### C 抗原の実験動物への感作

実験動物：感作動物は生後 2～3 週齢, 200 g 前後のハートレイ株幼若モルモット (日本生物学研究所) 80 匹を使用した。

Group 1: 上記にて調製した脊髄毛細血管成分を 1 匹あたり 500 $\mu$ g を 0.25ml の生理的食塩水中に浮遊させ等量の CFA (5mg/ml の *Mycobacterium bovis* を含む) を加えホモゲナイズし 40 匹のハートレイ株モルモットの背部皮内に注射した。

Group 2: 培養脊髄血管内皮細胞膜成分を 1 匹あたり 250 $\mu$ g を同様にして 40 匹のハートレイ株モルモットに CFA とともに感作した。感作モルモットの臨床症状を毎日観察した。

### D 組織学的および電顕的検索

モルモットは死亡直前に心臓内にカテーテルを挿入して micrometering pump を用いて 100mmHg の圧で 0.1M 磷酸緩衝生理的食塩水 (PBS, pH7.2) 中 3% グルタルアルデハイドにて灌流固定を行った。固定後, 脳, 脊髄, 腎臓, 肺などを注意深く取り出した。脳は視床, 中脳, 橋および延髄の部分で切片を作った。脊髄は上部頸髄, 下部頸髄, 上部胸髄, 下部胸髄, 腰髄, 仙髄のレベルで切片を作成した。通常の組織学的検索では灌流固定したモルモットの臓器は 10% 磷酸緩衝ホルマリン液で固定して, ヘマトキシリンエオシン (HE) 染色, ルクソールファストブルー染色, ヴェルケ染色を行った。また電顕用標本は灌流固定後さらに 3% グルタルアルデハイド磷酸緩衝液で 1 時間固定した。その後磷酸緩衝液 (pH7.2) で 3 回洗浄し, 1% オスミウム酸にて 1 時間後固定した。以後アルコール脱水, エポン包埋し, LKB Ultratome で薄切し一部はトルイジンブルーで染色し, 光顕にて検索した。また超薄切片はクエン酸鉛, 酢酸ウラニールで染色し, 電顕 (日立 HU-11A) にて観察した。

### E 細胞性免疫の検索

各感作動物の毛細血管成分および血管内皮細胞膜成分, ミエリン塩基性蛋白, プロテオリピッドアポ蛋白に対する細胞性免疫を調べるため皮内反応テストを行っ

た。

Group 1, group 2 おのおの感作 14 日後のモルモットの背部皮内に 50 $\mu$ g の前記抗原を含む生食 0.05ml をおのおの注射し, その部位を 24, 48 および 72 時間後に観察した。

### F 液性免疫の検索

#### 1: 抗血管内皮細胞抗体価の測定

抗血管内皮細胞抗体価は被検モルモット血清中の培養血管内皮細胞と結合する IgG の量を測定することにより表した。7 日間培養した血管内皮細胞  $1.5 \times 10^6$  個を小試験管にとり PBS にて 3 回洗浄後 500 $\times$ g, 5 分間遠心しペレットを作った。これに PBS で 4 倍希釈した被験血清 0.05ml を加えゆっくり混和した後 37°C, 30 分間反応させた。PBS にて 3 回洗浄後ペレットに 100 $\mu$ l の 10 倍希釈アルカリフォスファターゼラベルヒツジ抗モルモット IgG (Kirkegaard and Perry Laboratories Inc.) を加えてゆっくり混和したのち 37°C, 1 時間反応させた。0.05% Tween 20 加 PBS にて 3 回洗浄後ペレットに 0.05M ナトリウム炭酸緩衝液 (pH 9.8) 中パラニトロフェニルフォスフェイト (Technicon) 1mg/ml を 1ml 加え 37°C, 30 分間反応させた後 1M の水酸化ナトリウムを加え反応を停止させた。これを 800 $\times$ g, 10 分間遠心し上清 250 $\mu$ l を ELISA 用マイクロプレート (NUNC) に移し MTP-12 コロナ 2 波長マイクロプレート光度計 (Corona, Japan) にて吸光度 (Optical Density ; O.D. 値) を測定した。なお抗血管内皮細胞抗体価は O.D. 値で表した。

#### 2: Circulating immune complex の測定

Cunningham-Rundles 等が開発した Raji 細胞 enzyme-linked immunosorbent assay 法を改良して測定した<sup>31)</sup>。

Raji 細胞 (大日本製薬総合研究所) は, RPMI 1640 培養液に胎児ウシ血清を 10% 添加して培養液とし, 3 日ごとに培養液を交換し, 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター中で 37°C で継代培養を行った。培養液交換後 3 日目の Raji 細胞をトリパンブルーで超生体染色し, 細胞が 95% 以上生存している事を確認した後, 磷酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH7.2) で 3 回洗浄し, 測定用 Raji 細胞とした。上記 Raji 細胞  $1.5 \times 10^6$  個ずつを小試験管に取り, 低速遠心 (400 $\times$ G, 5 分間) 後上清を除去しペレットを作った。これに 4 倍希釈被験血清 0.05ml を加えて細胞を再浮遊させ混和したのち 37°C, 30 分間反応させた。細胞を再び PBS で 3 回洗浄しそのペレ

トに 100 $\mu$ l の10倍希釈アルカリフォスファターゼ標識ヒツジ抗モルモット IgG (Kirkegaard and Perry Laboratories Inc.) を加え緩やかに混和した後37°C, 1時間反応させ0.05% Tween 20加 PBS で3回洗浄し 400 $\times$ g 5分間遠心後上清を除去した。

ペレットに0.05Mナトリウム炭酸緩衝液 (pH 9.8) 中パラニトロフェニルフォスフェイト (Technicon) 1mg/ml を 1ml 加えた。ゆっくり混和後37°C, 30分反応させ 1 M水酸化ナトリウム 1 ml を加えて反応を止めた。これを 800 $\times$ g 10分間遠心し上清 250 $\mu$ l を ELISA 用マイクロプレート (NUNC) に移し MTP-12 コロナ2波長マイクロプレート光度計にて吸光度 (O. D. 値) を測定した。

標準曲線の作成:

