

よび CD3⁻ non-T 細胞分画を分離、各々より total RNA を抽出・増幅し、蛍光色素 Cy5 でラベルした。また健常者 3 名の CD3⁺ T 細胞分画および CD3⁻ non-T 細胞分画より同様に RNA を抽出・増幅して、蛍光色素 Cy3 でラベルして universal reference として用いた。1,263 cDNA microarray (Hitachi Life Science)を同量の Cy3, Cy5 ラベル cDNA で競合的ハイブリダイゼーションを行い、シグナルを ScanArray 5000 scanner (GSI Lumonics)で検出し、データを QuantArray software (GSI Lumonics)で定量的に解析した。Gene expression level (GEL) = the signal intensity of the MS sample/the signal intensity of universal reference と Gene regulation index (GRI) = GEL at 3 mo or at 6 mo/GEL at Pre を算出し、Cyber-T (regularized t) test で有意な変動を示した遺伝子群を同定した。

C. 研究結果

IFN β 投与後の T 細胞で 13 遺伝子が発現変動：上昇 \uparrow (IRF7, ISG15, IFI56, IFI6-16, IFI60, IFI30, ATF3, TLR5)および低下 \downarrow (IL-3, MIG, SLC7A1, AKAP4, GNA13)を示し、non-T 細胞で 13 遺伝子が発現変動 \uparrow (IRF7, ISG15, IFI56, IFI6-16, IFI27, IFI17, TAP1, TNFAIP6, TSC22, SULT1C1, RPC39, RAB11A), \downarrow (IL-3)を示した(表 1, 図 1)。ISG15, IFI56, IFI6-16, IFI27, TSC22, SULT1C1 は 3-6 ヶ月持続的な上昇を認めた。Th2 cytokine である IL-4, IL-10 は T 細胞で発現低下傾向を示し、Th1-related chemokine

receptor CCR5 は T, non-T 細胞で発現上昇傾向を認めたが、おのおの統計学的有意差は得られなかった。

D. 考察

MS 患者の末梢血リンパ球における IFN β -responsive genes (IRG; IFN β -stimulated and -repressed genes)を同定した。9 遺伝子 (IRF7, ISG15, IFI56, IFI6-16, IFI60, IFI17, TAP1, TNFAIP6, MIG) は IFN-responsive promoter elements (IFN-stimulated response element 5'A/GNGAAANNGAAACT3'; ISRE or IFN regulatory factor-element 5'G[A]AAAG/CT/CGAAAG/CT/C3'; IRF-E) の同定されている既知の IRG ある。また 5 遺伝子 (IFI30, IFI27, TSC22, ATF3, SLC7A1) では ISRE, IRF-E は同定されていないが IFN 応答性が報告されている。これらの遺伝子群は IFN β 治療に直接的に反応して変動し、治療効果発現に深く関与していると思われる。また IFN による発現誘導が報告されていない遺伝子群や promoter に ISRE, IRF-E を持たない遺伝子群 (TLR5, SULT1C1, RPC39, RAB11A, IL-3, AKAP4, GNA13)は関しては、IFN β により誘導された遺伝子を介して間接的に発現変動(上昇または低下)したものと推測される。一方 Th2 cytokine IL-4, IL-10 遺伝子は、治療開始後に T 細胞分画で発現レベルの低下傾向を認めた。この所見は IFN β 治療は MS においては必ずしも明確な Th2 shift を誘導しないことを示唆する。

本研究で新たに IFN β による TLR5, SULT1C1, RPC39, RAB11A, IL-3, AKAP4, GNA13 の発現制御が明らかになった。発現上昇を認めた遺伝子群のうち IFN-regulatory factor 7 (IRF7)はウイルス感染細胞における type I IFN 産生 positive feedback loop の key transcriptional factor である。IFN γ -inducible protein 30 (IFI30)は class II MHC 拘束性抗原提示に関与する lysosomal thiol reductase で、ATP-binding cassette transporter (TAP1)は class I MHC 拘束性抗原提示に関与する peptide transporter である。IFN-induced protein 17 (IFI17)は細胞増殖抑制能を呈する膜蛋白質で、TNF α -induced protein 6 (TNFAIP6) は proinflammatory cytokine で発現誘導されるが、serine protease を抑制し anti-inflammatory mediator として働く。発現低下を認めた遺伝子群のうち monokine induced by IFN γ (MIG)は CXC family chemokine で memory T 細胞に対し chemoattractant 活性を呈する。IL-3 は GFAP promoter-IL-3 transgenic mice において multifocal inflammatory demyelination の mediator として働く。Solute carrier family 7 member 1 (SLC7A1)は L-arginine transporter であり、ラット心筋細胞で NO 産生を促進する。つまり炎症増強に働く遺伝子群(IL-3, MIG, SLC7A1)の発現低下を認めたのは、IFN β の抗炎症性(antiinflammatory)作用に適合する。

E. 結論

IFN β は MS 患者において細胞特異的に antiviral, antiproliferative, anti-inflammatory, or antigen-presentation-modulating molecules の発現上昇と同時に、proinflammatory molecules の発現低下を誘導する。IRG は MS における IFN β 治療効果追跡の指標および IFN β responder, nonresponder を識別するマーカーとなる可能性があり、今後の研究を必要とする。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

a. 雑誌

1) 佐藤 準一, 山村 隆: 多発性硬化症におけるインターフェロンベータ療法の効果発現機序。

医療 2003 (印刷中)

2) Koike E, Satoh J-I, Miyake S, Yamamoto T, Kawai M, Kikuchi S, Nomura K, Yokoyama K, Ota K, Kanda T, Fukazawa T, Yamamura T. Microarray analysis identifies interferon β -regulated genes in multiple sclerosis. J Neuroimmunol 2003, submitted for publication.

