

maximum clinical score は control 群より有意に改善していた。一方、発症するまでの日数においては、50mg/kg 投与群は control 群と差がなく、100mg/kg 投与群は control 群より有意に発症が遅くなった。このことから、以後の実験は、一日あたりの投与量をすべて 100mg/kg とした。

troglitazone の臨床上の効果を検証するため、病理学的を検討をおこなった。MOG 投与 25-30 日目に、下位腰髄を取り出し、H&E 染色を行い、炎症部位を比較検討した。その結果、troglitazone 投与群で著明に炎症が抑制されていた。

次に、troglitazone の効果の機序を検討するため、まず、T cell proliferation を control 及び troglitazone 投与群で行った。troglitazone 投与群と control 群で、それぞれ、MOG 投与 10 日目のマウスの所属リンパ節から T 細胞を取り出し、in vitro において MOG を再刺激し、増殖能をみた。その結果、T 細胞の増殖能には差は認められなかった。また、この実験の際の培養上清液を ELISA にて IFN- γ と IL-4 を調べたが、IFN- γ の濃度は troglitazone 投与群と control 群で差はなく、IL-4 は両者とも検出感度以下であった。

次に、troglitazone の治療効果の機序に関して、最近 PPAR- γ の抗炎症作用として注目されている、マクロファージにおける各種サイトカインなどの発現抑制効果について検討するため、初回の MOG 投与から 25 日前後に、全脊髄を取り出し、RT-PCR を行った。その結果、IL-1 β や TNF- α の発現は troglitazone 投与群で抑制されていた。以上の結果を EF-1 との比較により、半定量的に評価したところ、proinflammatory cytokine、特に TNF- α の発現が有意に troglitazone 投与群で抑制されていた。一方、troglitazone で発現が抑制されるといわれている iNOS は troglitazone 投与群と control 群で差はなかった。

「考察」

核内レセプターの一つである PPAR- γ の特異的リガンド、troglitazone は MS の動物実験モデルである EAE において、proinflammatory cytokine の発現を抑制することにより、EAE 抑制効果を示すことが考えられた。これらのことから、PPAR- γ アゴニストの MS 治療への応用が推奨される。しかし、troglitazone は糖尿病治療薬として、臨床的に使用されたものの、重篤な肝障害を惹起することがあるとの理由で使用中止となったため、臨床応用という点から現時点では困難である。しかし、PPAR- γ の ligand はこれまでいくつか開発されてきており、今後、より副作用が少なく、抗炎症作用が強い薬剤が開発されれば、多発性硬化症への臨床応用の可能性が出てくるものと思われる。

「結論」

PPAR- γ の特異的リガンド、troglitazone は EAE 抑制効果を示し、PPAR- γ の ligand 今後の臨床応用が期待される。

演題： アミノ酸代謝阻害剤による実験的自己免疫性脳脊髄炎の抑制及びインターフェロンβのもつ役割

所属 氏名： 順天堂大学脳神経内科 横山 和正

研究目的

インターフェロン療法は多発性硬化症の再発予防の標準治療となりつつある。しかしその効果の発現は個人差がありまたその抑制機序も多種多様である。本研究では多発性硬化症におけるインターフェロン療法の効果の発現の解析をすべく実験的自己免疫性脳脊髄炎を利用し、必須アミノ酸代謝を介した生理的免疫寛容機構とインターフェロンβとの関連性を解明することをその目的とする。そのためまず本年はアミノ酸代謝阻害剤の実験的自己免疫性脳脊髄炎に対する影響を研究した。

研究方法

必須アミノ酸であるトリプトファンの酸化酵素であるindoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)は、インターフェロンγにより誘導され、インターロイキン4、10、そしてTGF-βにより抑制されることが報告されている。この酵素はトリプトファンを分解することで局所における病原菌の繁殖を抑制すること、また胎盤に於いてもマウスの仔の母体からの拒絶を抑制するなど免疫寛容に重要な役割を持っていることが明らかとなった(Munn et al, Science 1998, 281:1991)。そこでIDO代謝阻害剤の抗原特異的T細胞に対する影響、実験的自己免疫性脳脊髄炎に対する影響をin vitro, in vivoに於いて検討した。