Circulating immune complex の定量は加熱凝集モルモットガンマグロブリン (AGG) を用いて標準曲線を作成して行った。AGG は Theophilopoulos ら<sup>32)</sup>の方法に従ってモルモット IgG を 63°C の温浴中にて30分間加熱することにより作製した。この AGG を正常モルモット血清に加え 0-4,000 $\mu$ g/ml の種々の段階に調製した。これら AGG 加正常モルモット血清を PBS で 4 倍希釈し 0.05ml を Raji 細胞の pellet に加え上記の方法に従って反応を進めおの O. D. 値を測定しサインカーブを描く標準曲線 (Fig. 1) を作製した。測定した circulating immune complex の値は標準曲線に基づいて  $\mu$ gAGGeq/ml (1 $\mu$ gAGG eq/ml は AGG で 1 $\mu$ g/ml 相当の濃度であることを

示し immune complex の定量に一般につかわれている単位である) で表した。

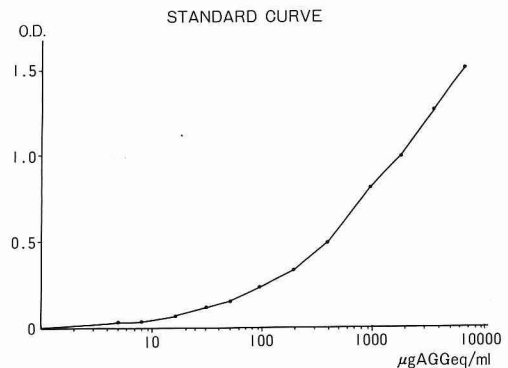


Fig. 1 加熱変性凝集モルモット IgG を希釈測定して得た標準曲線。

### III 結 果

#### A 脊髄血管内皮細胞の性状

培養血管内皮細胞はアルカリフォスファターゼおよび  $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ陽性に染色された。電顕では血管内皮細胞は特徴的な junctional complex を有する細胞形態をとり (Fig. 2) 血管内皮細胞膜成分は無定型な均質な膜状構造 (Fig. 3) として観察された。SDS ポリアクリルアミド電気泳動では毛細血管成分では血管内皮細胞膜成分に比べ band 数が多くしかも分子量も大きい傾向にあった。いずれ