2. 学会発表

a. 国際学会

1) Satoh J, Koike E, Fukazawa T, Kawai M, Yamamura T. Interferon- β -responsive genes in multiple sclerosis. 55th Annual Meeting of the American Academy of Neurology, Honolulu, Hawaii, April 2, 2003.

b. 国内学会

1)古池 史子、佐藤 準一、近藤 誉之、山村 隆：多発性硬化症患者末梢血 T, non-T 細胞で IFN β 治療後に発現変動を示す遺伝子群の解析. 第 32 回日本免疫学会総会学術集会、東京、2002 年 12 月 4 日

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

出願中(多発性硬化症に対するインターフェロン・ベータ薬物治療の有効性予測法)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

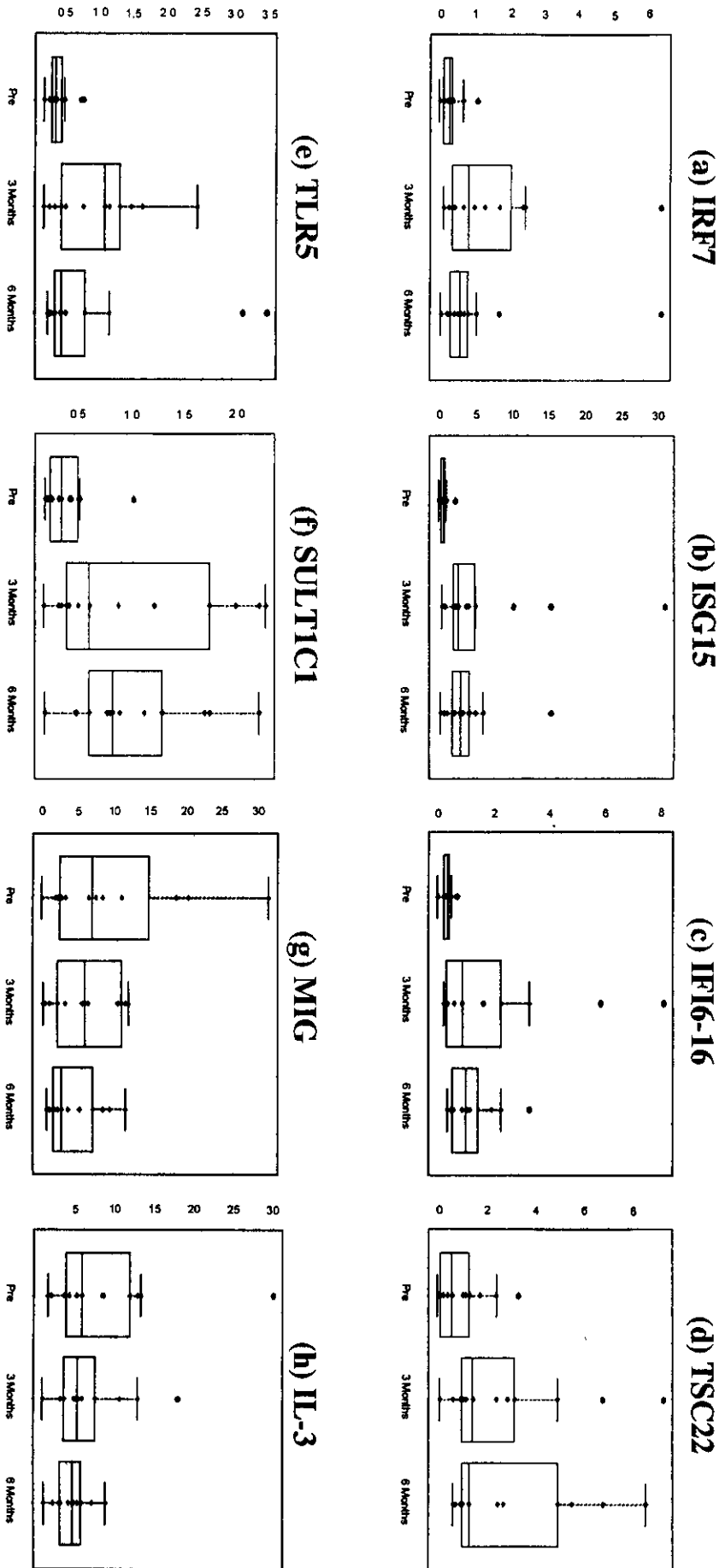
なし

表1. IFN-responsive genes in IFN β -treated MS patients

No	Genes	Genebank accession number	Up-regulation or down-regulation	Cell fraction	IFN-responsive promoter elements	Predominance of type of IFN for induction	Putative function
1	IRF7 (IFN regulatory factor 7A)	U53830	up	T & non-T	(+)	type I	transcription factor
2	ISG15 (IFN-induced 15-kDa protein)	M13755	up	T & non-T	(+)	type I > type II	secretory protein homologous to ubiquitin
3	IFI56 (IFN-induced 56-kDa protein)	X03557	up	T & non-T	(+)	type I, type II	unknown
4	IFI6-16 (IFN α -inducible cDNA 6-16)	X02492	up	T & non-T	(+)	type I	unknown
5	IFI60 (IFN-induced protein 60)	AF083470	up	T	(+)	type I	unknown
6	IFI30 (IFN γ -inducible protein 30)	J03909	up	T	ND	type I < type II	lysosomal thiol reductase involved in class II MHC-restricted antigen presentation
7	IFI27 (IFN α -inducible protein 27)	X67325	up	non-T	ND	type I	unknown
8	IFI17 (IFN-induced protein 17)	J04164	up	non-T	(+)	type I > type II	cell growth-inhibitory protein
9	TAP1 (ATP-binding cassette transporter)	X57522	up	non-T	(+)	type I, type II	peptide transporter involved in class I MHC-restricted antigen presentation
10	TNFAIP6 (TNF α -induced protein 6)	M31165	up	non-T	(+)	ND	anti-inflammatory protein homologous to CD44
11	TSC22 (TGF β -stimulated protein)	U35048	up	non-T	ND	type II	transcription factor