研究の結果

1) in vitroにおける脳炎惹起細胞に対するトリプトファン、IDO代謝阻害剤の作用。
MBP Ac1-11 TGマウスのT細胞は脳炎惹起性でありin vitroでは免疫を行わなくてもMBP Ac1-11 peptideをリンパ球に加えたproliferation assayで濃度依存的に著明な細胞増殖を認める。この系に、IDO代謝阻害剤を異なる濃度で加えたが、高濃度以外では明かな細胞増殖の抑制は認めなかった。またトリプトファンを除去した培養液中では細胞増殖は認めず細胞死に落ち込んだ。

2) 次にin vivoにおけるトリプトファン、IDO代謝阻害剤の作用について検討した。SWRマウスはMBP peptide 83-99をコンプリートフロイントアジュバントとともにマウスの足底に免疫し百日咳毒素を注射することで80-100%のマウスに於いて実験的自己免疫性脳脊髄炎を再現することができる。そこでこの系を使ってトリプトファンを毎日腹腔内注射する群、IDO代謝阻害剤もしくはplacebo controlを含有した徐放剤を免疫前から皮下に埋め込んだ群（導入期群）、と免疫後7日後に埋め込んだ群（効果期群）とをdouble blindで症状を解析した。

トリプトファン投与群では明らかな臨床スコアの変化は認められなかった。IDO代謝阻害剤埋め込み群では導入期群のみに有意な脳炎抑制効果を認めた。効果期投与群ではプラセボ群との差は認めなかった。上記実験マウスの脳及び脊髄の細胞浸潤の度合いを組織学的に検討した。細胞浸潤はIDO代謝阻害剤導入期投与群で有意に減少していた。以上のことよりIDO代謝阻害剤は導入期において脳脊髄炎抑制効果を持ち病的にも脳への細胞浸潤を抑制していることが判明した。

考察

生理的免疫寛容に重要なトリプトファンの分解酵素であるIDOの阻害により実験的自己免疫性脳脊髄炎を抑制できることが明らかとなった。IDOの阻害がなぜ実験的自己免疫性脳脊髄炎を抑制するかについての過程は依然不明のままであり引き続き研究を必要とする。in vitroの実験でIDO代謝阻害剤は低濃度では細胞増殖には影響を与えないことからIDO代謝阻害剤の抑制効果は近年注目を集めているregulatory T細胞の誘導を介した可能性、さらにはインターフェロンβの誘導を介している可能性も考えられる。

結論

生体内で利用されている免疫寛容のメカニズムが自己免疫疾患においてそのまま利用されている訳ではないことが明らかとなった。

演題

新規 NKT 細胞糖脂質リガンドによる実験的自己免疫性脳脊髄炎の抑制

所属 氏名

国立精神・神経センター神経研究所 免疫研究部

三宅 幸子

目的

NKT 細胞による自己免疫疾患調節機構を解明し、NKT 細胞リガンドによる新規治療法の確立を目的とする。

方法

C57BL/6J (B6) マウスに MOG35-55 ペプチドを免疫し、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を誘導した。NKT 細胞のプロトタイプリガンドである α ガラクトシルセラミド (α -GC) の誘導体を合成し、EAE の予防効果を検討した。EAE の臨床症状の観察、EAE 病変の病理学的検索、合成誘導体投与個体の血清中の IFN γ 、IL-4 などのサイトカイン、血清中の抗 MOG 抗体のアイソタイプを測定した。また合成誘導体により *in vitro* で誘導される脾細胞増殖反応、サイトカイン産生能を検討した。

結果

α -GC の誘導体の中から、EAE を抑制する誘導体(OCH)を得た。OCH は、経腹腔投与、経口投与のいずれでも B6 マウスの EAE に対して抑制効果を示したが、NKT ノックアウトマウスでは EAE の抑制効果がみられず、NKT 細胞を介する EAE 抑制が示唆された。OCH 投与群では病変への浸潤細胞の減少を認め、血清中の抗 MOG 抗体 IgG1/IgG2a 比は上昇していた (Th2 偏倚)。未処置 B6 マウスに OCH 投与後、経時的に血清中のサイトカインを測定し、ピーク時の IL-4 / IFN 比がコントロール群、 α -GC 投与群に比較して上昇していることを見出した。In vitro においても、OCH を添加した脾細胞培養上清中の IL-4 / IFN 比は、対照に比べて上昇していた。抗 IL-4 抗体を OCH と同時投与すると EAE の抑制効果が消失した。以上の結果より OCH が NKT 細胞の IL-4 産生を介して Th2 偏倚および EAE 抑制をもたらすことが示唆された。