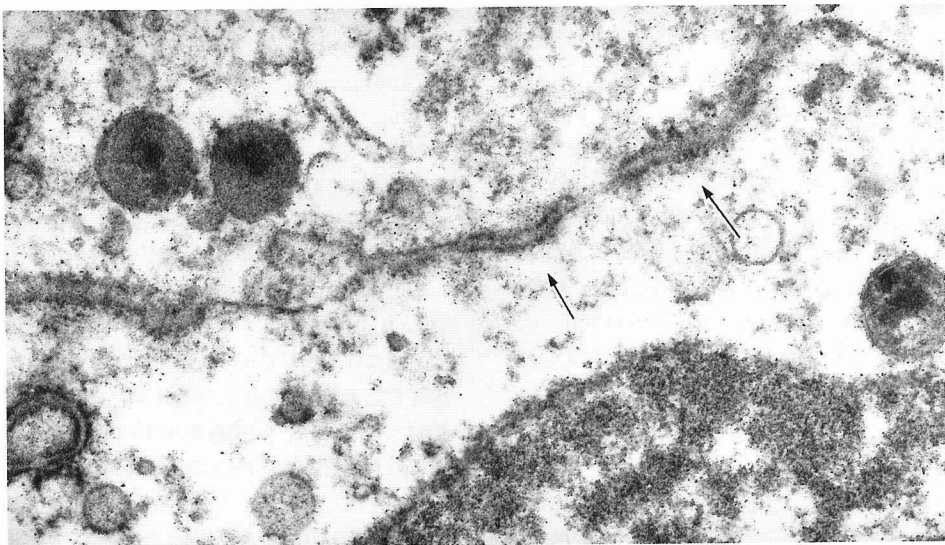


Fig. 2 培養血管内皮細胞の電顕像 ↑は junctional complex を示す。×6,750

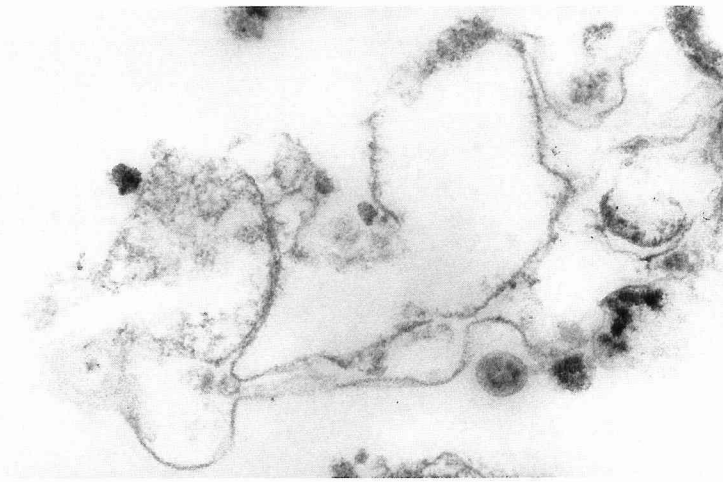


Fig. 3 培養血管内皮細胞膜成分の電顕像  $\times 10,000$

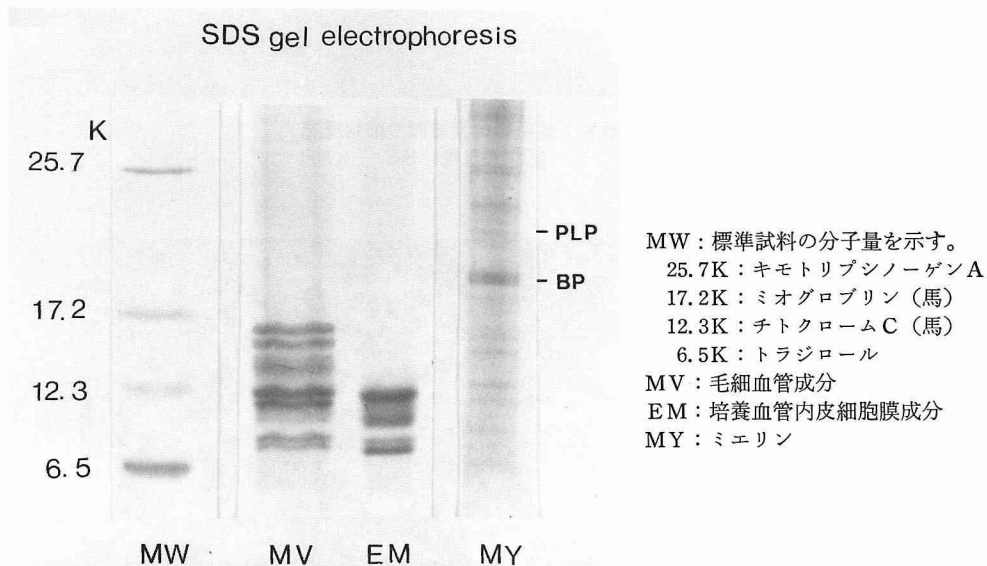


Fig. 4 SDS ポリアクリルアミド電気泳動図

もミエリン塩基性タンパク (BP) やプロテオリビドアポタンパク (PLP) の band は認めなかった。血管内皮細胞膜成分では分子量 8,000 から 12,000 の間の 3 本の band がみられた (Fig. 4)。

また ELISA 法を用いてさらに MBP の混入の可能性について検討した。毛細血管成分, 血管内皮細胞成分のおおの 250 $\mu$ g ずつを ELISA により検討したがいずれの O.D. 値とも対照に検討した 25ng の MBP 混入した毛細血管成分 および 血管内皮細胞膜成分 250 $\mu$ g の O.D. 値を大幅に下回り 0.01% 以下の混入率であった。

## B 中枢神経障害

臨床経過:

Group 1 では 40 匹中 20 匹 (50%) が感作後 14~21 日後より徐々に脱毛, 体重減少が出現し運動失調, 両後肢麻痺が認められた。2 匹 (5%) でミオクローヌスもみられた。このうち 10 匹 (25%) は数日以内に下痢, 失禁を伴い全身が衰弱し死亡した。8 匹 (20%) は発症後 20 から 30 日の経過で徐々に後肢不全麻痺から完全対麻痺, 四肢完全麻痺へと慢性的経過を取り徐々に進行しやがて痙攣などの症状を伴い呼吸麻痺を呈して死亡した。2 匹 (5%) は途中で進行が止まり回復に向