12	ATF3 (activating transcription factor 3)	L19871	up	T	ND	type II	transcription factor
13	TLR5 (toll-like receptor 5)	U88881	up	T	ND	ND	receptor for bacterial flagellin
14	SULT1C1 (sulfotransferase family 1C member 1)	U66036	up	non-T	ND	ND	sulfotransferase
15	RPC39 (39-kDa RNA polymerase III-specific subunit)	U93869	up	non-T	ND	ND	RNA polymerase III subunit
16	RAB11A (ras family member Rab11a)	AF000231	up	non-T	ND	ND	small GTP-binding protein
17	MIG (monokine induced by IFN γ)	X72755	down	T	(+)	type II	CXC family chemokine
18	SLC7A1 (solute carrier family 7 member 1)	NM_003045	down	T	ND	type II	cationic amino acid transporter
19	IL-3 (interleukin-3)	M17115	down	T & non-T	ND	ND	multi-colony stimulating factor
20	AKAP4 (protein kinase A-anchor protein 4)	NM_003886	down	T	ND	ND	testis-specific protein involved in sperm motility
21	GNA13 (guanine nucleotide-binding protein α 13)	L22075	down	T	ND	ND	G-protein α subunit involved in cell movement and angiogenesis

The manuscript is submitted for publication (Koike et al) ND: No description.

Figure 1. IFN-responsive genes



厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告

インターフェロン治療導入の臨床パスとバリエーション管理

川井充 ○山本敏之 藤原由貴* 横田真知子** 本橋円* 大野典子* 竹嶋光代**
中村治雅 村井麻衣子 菊池猛 尾方克久 小川雅文 山村隆***

国立精神・神経センター武蔵病院 神経内科

*同 薬剤部

**同 看護部

***国立精神・神経センター神経研究所

研究要旨 多発性硬化症患者(MS)のインターフェロン-β (INF-β)治療を導入するために、約 2 週間の臨床パス(CP)を作成し、有害事象、手技、患者の満足度を検討した。有害事象は発熱、白血球減少傾向が多かった。手技は多くが 2 週間で習得可能であった。CP に対する患者の満足度は高かった。INF-β 治療不能のバリエーションでは、手技の習得困難者で家族が注射し、導入可能な例があった。注射部位の痛み・硬結に対処できず、入院期間が延長した患者では課題が残った。

A. 研究目的

臨床パス(CP)は「医療チームが共同で作成した、患者の最良の管理だと信ずるところを示した仮説」と定義される。近年、チーム医療の推進、患者満足度の向上、医療の標準化の必要性から CP が普及し始めている。われわれは多発性硬化症(MS)のインターフェロン-β (INF-β)自己注射治療の導入の CP を作成し、その利点とバリエーション管理について検討した。

B. 研究対象と方法

対象:当院で Clinical definite MS と診断し、INF-β 導入目的に入院した MS 30 人(男性 11 人、女性 19 人)を対象とした。再発寛解型 MS 26 人、進行型 MS 4 人であった。平均年齢は 37.5 歳であった。全例 MRI で脳、脊髄のいずれかの部位に plaque を認めた。