考察

NKT 細胞に IL-4 を優位に産生させ、Th2 優位の反応を誘導できる α -GC 誘導体の投与により、EAE を抑制できることがわかった。本研究班では、Type I IFN が NKT 細胞や NK 細胞といった免疫制御細胞に与える影響を検討し、多発性硬化症の治療効果のメカニズムを検討する予定である。

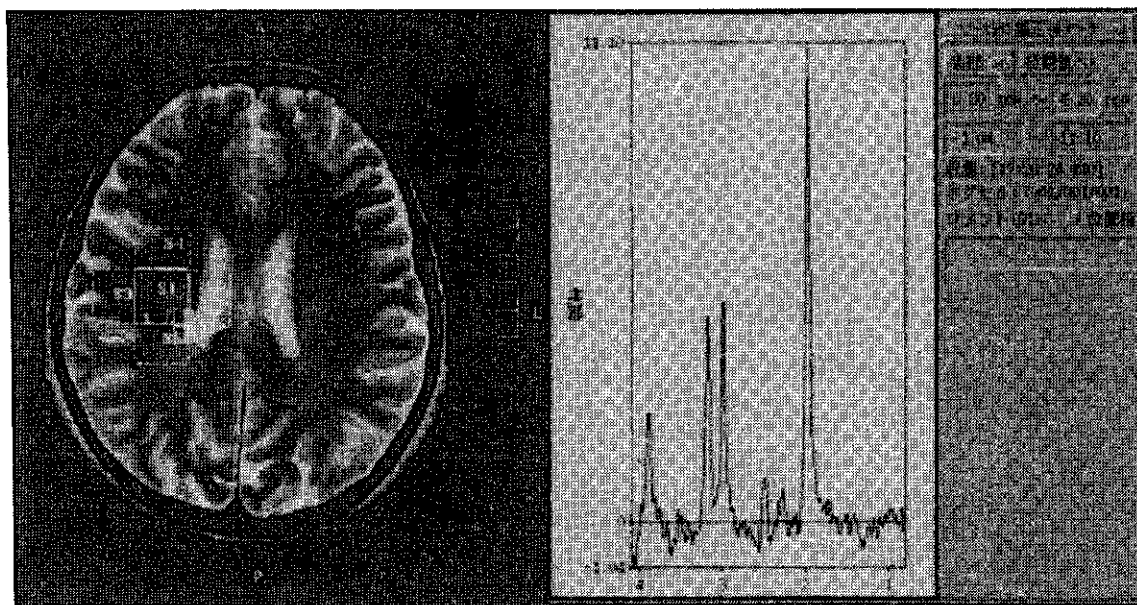
演題 : 多発性硬化症に対する MR spectroscopy の検討

所属・氏名 : 朴千仙^{1,2}、太田宏平^{1,3}、清水優子¹、大原久仁子¹、小野由子²、岩田誠¹

- 1 東京女子医科大学脳神経センター神経内科、2 同神経放射線科
- 3 東京理科大学理学部

【目的】多発性硬化症 (MS) に対し磁気共鳴スペクトロスコピー (MRS) を施行し、臨床応用の有用性を明らかにする。【方法】対象は MS 患者 25 例 (男性 17 例、女性 8 例、平均年齢 37.5 歳)。インターフェロン β 1-a 投与症例が 2 例、インターフェロン β 1-b 投与例が 9 例 (うち 3 例は投与中止)。Poser の診断基準に従い、確実例を対象とした。対照群は、健常者 7 例 (平均年齢 33 歳)。MRS 撮像シーケンス : PRESS 法、TR/TE=2000/136、水抑制パルス CHESSE 法、 $2 \times 2 \times 2 \text{cm}^3$ の single voxel 法で任意の白質を関心領域として設定し、N-acetylaspartate (NAA)、Creatinine (Cr)、Choline (Cho) の各ピークを検出し、得られた NAA/Cr、NAA/Cho、Cho/Cr 比と疾患の病勢、臨床経過との関連を検討した。