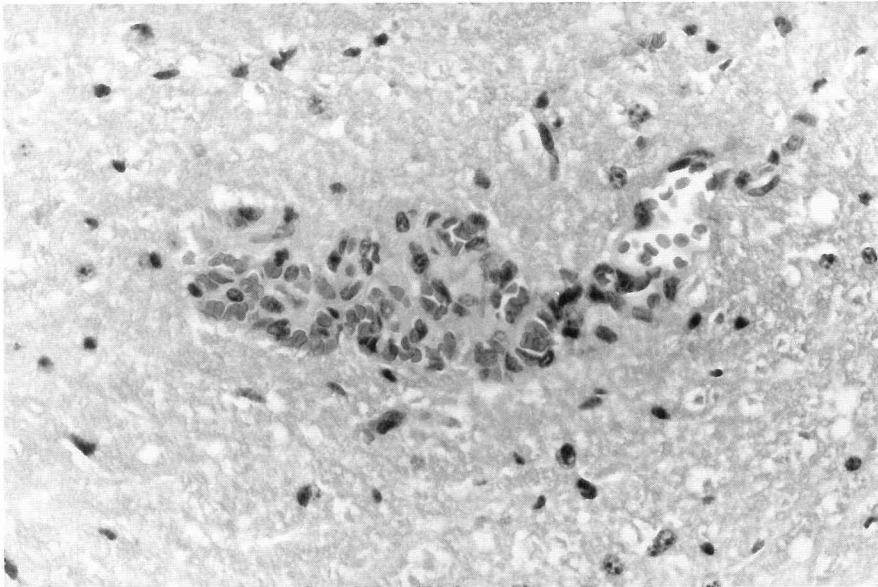


Fig. 5 初期病変：後毛細血管周囲の細胞浸潤  
感作30日後 HE ×300

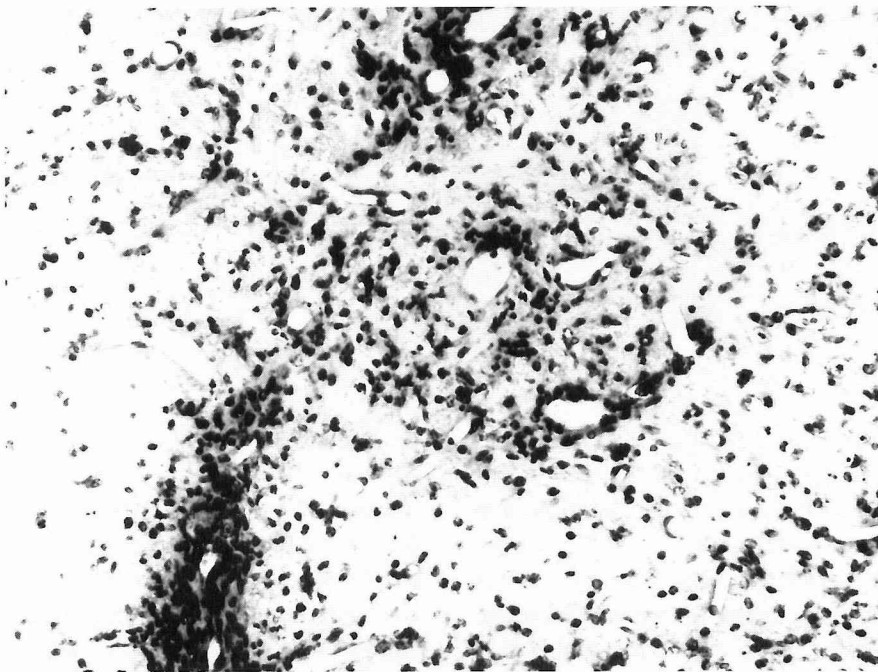


Fig. 6 初期病変：小血管周囲の細胞浸潤  
感作30日後 HE ×250

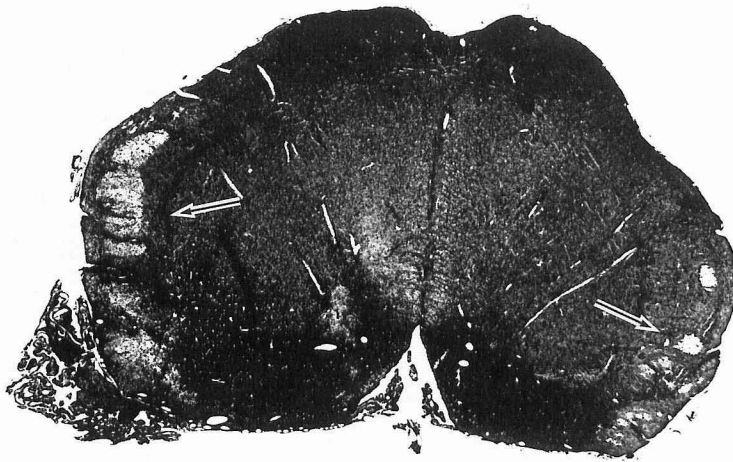


Fig. 7 慢性期病変：脳幹部白質の広範な脱髄（矢印） 感作60日後  
ルクソールファストブルー+HE ×10

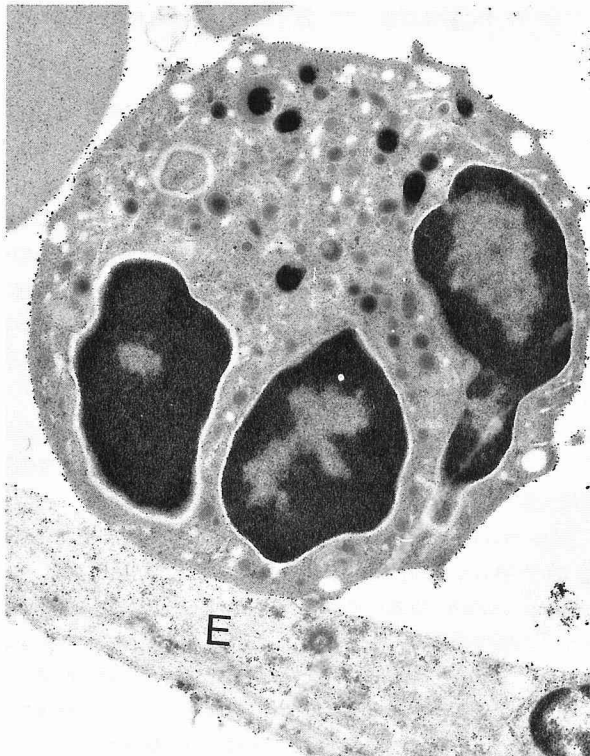


Fig. 8 初期病変：血管内皮細胞（E）への多形核  
白血球付着を示す。 感作20日後 ×15,000



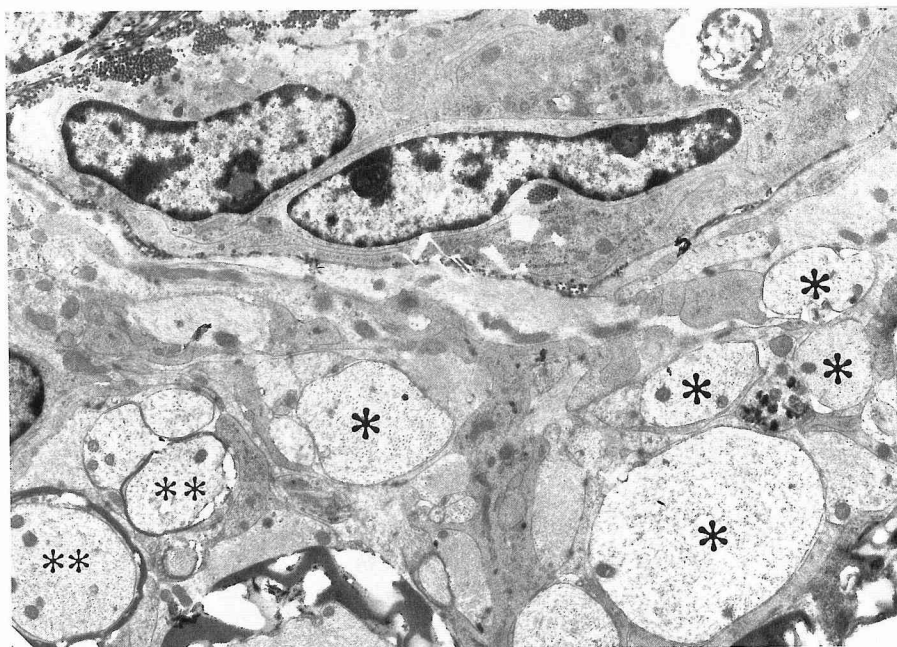


Fig. 9 Fig. 7 の部分の電顕像  
 \*: 脱髄線維 \*\* : 再生線維 ×6,000

かった。

Group 2では40匹中38匹(95%)が感作後14~21日後より徐々に脱毛, 体重減少が出現し運動失調, 両後肢麻痺がみられた。6匹(15%)でミオクロームスが見られた。いずれも慢性に経過し麻痺は後肢不全麻痺から完全四肢麻痺へと徐々に進行し30匹(75%)は発症後20から30日の経過で痙攣, 呼吸麻痺などを伴い死亡した。8匹(20%)は途中で進行が止まり回復しこのうち2匹(5%)は回復10日後より再び神経症状を呈して回復するという増悪と寛解を繰り返した。

#### 組織所見:

急性期の初期の病理所見は大脳白質, 小脳白質, 中脳から上部頸髄白質にかけての postcapillary venule 周囲の単核細胞浸潤 (Fig. 5) が中心である。急性期の後期ではこの post capillary venule 周囲の単核球主体の細胞浸潤に加え大脳, 小脳の白質のミエリン染色で軽度の淡明化が見られた。また小血管よりの軽度の出血, 小血管周囲の浮腫および細胞浸潤がみられた (Fig. 6)。発症後40日の慢性期では小脳, 脳幹部, 頸髄白質を中心に脱髄が見られた (Fig. 7)。脱髄は常に血管を中心としてみられた。従来の EAE の病巣が血管周囲の細胞浸潤が主で脱髄は軽度であるのに比較