方法:医師、看護師、薬剤師で構成されるチームにより CP を作成した(表 1)。INF-β は、シエリング社のインターフェロン-β-1b(遺伝子組

換え) (ベタフェロン[®])を使用した。プリックテスト後に初回 800 万 IU を皮下注射し、その後、同量を隔日で皮下注射した。注射実施時間は、患者の希望に合わせた。初回の皮下注射は医師、2-3 回目は看護師によって実施された。4 回目以降は自己注射した。入院期間内の自己注射手技の評価は評価表(表 2)によっておこなった。INF- β 自己注射治療が不能であったバリエーション、INF- β 治療を開始から終了までの入院期間が延長したバリエーションを検討した。INF- β 導入の入院に対する患者の満足度をアンケート評価した。

C. 研究結果

24 人が INF- β の自己注射可能で、6 人が自己注射不能(バリエーション)であった。バリエーションのうち 2 人は、家族が注射し導入可能であったため、INF- β 導入可能であったのは 26 人であった。INF- β 開始後の入院期間は 15 日間が多く、入院期間が 18 日間を超えたバリエーションは 2 人であった。

有害事象は、発熱がもっとも多く、26 人中 22 人に現われた。多くは初回の INF- β 皮下注射から 2-3 時間後に発熱が現れ、非ステロイド性消炎鎮痛剤(NSAID)であるイブプロフェン 100mg の頓服し、INF- β 注射 3 回目までに 5 人の発熱が消失し、注射 5 回目までにさらに 7 人の発熱が消失した。発熱のため退院時までイブプロフェンの内服が必要であったのは 7 人であった。発熱時に痙性対麻痺が増強した 2 人は、発熱時に全身のふるえが出現した 1 人は、いず

れも NSAID 内服で改善した。これまでに障害の既往がない部位に、解熱しても改善しない痙性麻痺が出現した 1 人は、MS の再発と考えた。関節痛や全身倦怠感など身体症状は 5 人に現れ、NSAID の頓服で改善した。頭痛が 8 人にあらわれ、NSAID で消失した。退院まで頭痛が続いたのは 2 人であった。皮膚の発赤・硬結は 6 人に現われ、多くは INF- β 注射 2 回目以降から出現した。そのうち 2 人が痛みを伴う皮膚の硬結を訴えたが、有効な対処療法はなかった。不眠は 3 人に現れ 2 人は退院後も入眠導入剤が必要であった。入院期間中に抑うつ症状の出現、咳や呼吸困難感などの間質性肺炎を疑わせる臨床症状はなかった。

血液検査では、開始後 1 週間に 22 人に白血球減少を認め、2 週後にさらに減少したのは 6 人であった。しかし、高度の白血球低下(2,000/mm³ 未満)はなく、高度の血小板低下(50,000/mm³ 未満)もなかった。重篤な肝機能障害、血糖の異常はなかった。

注射手技では、自己注射 1 回目から一連の手技が正確に実施できたのは 7 人であったが、医療従事者の 3 人であった。自己注射手技は平均 2 回目で習得し、遅くても 5 回目までであった。看護師による手技の評価では、「シリンジ内のエア抜きができていない」16 人、「注射液を必要量入れていない」7 人、「清潔動作が守られていない」3 人であった。自己評価では、入院期間内に「完全に手技を覚える事が出来た」と答えたのが 72%、「だいたい手技を覚える事が出来た」と答えたのが 28%であった。

入院の必要性に対し23人が「必要であった」と答え、満足度は20人が「入院して良かった」と答えた。その理由として、11人が「短期間の入院で済んだ」、16人が「副作用がでても入院していると安心だった」をあげた。

INF- β 開始後の期間が19日を超過したのは、再発治療した1人、注射部位の痛み・皮膚硬結が強かった1人であった。INF- β 治療の導入不能であったバリエーションは、手技の習得困難(痴呆、巧緻動作障害)4人、心理検査で抑うつが強い1人、プリックテスト陽性1人であった。

D. 考察

本研究は、INF- β 注射導入のCPを評価した。有害事象は、発熱とそれにともなう身体症状の増悪、頭痛が多く、7回目の注射までにNSAIDで多くはコントロール可能であった。また、高度の血球減少はないものの、INF- β 開始1週間後に白血球減少傾向が目立ち、2週間後には改善した。白血球の寿命が5日程度、血小板の寿命が10日程度であることから、1週間後に血球減少傾向があった患者は2週間後に再検査し、減少が進んでいないことを確認する必要があると考えた。また、注射手技の取得にも2週間の入院期間は必要であると考えた。

バリエーションは自己注射の手技が問題になることが多く、家族の協力がある場合はINF- β 治療が行えることがあった。しかし、注射部位の痛みや皮膚の硬結に関しては、対処治療しきれず、入院期間が延びた。

INF- β 治療は、(1)入院目的が明確である、

(2)治療内容が定式化できる、(2)アウトカム(手技の習得、有害事象の有無など)が明確である、(3)頻度が高いなどの条件を満たし、十分に検討されたCPを導入することで、(1)提供する医療内容の標準化、(2)入院期間の短縮と入院前に入院期間の予測が可能、(3)計画性のある医療の提供、(4)有害事象などに対する適切な対応、(5)患者への満足感と安心感の提供、(6)バリエーションに対する早期の対応が可能などのメリットがあると考えた。ただしCP導入のデメリットとして、(1)治療に対する独自性や選択幅が制限、(2)個々の患者、特にバリエーションの能力に対応しきれない可能性があった。