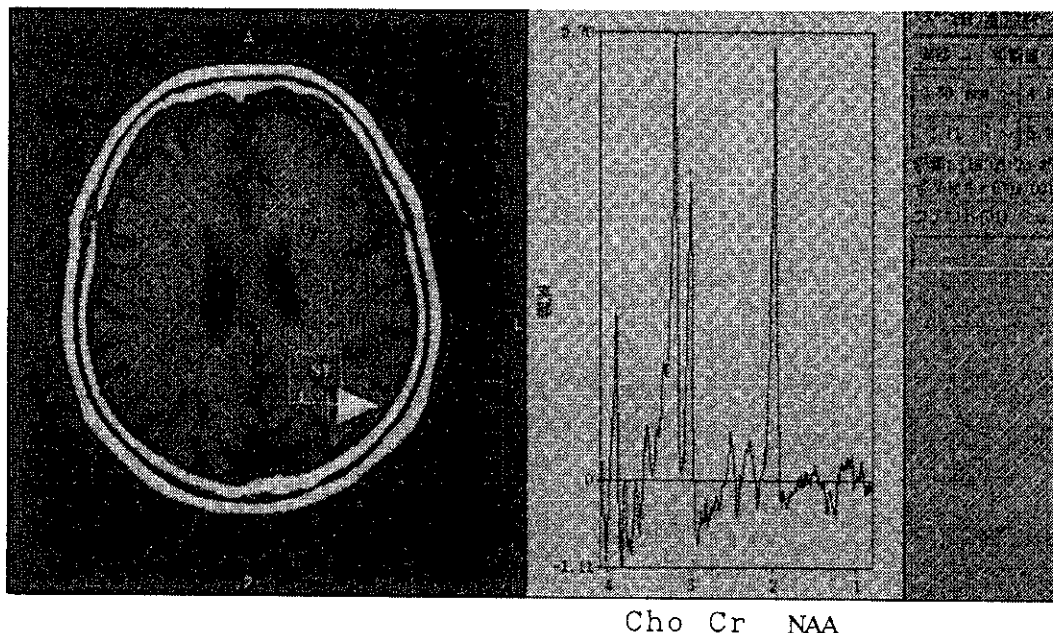
【結果】健常対象者 (26 歳、女性) の測定例を下に示す。



Cho Cr NAA

健常対照群で得られたスペクトルの平均値は、NAA/Cho 2.044、NAA/Cr 2.280、Cho/Cr 1.155 であった。

MS 例 (65 歳、女性) を下に示す。



MS 群では NAA/Cho 1.868、NAA/Cr 2.005、Cho/Cr 1.129 であり、対照群に比べ、NAA/Cho、NAA/Cr の低下が認められた。MS 群で、MRI の T2 強調画像で高信号領域を示す領域では、NAA/Cho 1.868、NAA/Cr 2.005、Cho/Cr 1.129 であり、従来の MRI で正常と考えられる白質領域でも NAA/Cho 1.869、NAA/Cr 2.099 と、ともに低下していた。T1 強調画像で低信号を示す領域では NAA/Cho 1.206、NAA/Cr 1.245 といずれも著明な低下を認めた。再燃と治療後の経過を観察しえた症例では、再燃時に比べステロイドパルスによる治療後に、臨床症状の改善とともに Cho/Cr の低下を認め、インターフェロンβ1-b 治療後、NAA/Cr の上昇を認めた。しかし、インターフェロンβ1-a 投与例では、一定の傾向は見られなかった。また、罹病期間、重症度との検討では、NAA/Cho、NAA/Cr 比に一定の傾向は認めなかった。