して本モデルの慢性期では炎症細胞はあまり見られないが脱髄病巣は広範であり徐々に広がり形も不規則であった。また新旧の病巣の混在はなかった。病変の性状は group 1, group 2 とも同一であった。病変の分布は group 1では小脳, 脳幹部, 上部頸髄の白質に主として見られ特に上部頸髄で著しかった。これに対して group 2では大脳, 小脳, 特に脳幹部の白質が主で脊髄の病変は軽度であった。

#### 電顕所見:

病変部位の電顕所見は急性期では小血管周囲に単核細胞の浸潤, 小血管内皮細胞への多形核白血球および単核細胞の付着がみられた (Fig. 8)。慢性期では病変部位での広範に脱髄線維および再生線維がみられた (Fig. 9) が細胞浸潤はめだたなかった。また一部軽度ではあるが血管内皮細胞内に免疫複合体をおもわせる高電子密度物質の存在を認めた。

#### C 腎臓および肺の所見

腎臓では軽度の糸球体のメサンギウム細胞の増生, 間質への単核細胞の浸潤が見られた。肺では単核細胞の間質への浸潤, 肺泡出血が見られた。

#### D 細胞性免疫 (皮内反応)

皮内反応は group 1, group 2 ともに MBP, PLP



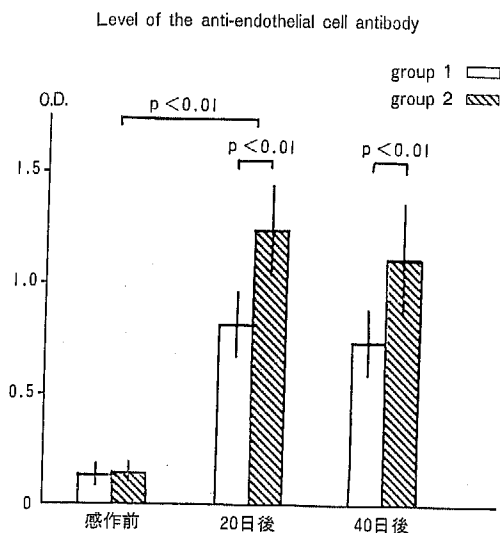


Fig. 10 抗血管内皮細胞抗体価の推移を示す。

では陰性であったが毛細血管成分、血管内皮細胞膜成分ではともに陽性であった。

#### E 液性免疫

抗血管内皮細胞抗体価：

血清中抗血管内皮細胞抗体価は感作前、感作20日後、40日後の血清を測定した。

Group 1 の抗体価は次のとおりであった (O. D. 値)。感作前： $0.124 \pm 0.056$  (mean  $\pm$  SD), 20日後： $0.846 \pm 0.148$ , 40日後： $0.753 \pm 0.134$ 。

Group 2 の抗体価は感作前： $0.142 \pm 0.076$ , 20日後： $1.278 \pm 0.216$ , 40日後： $1.156 \pm 0.236$  であった。すなわち抗血管内皮細胞抗体価は group 1, group 2 とも感作前に比較して感作後有意に上昇した ( $p < 0.01$ )。また group 2 では group 1 に比較して感作20日後および40日後の血清において抗血管内皮細胞抗体価は有意に高かった ( $p < 0.01$ ) (Fig. 10)。また group 1, group 2 ともに臨床経過が重症なものほど抗体価は高値の傾向にあった。

Circulating immune complex：

Circulating immune complex も感作前、感作20日後、40日後の血清で測定した。

Group 1 の immune complex 値 ( $\mu\text{g AGG eq/ml}$ ) は感作前： $49.6 \pm 10.6$ , 20日後： $187 \pm 26.6$ , 40日後： $216 \pm 24.8$ 。

Group 2 では 感作前： $51.8 \pm 12.8$ , 20日後： $164 \pm 32.8$ , 40日後： $178 \pm 18.6$  とともに20日後より circulating immune complex 値は感作前に比較

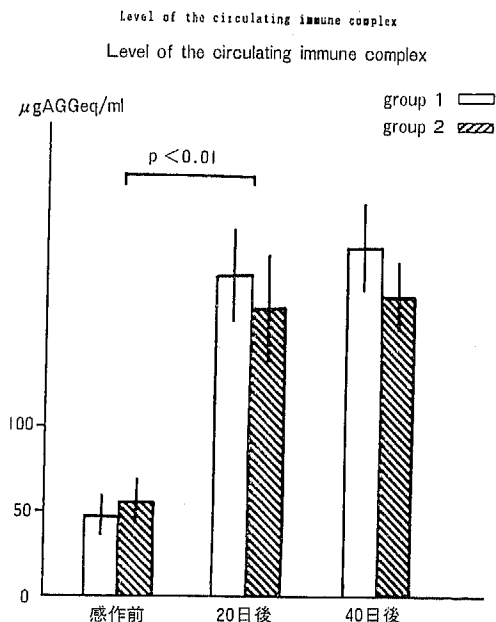


Fig. 11 Circulating immune complex 値の推移を示す。

し有意に上昇していた ( $p < 0.01$ )。なお circulating immune complex 値は group 1 と group 2 との間に有意の差を認めなかった (Fig. 11)。

#### IV 考 察

慢性の脱髄疾患である MS の動物実験モデルとして EAE が研究されてきたが両者の相違点は多い。MBP は強い EAE 起炎性を持つが MBP による EAE では組織学的には軽度の脱髄しか示さない。これに対し症状の軽度な経過をとる EAE では脱髄が特徴的な所見である<sup>33)</sup>。しかし MS の組織所見は広範な遠心性の脱髄斑であり炎症性細胞の浸潤があまりないのに対し EAE では脱髄は小血管周囲の狭い領域に限られ多くの炎症性細胞の浸潤をとまっており両者の病変を比較することは難しいとされてきた<sup>1)2)</sup>。EAE は基本的には血管の障害であり脱髄は2次的なものにすぎないとする研究者もいる<sup>2)</sup>。