今後、有害事象をコントロールし、今回のCPで得られた患者の満足度を落とすことなく、入院期間を短縮する事が課題であると考えた。

E. 結論

INF- β 自己注射にCPのような標準化された治療法を導入することで、バリエーションの評価を容易にし、今後のMSのINF- β 治療に役立つと考えた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

	1日目	2日目	3～6日目	7日目	8～11日目	12～16日目
目標	INF-βに対する正しい理解	安全なINF-βの導入	手技の習得 各種薬物の理解	有害事象の確認	注射の実践 自己管理法の習得	日常生活への導入
患者	INF-βの説明 INF-βの同意	プリックテスト INF-β開始	看護師による 皮下注 手技の訓練	医師の評価	看護師の見守りによる自己注射の開始	退院日の決定
治療・診察(医師)	INF-βの説明と同意 診察 治療薬の処方	INF-β皮下注 有害事象のモニタリング開始	有害事象の確認	神経所見の変化を確認	治療薬を決定	退院日の決定 自己注射時刻を決定
検査	血液検査 胸部レントゲン 心電図 心理検査	プリックテスト		血液検査		血液検査
看護部	入院中の予定の説明	有害事象のモニタリング開始	ビデオ学習 手技の教育		手技の指導	注射手技の最終評価
薬剤部	ビデオ指導 持参薬の確認	有害事象の情報収集開始	注射の準備 指導 処方の説明		バイアルの保管と破棄法の指導	処方薬の確認 院外薬局へ INF購入依頼

表1 INF-βのクリニカルパス

<p>1.必要物品の準備</p> <ul style="list-style-type: none"> ①手洗い ②下敷きを利用した皮下注セットを準備する <p>2.溶解液の吸引</p> <ul style="list-style-type: none"> ①バイアルの清潔操作 ②注射器の取り扱い <ul style="list-style-type: none"> a) シリンジに1.2mlエアをいれ、液を吸う b) 液内に注射針の先端があることを確認する c) シリンジ内の余分なエアを抜く d) 正確に目盛りを読む <p>3.ベタフェロンの溶解</p> <ul style="list-style-type: none"> ①シリンジを傾け、バイアルの内側面に流すように入れる ②回転させ溶解する ③注射液を確認する(透明か混濁か) <p>4.製剤の吸引</p> <ul style="list-style-type: none"> ①正確に1ml吸う ②エアを抜く ③シリンジにキャップをし、滅菌状態にできる <p>5.皮下注射</p> <ul style="list-style-type: none"> ①注射部位・時間をダイアリーに記入する ②アルコール消毒する(内側から外側へ) ③注射器のキャップを外す ④皮膚をつまみ、直角に注入する ⑤優しく拭く ⑥シリンジを廃棄箱へ廃棄する

表2 注射手技の評価

「多発性硬化症に対するインターフェロン療法の効果の発現及びその持続性に関する要因などの解析に関する研究」に関する研究

分担研究者 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

研究要旨

多発性硬化症に対するインターフェロン療法の効果の発現及びその持続性に関する要因などの解析に関する研究を行うにあたって、本研究班では DNA マイクロアレイによる解析を行っている。DNA マイクロアレイには、cDNA マイクロアレイや、Oligo を用いたアレイなどの異なるシステムがある。我々は、Affimetrix 社の Gene Chip を用いた遺伝子プロファイル検索を行い、その利点と欠点について cDNA アレイと比較検討を行った。Gene Chip を用いた解析は信頼性が高く、EST を含む多数の遺伝子の解析が可能であること、多数の群間での比較が容易である利点があった。EST については、その後どのように標的を選定していくかについての課題が残り、コスト面で高価であることから大量の臨床検体処理には不適であると考えられた。

A. 研究目的

Gene Chip を用いた DNA アレイによる解析を行い、cDNA アレイとの比較によって、利点、問題点について検討した。

B. 研究方法

α -GC の誘導体の中から、EAE を抑制する誘導体 OCH の合成に成功した。そこで、OCH と α -GC による NKT 細胞刺激による遺伝子発現の違いについて Affimetrix 社の Gene Chip を用いて解析を行った。NK 細胞を除去するために抗アシアロ GM1 抗体を投与し、40 時間後に OCH もしくは α -GC を末梢での NKT 細胞の比率が高い MHC Class II ノックアウトマウスの腹腔内に投与した。1.5 時間後 (early phase) と 12 時間後 (late phase) に肝臓ならびに脾臓よりリンパ球を抽出し、MAX ビーズを用いて NK1.1 抗体による positive selection を行い、NKT 細胞を得た。こ