【考察】近年、多発性硬化症の MRS の有用性について検討した報告が見られている²³⁾⁴⁾。これまでの研究では、急性期病巣で Cho/Cr が上昇することや、慢性期病巣では NAA/Cr が低下することなどが報告されている。今回の検討でも同様の結果が得られ、特に慢性期病巣を反映する、T1 強調画像での低信号領域において著明な NAA/Cr の低下を認め、軸索の脱落が示唆された。再発例では、ステロイドパルス治療後、臨床症状の改善とともに、Cho/Cr の低下を認め、また、インターフェロンβ1-b 投与例では、NAA/Cr の上昇があり、病勢や病態との関連性が示唆された。従来の MRI 撮像法では、急性期炎症病変や周囲の浮腫に加え、修復機転後の硬化巣も T2 強調画像で高信号を示すため、疾患特異性はなく、T2 強調画像での全病巣面積と重症度や活動性との相関はないといわれている。さらに活動期病巣であっても、必ずしもガドリニウム造影剤による増強効果を伴わず、正確な疾患活動性の判定は困難であった。今回の検討では MS の経過や治療による介入で各パラメータの変化を認め、MRS は MS において、病勢を反映しうる有用な検査となりうることが示唆された。また、正常白質と考えられる白質においても、NAA の低下を認めたことは、MS の病態に何らかの関連があると考えられた。

【結語】多発性硬化症における MR スペクトロスコピーについて検討した。多発性硬化症において、有用な診断法となりうる可能性が示唆された。

【参考文献】

- 1) Marco Ravaris and Massimo Filippi. The value of new magnetic resonance techniques in multiple sclerosis. *Current Opinion in Neurology* 2000; 13: 249-254
- 2) D L Arnold, J S Wolinsky, P M Matthews, A Falini. The use of magnetic resonance spectroscopy in the evaluation of the natural history of multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998 ; 94(supple 1): S94-S101
- 3) C. A. Davie, C. P. Hawkins, G. J. Barker, A. Brennan, P. A. Tofts, D. H. Miller and W. I. Macdonald. Serial proton magnetic resonance spectroscopy in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 1994; 117: 49-58
- 4) Andreas Bitch, Wolfgang Bruck et al. Inflammatory CNS demyelination: Histopathologic correlation with In vivo quantitative proton MR spectroscopy. *AJNR* 1999; 20: 1619-1627
- 5) Nicola De Stefano, D L Arnold, et al. Axonal damage correlations with disability in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. Results of a longitudinal magnetic resonance spectroscopy study. *Brain* 1998; 121: 1469-1477
- 6) Pannada A. Narayana et al. Serial proton magnetic resonance spectroscopic Imaging, contrast-enhanced magnetic resonance imaging, and quantitative lesion volumetry in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1998; 43:56-71
- 7) Nicola De Stefano et al. In vivo evidence for axonal dysfunction remote from focal cerebral demyelination of the type seen in multiple sclerosis. *Brain* 1999; 122: 1933-1939

多発性硬化症における自己抗体の解析

班員 神田 隆

共同研究者 山脇正永、水澤英洋

東京医科歯科大学大学院脳神経機能病態学

背景・目的

多発性硬化症は細胞性自己免疫反応を主とするが、中枢神経系におけるミエリン破壊・自己免疫反応の遷延には自己抗体も関与していることが報告されている。また、結節性多発動脈炎・SLE・川崎病等で認められる抗血管内皮細胞抗体も多発性硬化症で見られることも報告されている。今回我々はインターフェロン等の多発性硬化症治療においてターゲットとなりうるミエリンと血液脳関門に対する血中自己抗体を解析した。

方法

4名の患者において症状・髄液所見の経過と共に血清を4～9回採取し、ELISA法・TLC-immunoblot法にて抗糖脂質抗体を、Western-blot法にて抗ミエリン抗体を解析した。抗血管内皮細胞抗体についてはウシ脳微小血管内皮細胞を抗原とするWestern-blot法・cellular ELISA法を用いた。

結果

抗糖脂質抗体の解析ではGalCer, GM1, sulfatide, sulfoglucuronosyl paragloboside (SGPG)に対する自己抗体活性を認め、臨床症状の推移に対応していた。抗血管内皮細胞抗体の解析では4例中3例で経過中にIL-1betaで刺激されたウシ脳微小血管内皮細胞に対するIgGクラスのアECA活性を認めた。