近年幼若 Strain 13 モルモットに同種脊髄を感作することにより臨床的には増悪と寛解を繰り返す運動麻痺を特徴とし組織学的には主として脊髄を中心に広範な脱髄を呈する慢性再発性 EAE (CREAE) が誘導されるようになってきており現在のところこれがもっとも MS に近い動物実験モデルとされている<sup>6)-10)34)35)</sup>。

しかし脊髄のどの成分が CREAE を惹起する因子となっているのかは明らかではない。これ迄検討された MBP, MBP+Lipid, ミエリンについてはいずれも否定的である<sup>36)</sup>。MBP とならんでミエリンの主要な構成タンパクの1つである PLP も慢性の EAE をおこしうとの報告もあるが<sup>37)-39)</sup>、我々が検討した限りでは発症率も低く脱髓の所見も軽度であった。一方最近 Tsukada らはラットの大脳より調製した脳血管内皮細胞膜成分の感作により新たな脱髓疾患モデルを作製した<sup>23)</sup>。このモデルでは臨床的に慢性再発性の経過をとり組織所見では MS に類似した広範な脱髓が特徴でこれはこれまでの EAE にはみられないものである。今回の我々の研究で脊髄の血管内皮細胞膜成分にも同様な強い脱髓起炎性があることが証明された。臨床経過は毛細血管感作群では発症率は50%と低く10%は急性の経過をとって死亡したのに対し血管内皮細胞膜成分感作群では発症率は95%と高く、しかも発症例は全例慢性に経過しておりこのことは血管内皮細胞成分中に慢性 EAE を引きおこす因子が含まれていることを強く示唆する。当然のことながら本モデルの感作に用いた抗原に従来より知られているミエリン中の脳炎起炎物質の混入が問題となるが血管成分調製過程での蔗糖密度勾配を用いた超遠心でミエリンは除去されておりさらに洗浄や7日間の培養をおこなっており混入は考えにくい。さらに SDS ポリアクリルアミド電気泳動図でみると毛細血管成分、血管内皮細胞膜成分ともに MBP や PLP は含まれていない。今回のモデルがこれらのミエリン成分で発症したものではない。さらにもっとも問題となる MBP については高力価の抗 MBP 抗体を用い ELISA 法にて検討したが存在したとしても0.01%以下であり発症に関与したとは考えられない。また毛細血管内皮細胞膜成分のクロロホルム・メタノール(2:1)で抽出される成分を用いて発症実験をしたがこの成分に起炎性はなく本モデルを発症させる物質はガラクトセレブロシド等の脂質成分でなく血管内皮細胞膜成分に含まれるなんらかのタンパクが発症に関与しているものと考えられる。なお毛細血管成分では band の数多く培養血管内皮細胞膜成分に比べ基底膜成分や血管周囲の結合組織などの種々の成分が含まれていると考えられる。組織所見は両群とも基本的に差は認められなかったが毛細血管成分で感作したものでは病変は脊髄を中心に認められたが培養血管内皮細胞膜成分で感作したものでは脳幹部が主体であった。慢性の経過をとった例では MS にきわめて類似した

広範な脱髓が見られた。初期病変は単核細胞の浸潤のほかに多核球および単核球が血管内皮細胞に付着するのが特徴である。また慢性病変ではミエリンを食食するマクロファージの浸潤は認められなかった。これらの組織所見はいずれも MS の組織所見にきわめて類似しており本モデルが新たな MS の動物実験モデルとなり得ることを示唆するものである。病変部位については毛細血管成分感作群では、脊髄特に上部頸髄に病変が著しかったのに対し血管内皮細胞膜成分感作群では病変部位は脳幹部が主であるが脊髄にも軽度みられた。このことについては毛細血管成分感作群では抗原に基底膜成分、血管周囲結合組織成分その他種々の脊髄特有の成分が含まれていると考えられ、これらの影響により脊髄が選択的に冒されたのであろうと考えられる。本モデルの免疫学的検討では皮内反応が陽性であり初期の組織所見で脊髄血管内皮細胞への単核細胞の付着を認める事から細胞性免疫の関与が示唆されるが、血清中の circulating immune complex, 抗血管内皮細胞抗体価も高値であり、液性免疫も同時に関与しているものと考えた。Circulating immune complex, 抗血管内皮細胞抗体価は幼若 Strain 13 モルモットを同種脊髄で感作することにより惹起される CREAE でも上昇すると報告されているが<sup>40)</sup>、本モデルでは両者の値はより高値であった。また塚田らは脳血管内皮細胞内に immune complex と思われる高電子密度物質の存在を示しており<sup>23)</sup>今後本モデルの液性免疫についてもさらに詳しい検索が必要である。

血管内皮細胞は血液脳関門の主要な構成要素でありブドウ糖、アミノ酸などの栄養素の選択的輸送に深く関与しているほか<sup>41)-44)</sup>、インスリン、神経伝達物質、その他のホルモンのレセプターが存在するなど<sup>45)-48)</sup>独自の高度な代謝機能をもっている。この血管内皮細胞は正常ではわずかな pinocytotic vesicle を持つにすぎないが MS で BBB が破壊され血管透過性が高まって来ると非常に多くの pinocytotic vesicle が増えてくることが電顕で観察されている<sup>11)12)</sup>。さらに MS においては抗血管内皮細胞抗体が高いという報告がある<sup>49)</sup>。これらの知見は MS の発症機序において血管内皮細胞膜がなんらかの免疫学的機序を介して関与していることを示唆するものである。

今回の我々の検索により従来不明であった脊髄中に含まれる慢性の広範な脱髓を伴う CREAE を惹起する因子が脊髄血管内皮細胞膜成分中に含まれる可能性が明らかになった。また脊髄毛細血管成分感作群で脊

髄により病変が強かったことはなぜ日本の MS が欧米の MS に比べ脊髄の症状が強いのかという問題を解決する手掛かりになる可能性も有り興味深い知見である。しかし脊髄血管内皮細胞中のどんな物質が脱髄起炎性を持つのかはまだ明らかではない。現在 MS の病因、再発の引き金となる因子は不明であり治療も症状増悪時に副腎皮質ホルモン投与するのみにとどまっている。今後 MS の病因を解明する上で脊髄血管内皮細胞の感作による動物実験モデルの生化学的および免疫学的な解析が重要であると考えられる。