の細胞から mRNA を抽出し、約 6,000 種類のマウス完全長遺伝子および約 6,000 の EST が解析可能な GeneChip Murine Genome U74A Ver.2 (Affimetrix 社) を用いて遺伝子発現を検討した。解析には、Gene Spring[®] (TDB/SiG) を用い、コントロール群、OCH 投与群、 α -GC 投与群の 3 群で比較した。

ヒトの臨床検体を用いた解析としては、全身性エリテマトーデス患者において、T 細胞刺激によって著しくアポトーシスの亢進する群と、軽度亢進する群、健常コントロールの 3 群で T 細胞刺激前後での遺伝子プロファイルを約 12,000 種類のヒト完全長遺伝子が解析可能な Human Genome U95A Array (Affimetrix 社) を用いて検討した。解析には、Gene Spring[®] (TDB/SiG) を用いた。

C. 研究結果

マウスの系においては、クラスター解析によって、early phase では α -GC 投与群でのみ増加するもの、OCH 投与群でのみ増加するもの、 α -GC 投与群・OCH 投与の両群で低下するものがみられた。 α -GC 投与群でのみ増加する遺伝子の多くは、OCH でも誘導されているが発現の程度は低かった。これらの遺伝子群にはサイトカインや、ケモカインなどが多数みられ、他の実験系から得られた結果とよく一致した。

臨床サンプルを用いた系においては、患者間でのばらつきが多いが、クラスター解析によって挙動の一致する遺伝子のプロファイルが得られた。これらの遺伝子発現が他の実験系と一致するかについては、quantitative PCR を用いて確認したところ、マイクロアレイの結果と一致して、信頼性の高いものであることがわかった。

D. 考察

Gene Chip を用いた解析は、他の実験結果ともよく合致し、信頼性のあるものと考えられた。cDNA アレイと比較して、Gene Chip での解析は、EST を含む多数の遺伝子の解析が可能であること、多数の群間での比較が容易であるなどの利点があった。しかし、EST については、その後どのように標的を選定していくかについての課題が残った。また、Chip が高価であり大量のサンプル解析には不適である。臨床応用に使う場合、Gene Chip でスクリーニングし、遺伝子を絞り込んでから、廉価な cDNA アレイを作製し、臨床応用することが現実的であると考えられた。

E. 結論

Gene Chip による解析は信頼性が高いが、臨床で多数の検体を扱うには、コスト面から適さない。臨床応用する場合は、Gene Chip や多数の

クローンの解析が可能な cDNA アレイで絞られた遺伝子群を用いたカスタマーアレイの作製が重要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

I 論文発表

1. Rao N, Miyake S, Reddi AL, Douillard P, Ghosh AK, Dodge IL, Zhou P, Fernandes ND and Band H. Negative regulation of Lck by Cbl ubiquitin ligase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** Vol. 99: 3794-3799, 2002
2. Araki M, Kondo T, Gumpers JE, Brenner MB, Miyake S and Yamamura T. Th2 Bias of CD4⁺ Natural Killer T Cells Derived from Multiple Sclerosis in Remission. **Int. Immunol.** 15 (2) 279-288
3. Miyamoto K, Miyake S, Schachner M, Yamamura T. Heterozygous null mutation of myelin protein zero (P0) enhances susceptibility to autoimmune neuritis targeting P0 peptide. **Eur. J. Immunol.** 33 (3) 656-665
4. Yamamura T, Miyamoto K, Illes Z, Pal E, Araki M, Miyake S. Synthetic glycolipids as potential therapeutics for autoimmune disease. **Curr. Topics. Med. Chem.** In Press

5. 宮本勝一、三宅幸子、水野美歩、岡伸幸、山村隆：実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)の治療における選択的 CX-2 阻害剤の効果；Neuroimmunology 10 (2) :251-254, 2002
6. 三宅幸子：NKT 細胞と自己免疫疾患制御；アレルギー・免疫、19 (9) 92-98,2002
7. 三宅幸子、山村隆：NKT 細胞糖脂質リガンドによる自己免疫疾患制御；Annual Review 免疫 2003、71-77, 2003
8. 山村隆、宮本勝一、長山成美、三宅幸子：NK・NKT 細胞による実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)の発症制御；タンパク質核酸 酵素、47 (16) 2382-2387, 2002
9. 宮本勝一、三宅幸子、山村隆：糖脂質による自己免疫病の制御；感染・炎症・免疫、32(3) 44-45, 2002

II 学会発表

国際学会

- 1) Katsuichi Miyamoto, Sachiko Miyake, and Takashi Yamamura: Prevention of autoimmune encephalomyelitis by a novel glycolipid ligand for natural killer T cells. Experimental Biology 2002, New Orleans, USA, April 3, 2001
- 2) Asako Chiba, Takashi Yamamura, Katsuichi Miyamoto Sachiko Miyake. A new synthetic

glycolipid OCH prevents collagen-induced arthritis by inducing Th2 bias of natural killer (NK) T cells. FOCIS (Federation of Clinical Immunology Societies) 2nd Annual Meeting, San Francisco, USA, June 28, 2002. (Clinical Immunology, 103:S82, 2002)