考察

多発性硬化症患者においてその増悪期に種々の自己抗体を認めた。抗糖脂質抗体をはじめとする自己抗体はミエリンの破壊・炎症の遷延化に関与すると考えられる。また、抗血管内皮細胞抗体については脳微小血管において炎症性サイトカイン・ケモカインをドライブすることも報告されており、炎症の悪循環を形成すると考えられる。I型インターフェロンは脳血管において保護的に作用する可能性も考えられた。

演題：

過去 6 年間における多発性硬化症患者の再発時期と花粉症の関係

所属・氏名： 国立精神・神経センター武蔵病院 神経内科

○山本敏之・村上泰生・鈴木 潤・大矢 寧・小川雅文・川井 充

国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部

山村 隆

目的： 過去 6 年間に多発性硬化症 (MS) 患者が再発した月を調査し、月別の再発率を集計する。また、毎年同じ時期に再発している集団の各種花粉に対する特異的 IgE を調べる。

方法： 研究期間は 1995 年から 2000 年で、当院外来を受診し診断のついた再発-寛解型の MS 患者のうち、関東地域 (東京、群馬、神奈川、栃木、茨城) 在住で、研究期間中に最低 2 回の再発があり、INF- β 、免疫グロブリン製剤の使用や妊娠歴のない 35 人を対象とした。ただし初発が研究期間中の患者は、発症以前は MS 患者とみなさず、脱落者は脱落するまでを対象とした。治療を要するような症状の悪化を再発とした。対象人数あたりの再発回数を再発率とし、月別に調査した。

また、ステロイド、免疫抑制剤を内服していない 7 人のスギ、ヒノキ、ハルガヤ、カモガヤ、オオアワガエリ、ブタクサ、ヨモギの特異的 IgE を測定した。

結果： 6 年間の総再発回数は 154 回だった。年別の再発回数は、1995 年 23 回、1996 年 20 回、1997 年 22 回、1998 年 27 回、1999 年 31 回、2000 年 31 回だった。月別では 3 月に最も再発が多く、19 人が 24 回再発した。

7 人の特異的 IgE を測定したところ、スギ花粉陽性者が 5 人でもっとも多く、ブタクサ・ヨモギの陽性者はいなかった。そのうち、3 月再発者は 5 人に検査し、スギ花粉陽性者は 4 人だった。

考察： MSの再発に季節による変動があることが示唆された。スギ花粉の飛散ピークがある3月にはMSの再発が多く、MS患者にスギ花粉に対する特異的IgE陽性者が多かったことから、スギ花粉に対するアレルギーがMSの再発に影響している可能性があった。しかし、8-9月に飛散ピークを持つブタクサ・ヨモギは陽性者がいなかった。

結論： 再発寛解型のMS患者において、再発の多い季節があり、スギ花粉に対するアレルギー反応が要因の一つである可能性が示唆された。

V. 平成 13 年度構成員名簿

構成員名簿

区 分	氏 名	所 属	職 名
主任研究者	山村 隆	国立精神・神経センター神経研究所 微細構造研究部・免疫研究部併任	部長
分担研究者	川井 充	国立精神・神経センター武蔵病院 神経内科	部長
	三宅幸子	国立精神・神経センター神経研究所 免疫研究部	室長
	菊地誠志	北海道大学大学院医学研究科脳科学 専攻神経病態学講座神経内科学	助手
	横山和正	順天堂大学脳神経内科	助手
	野村恭一 太田宏平 神田 隆	埼玉医科大学神経内科 東京理科大学理学部 東京医科歯科大学大学院脳神経機能 病態学	助教授 教授 助教授
研究協力者	古池史子	国立精神・神経センター神経研究所 免疫研究部	研究員
	深澤俊行	北祐会神経内科病院	副院長
	大橋高志	公立昭和病院神経内科	医長
事務局 経理事務連絡 担当責任者	山村 隆	国立精神・神経センター神経研究所 免疫研究部併任 〒187-8502 東京都小平市小川東町 4-1-1 TEL: 042-341-2711(内線 5242) FAX: 042-346-1753	部長