## V 結 語

ラット脊髄より毛細血管成分および血管内皮細胞膜成分を特異的に調製した。両者ともプロテオリビド、ミエリン塩基性蛋白などのミエリン成分は含まれていなかった。

毛細血管成分および血管内皮細胞膜成分をモルモットに感作することにより新たな慢性自己免疫性脱髄疾患モデルを作成しえた。この動物実験モデルは臨床所見、組織所見ともにヒトの脱髄疾患である MS に類似

していた。血中の抗血管内皮細胞抗体価および circulating immune complex 値は高値を示した。

病変部位の主体は毛細血管成分感作群では脊髄、血管内皮細胞膜成分感作群は脳幹部であった。

血管内皮細胞膜成分感作群は毛細血管成分感作群に比べ発症率が高くまた慢性化する頻度も高かった。

CREAE を誘導する脱髄起炎因子が脊髄血管内皮細胞膜成分中に存在すると考えられた。

今後 MS の病因を究明する上で本実験モデルの研究は重要であると考えられる。

## VI 謝 辞

御指導、御校閲いただきました信州大学柳沢信夫教授に深謝します。また研究に助言、協力して頂いた当教室塚田直敬講師、高昌星博士に深謝します。本研究に貴重な助言を頂き抗原の分析に協力して頂いた本学脂質生化学武富保教授、岡野照先生に深謝します。

本研究の要旨は第36回日本アレルギー学会総会(1986年10月、岐阜)および第28回日本神経学会(1987年5月)にて発表した。

## 文 献

- 1) Field, E. J. and Raine, C. S. : Experimental allergic encephalomyelitis. An electron-microscopic study. *Am J Pathol*, 49 : 537-553, 1966
- 2) Poser, C. M. and Behan, P. O. : Late onset of Guillain-Barré syndrome. *J Neuroimmunol*, 3 : 27-41, 1982
- 3) Stone, S. H. and Lerner, E. M. : Chronic disseminated allergic encephalomyelitis in guinea pigs. *Ann NY Acad Sci*, 122 : 227-241, 1965
- 4) Snyder, D. H., Valsamis, M. P., Stone, S. H. and Raine, C. S. : Progressive demyelination and reparative phenomena in chronic experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuropathol Exp Neurol*, 34 : 209-221, 1975
- 5) Raine, C. S., Snyder, D. H., Valsamis, M. P. and Stone, S. H. : Chronic experimental allergic encephalomyelitis in inbred guinea pigs. An ultrastructural study. *Lab Invest*, 31 : 369-380, 1974
- 6) Wiśniewski, H. M. and Keith, A. B. : Chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis : An experimental model of multiple sclerosis. *Ann Neurol*, 1 : 144-148, 1977
- 7) Raine, C. S. and Stone, S. H. : Animal model for multiple sclerosis. Chronic experimental allergic encephalomyelitis in inbred guinea pigs. *NY State J Med*, 77 : 1693-1696, 1977
- 8) Keith, A. B. : Sex difference in Lewis rats in the incidence of recurrent experimental allergic encephalomyelitis. *Nature*, 272 : 824-825, 1978
- 9) Lassmann, H. and Wiśniewski, H. M. : Chronic relapsing EAE. Time course of neurological symptoms and pathology. *Acta Neuropathol (Berl)*, 43 : 35-42, 1978
- 10) Lassmann, H. and Wiśniewski, H. M. : Chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis. Clinicopathological comparison with multiple sclerosis. *Arch Neurol*, 36 : 490-497, 1979
- 11) Broman, T. : Blood-brain barrier damage in multiple sclerosis. Supravital test-observations.

Acta Neurol Scand [Suppl 10], 40 : 21-24, 1964

- 12) Brown, W. J. : The capillaries in acute and subacute multiple sclerosis plaque : A morphometric analysis. *Neurology*, 28 : 84-92, 1978
- 13) Raichle, M.E., Eichling, J.O., Straatmann, M.G., Welch, M.J., Larson, K.B. and Ter-Pogossian, M.M. : Blood-brain barrier permeability of  $^{14}\text{C}$ -labeled alcohols and  $^{18}\text{O}$ -labeled water. *Am J Physiol*, 230 : 543-552, 1976
- 14) Raichle, M.E., Hartman B.K., Eichling, J.O. and Sharpe, L.G. : Central noradrenergic regulation of cerebral blood flow and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci USA*, 72 : 3726-3730, 1975
- 15) Djuričić, B.M., Rogač, L.J., Spatz, M., Rakić, L.J. M. and Mršulja, B.B. : Brain microvessels. I. Enzymic activities. *Adv Neurol*, 20 : 197-205, 1978
- 16) Goldstein, G.W. : Cerebral edema : Role of fatty acid metabolism of brain capillaries. *N Engl J Med*, 296 : 632-633, 1977
- 17) Lampert, P. : Electron microscopic studies on ordinary and hyperacute experimental allergic encephalomyelitis. *Acta Neuropathol (Berl)*, 9 : 99-126, 1967
- 18) Leibowitz, S. : Cerebral vascular permeability in experimental allergic encephalomyelitis. *Neuropathol Pol*, 7 : 303-309, 1969
- 19) Vulpe, M., Hawkins, A. and Rozdilsky, B. : Permeability of cerebral blood vessels in experimental allergic encephalomyelitis studied by radioactive iodinated bovine albumin. *Neurology (Minneapolis)*, 10 : 171-197, 1960
- 20) Paterson, P.Y., Gausas, J., Koh, C-S. and Kwaan, H.C. : The clotting system : Gatekeeper of cerebrovascular permeability and monitor of clinical manifestations of neuroautoimmune disease. *Trans Am Clin Climatol Assoc*, 97 : 149-157, 1985
- 21) Paterson, P.Y., Koh, C-S. and Kwaan, H.C. : Role of the clotting system in the pathogenesis of neuroimmunologic disease. *Fed Proc*, 46 : 91-96, 1987
- 22) Tsukada, N., Ahmed, S.A., Behan, W.M.H. and Behan, P.O. : Similarities between the Forssman carotid syndrome and experimental allergic encephalomyelitis. *Acta Neuropathol (Berl)*, 69 : 234-243, 1986
- 23) Tsukada, N., Koh, C-S., Yanagisawa, N., Okano, A., Behan, W.M.H. and Behan, P.O. : A new model for multiple sclerosis : Chronic experimental allergic encephalomyelitis induced by immunization with cerebral endothelial cell membrane. *Acta Neuropathol (Berl)*, 73 : 259-266, 1987
- 24) Mršulja, B.B., Mršulja, B.J., Fujimoto, T., Klatzo, I. and Spatz, M. : Isolation of brain capillaries : a simplified technique. *Brain Res*, 110 : 361-365, 1976
- 25) Spatz, M., Bembry, J., Dodson, R.F., Hervonen, H. and Murray, M.R. : Endothelial cell cultures derived from isolated cerebral microvessels. *Brain Res*, 191 : 577-582, 1980
- 26) Drewes, L.D. and Lidinsky, W.A. : Studies of cerebral capillary endothelial membrane. *Adv Exp Med Biol*, 131 : 17-27, 1981
- 27) Lidinsky, W.A. and Drewes, L.R. : Characterization of the blood-brain barrier : Protein composition of the capillary endothelial cell membrane. *J Neurochem*, 41 : 1341-1348, 1983
- 28) Laemmli, U.K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature*, 227 : 680-685, 1970
- 29) Debault, L.E. and Cancilla, P.A. :  $\gamma$ -Glutamyl transpeptidase in isolated brain endothelial cells : induction by glial cells *in vitro*. *Science*, 207 : 653-655, 1980
- 30) Orłowski, M., Sessa, G. and Green, J.P. :  $\gamma$ -Glutamyl transpeptidase in brain capillaries : possible site of a blood-brain barrier for amino acids. *Science*, 184 : 66-68, 1974
- 31) Cunningham-Rundles, C., Bandler, W.E., Zacharczuk, T., Good, R.A. and Day, N. : Quantitation of circulating immune complexes in serum by Raji cells using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Exp Immunol*, 40 : 411-415, 1980