- 3) Asako Chiba, Takashi Yamamura, Sachiko Miyake. A New Synthetic Glycolipid OCH Suppresses Collagen-induced Arthritis by Inducing Th2 bias of Natural Killer (NK) T cells. Arthritis Rheum. 46(9) 103:S, 2002

国内学会

- 1) 宮本 勝一、三宅幸子、山村 隆：新規糖脂質による自己免疫病モデルの治療、第 99 回日本内科学会総会、平成 14 年 3 月 28 日-30 日、名古屋
- 2) 三宅幸子、宮本勝一、千葉麻子、山村隆：NK・NKT 細胞による自己免疫疾患の特異的制法の研究、第 46 回日本リウマチ学会総会、平成 14 年 4 月 23 日、大阪
- 3) 千葉麻子、橋本博史、山中健次郎、山村隆、三宅幸子：抗 CD3+抗 CD28 抗体刺激による SLE 患者末梢血 T リンパ球のシグナル伝達異常、第 46 回日本リウマチ学会総会、平成 14 年 4 月 24 日、大阪
- 4) 宮本 勝一、三宅幸子、山村 隆：新たな糖脂質による多発性硬化症モデルの治療、第 43 回日本神経学会総会、平成 14 年 5 月 29 日、札幌
- 5) 三宅幸子、千葉麻子、山村隆：NKT 細胞合成糖脂質リガンド OCH による自己免疫疾患治

療法の開発、第 30 回日本臨床免疫学会総会、平成 14 年 12 月 4 日、東京

6) 千葉麻子、高橋和也、阿部香織、橋本博史、山中健次郎、山村隆、三宅幸子：T 細胞受容体刺激による apoptosis の著明亢進を示す SLE 患者 T 細胞の解析、第 30 回日本臨床免疫学会総会、平成 14 年 12 月 3 日、東京

7) 林幼偉、三宅幸子、山村隆：CD4⁺CD25⁺T 細胞による実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)の調節、第 30 回日本臨床免疫学会総会、平成 14 年 12 月 4 日、東京

8) 荒木学、三宅幸子、山村隆：多発性硬化症における NKT 細胞減少は長期ステロイド治療により補正される、第 30 回日本臨床免疫学会総会、平成 14 年 12 月 4 日、東京

9) Sachiko Miyake, Asako Chiba, Shinji Oki, Katsuichi Miyamoto, Takashi Yamamura: A synthetic glycolipid OCH prevents killer T (MLT) cells、第 32 回日本免疫学会、平成 14 年 12 月 6 日、東京

10) 千葉麻子、山村隆、三宅幸子：NKT 細胞合成糖脂質リガンド OCH によるコラーゲン関節炎の抑制、第 32 回日本免疫学会、平成 14 年 12 月 6 日、東京

11) Sammy Bedoui, Sachiko Miyake, Katsuichi Miyamoto, Stephan von Horsten, Annette Beck-Sickinger, Takashi Yamamura. Evidence for a regulatory role of Neuropeptide Y in Experimental autoimmune encephalomyelitis、第 32 回日本免疫学会、平成 14 年 12 月 6 日、東京

12) Xianofeng Jiang, Kenji Kuroiwa, Sachiko Miyake, Takashi Yamamura, Nobuhiro Ohkochi, Masaru Taniguchi, Kenichiro Seino: Effect of glycolipid ligands for NKT cells in allogeneic transplant rejection、第 32 回日本免疫学会、平成 14 年 12 月 4 7 日、東京

13) 中井之人、岩渕和也、藤井聡、石森直樹、綿野敬子、三島鉄也、中山俊憲、谷口克、Van KaerLuc、三宅幸子、山村隆、小野江和則： α -GalCer および OCH による NKT 細胞の活性化はいずれも動脈硬化促進性に寄与する第 32 回日本免疫学会、平成 14 年 12 月 5 日、東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

日本人多発性硬化症における $\beta 2$ adrenergic receptor 遺伝子多型解析

分担研究者 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 講師

研究要旨 最低1年以上経過している臨床的に診断確実な通常型多発性硬化症患者99例および健常対照者103例において、 $\beta 2$ adrenergic receptor 遺伝子の多型（nuclotide 46 及び 79）をMS患者－健常対照群で検討し、また、MSの臨床症状への影響などを検討した。その結果、 $\beta 2$ adrenergic receptor 遺伝子多型の分布については、MS患者-健常対照者に差はなく、MS患者群において、発症年齢、経過（relapsing-remitting type, secondary progressive type）と $\beta 2$ adrenergic receptor 遺伝子多型との間に関連はなかった。