- 32) Theophilopoulos, A.N., Wilson, C.B. and Dixon, F.J. : The Raji cell radioimmune assay for detecting immune complexes in human sera. *J Clin Invest*, 57 : 169-182, 1976
- 33) Paterson, P.Y. : Autoimmune neurological disease. Experimental animal systems and implications for multiple sclerosis. In : Talal, N. (ed.), *Autoimmunity, genetic, immunologic, virologic and clinical aspects*, pp.633-692, Academic Press, New York, 1977
- 34) Keith, A.B. and McDermott, J.R. : Optimum conditions for inducing chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis in guinea pigs. *J Neurol Sci*, 46 : 353-364, 1980
- 35) Traugott, U., Stone, S.H. and Raine, C.S. : Chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. Treatment with combinations of myelin components promotes clinical and structural recovery. *J Neurol Sci*, 56 : 65-73, 1982
- 36) Madrid, R.E., Wiśniewski, H.M., Iqbal, K., Pullarkat, R.K. and Lassmann, H. : Relapsing experimental allergic encephalomyelitis induced with isolated myelin and with myelin basic protein plus myelin lipids. *J Neurol Sci*, 50 : 399-411, 1981
- 37) Williams, R.M., Lees, M.B., Cambi, F. and Macklin, W.B. : Chronic experimental allergic encephalomyelitis induced in rabbits with bovine white matter proteolipid apoprotein. *J Neuropathol Exp Neurol*, 41 : 508-521, 1982
- 38) Cambi, F., Lees, M.B., Williams, R.M. and Macklin, W.B. : Chronic experimental allergic encephalomyelitis produced by bovine proteolipid apoprotein : Immunological studies in rabbits. *Ann Neurol*, 13 : 303-308, 1983
- 39) Sobel, R.A., Veen, R.C. and Lees, M.B. : The immunopathology of chronic experimental allergic encephalomyelitis induced in rabbits with bovine proteolipid protein. *J Immunol*, 136 : 157-163, 1986
- 40) Tsukada, N., Inoue, A., Yanagisawa, N., Behan, W.M.H. and Behan, P.O. : Anti-endothelial cell antibody and immune complexes in the sera of animals with acute experimental allergic encephalomyelitis and chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*, 12 : 89-97, 1986
- 41) Betz, A.L., Gilboe, D.D. and Drewes, L.R. : The characteristics of glucose transport across the blood brain barrier and its relation to cerebral glucose metabolism. In : Levi, G., Battistin, L. and Lajtha, A. (eds.), *Advances in experimental medicine and biology*, Vol. 69, pp.133-149, Plenum Press, New York, 1976
- 42) Pardridge, W.M. and Oldendorf, W.H. : Transport of metabolic substrates through the blood-brain barrier. *J Neurochem*, 28 : 5-12, 1977
- 43) Drewes, L.R. and Gilboe, D.D. : Nutrient transport systems in dog brain. *Fed Proc*, 36 : 166-170, 1977
- 44) Bradbury, M. : The concept of a blood brain barrier. pp.60-83, 137-184, John Wiley and Sons, Chichester, 1979
- 45) Peroutka, S.J., Moskowitz, M.A., Reinhard, J.F. and Snyder, S.H. : Neurotransmitter receptor binding in bovine cerebral microvessels. *Science*, 208 : 610-612, 1980
- 46) Frank, H.J.L. and Pardridge, W.M. : A direct *in vitro* demonstration of insulin binding to isolated brain microvessels. *Diabetes*, 30 : 757-761, 1981
- 47) Pillion, D.J., Haskell, J.F. and Meezan, E. : Cerebral cortical microvessels : an insulin-sensitive tissue. *Biochem Biophys Res Commun*, 104 : 686-692, 1982
- 48) Zeleznikar, R.J. Jr., Quist, E.E. and Drewes, L.R. : An  $\alpha_1$ -adrenergic receptor-mediated phosphatidylinositol effect in canine cerebral microvessels. *Mol Pharmacol*, 24 : 163-167, 1983
- 49) Tanaka, Y., Tsukada, N., Koh, C-S. and Yanagisawa, N. : Anti-endothelial cell antibodies and circulating immune complexes in the sera of patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 17 : 49-59, 1987

(62. 12. 3 受稿)