A.研究目的

MSは、複数の遺伝的要因と後天的要因との相互作用によって発症に至る、多因子疾患であると考えられている。現在、多因子疾患の感受性遺伝子決定のためのアプローチとして用いられているのは、主として罹患同胞対（affected sib-pair）法を用いた連鎖解析（linkage analysis）と、候補遺伝子（candidate gene）を設定した association analysis である。前者の方法は、未知の遺伝子をも検討できる点が優れているが、検出感度が弱く、多数の罹患同胞対の解析が必要であることが難点であり、MSにおける全ゲノムスクリーニングの検索では、HLA領域との連鎖を証明したのみで十分な成果をあげているとは言い難い。一方、後者の方法では、既知の遺伝子から候補遺伝子を設定し、その変異と疾患との関連を解析するもので、検出感度が高く、弱い寄与の感受性遺伝子も検出することができる。これまで我々は、いくつかの遺伝子多型についての検討を case-control study にて行い、その関連性を研究してきた。遺伝子多型については、人種差によるものも考えられ、日本人における多型についての検討が是非必要と思わ

れる。

$\beta 2$ adrenergic receptor は、正常白質の astrocyte においては発現しているのに対し、MS患者の白質の astrocyte において発現していないことが最近報告された。 $\beta 2$ adrenergic receptor 遺伝子は chromosome 5q31-32 上にあり、いくつかの多型が知られている。そのうち、今回検討した、nucleotide46（アミノ酸 16；Arg→Gly）及び 79（アミノ酸 27；Gln→Glu）は変異頻度が高く、 $\beta 2$ 刺激薬に対する down regulation と関係があることが明らかにされている。これらのことから、今回、 $\beta 2$ adrenergic receptor 遺伝子の多型をMS患者－健常対照群で検討し、また、MSの臨床症状への影響などを検討した。

B.研究対象・方法

対象は最低1年以上経過している臨床的に診断確実な通常型多発性硬化症患者99例（詳細は Table 1 参照）および健常対照者103例である。DNAの採取に当たっては、書面にて十分なインフォームドコンセントを行った後、サインにて承諾を得られた方のみ行った。尚、本研究に関しては、北海道大学医学部及び北祐会神経内科病院の倫理委員会にて承認を得

ている。nuclotide 46 の遺伝子多型について、野生型あるいは変異型のセンスプライマーにアンチセンスプライマーを加え、PCR にて増幅し、野生型 homozygote, heterozygote, 変異型 homozygote を得た。一方、nucleotide 79 については PCR-RFLP にて解析した。

C. 研究結果

$\beta 2$ adrenergic receptor 遺伝子多型の分布については、MS 患者-健常対照者に差はなかった (Table 2)。MS 患者群において、経過 (relapsing-remitting type, secondary progressive type) と $\beta 2$ adrenergic receptor 遺伝子多型との間に関連はなかった (data not shown)。また、発症年齢との関連も検討したが、特に有意な差は認められなかった (Table 3)。

D. 考察

今回我々が検討した、 $\beta 2$ adrenergic receptor 遺伝子多型については、susceptibility gene としての可能性や、臨床症状への影響の可能性は低いと考えられた。しかしながら、 $\beta 2$ adrenergic receptor 遺伝子多型についてはまだ未知の部分が多く、人種差も考えられ、今後のさらなる検討は必要と思われる。

E. 結論

MS の発症や臨床症状に $\beta 2$ adrenergic receptor 遺伝子多型が関係している可能性は低いと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kikuchi S, Shinpo K, Niino M, Tsuji S, Iwabuchi K, Onoe K, Tashiro K. Prostaglandin E1 protects cultured spinal neurons against the effects of nitric oxide toxicity. Neuropharmacology. 2002; 42:

714-723.

- 2) Niino M, Kikuchi S, Fukazawa T, Yabe I, Tashiro K. No association of vitamin D-binding protein gene polymorphisms in Japanese patients with MS. J Neuroimmunol. 2002; 127: 177-179.
- 3) Kikuchi S, Fukazawa T, Niino M, Yabe I, Miyagishi R, Hamada T, Tashiro K. Estrogen receptor gene polymorphism and multiple sclerosis in Japanese patients: interaction with HLA-DRB1*1501 and disease modulation. J Neuroimmunol. 2002; 128: 77-81.
- 4) Niino M, Kikuchi S, Fukazawa T, Tashiro K. Genetic susceptibility to multiple sclerosis: implications of genetic research on MS therapy. Expert Review of Neurotherapeutics 2002; 2: 329-338.
- 5) Niino M, Kikuchi S, Fukazawa T, Miyagishi R, Yabe I, Tashiro K. An examination of the Apo-1/Fas promoter Mva I polymorphism in Japanese patients with multiple sclerosis. BMC Neurol. 2002; 2: 8.
- 6) Kikuchi S, Niino M, Shinpo K, Terae S, Tashiro K. Intracranial hemorrhage in neuro-Behçet's syndrome. Intern Med. 2002; 41: 692-695.
- 7) Kikuchi S, Niino M, Fukazawa T, Yabe I, Tashiro K. An assessment of the association between IL-2 gene polymorphisms and Japanese patients with multiple sclerosis. J Neurol Sci. 2002; 205: 47-50.
- 8) Niino M, Kikuchi S, Miyagishi R, Fukazawa

- T, Yabe I, Tashiro K. An examination of the association between $\beta 2$ adrenergic receptor polymorphisms and multiple sclerosis. *Mult Scler* 2002; 8: 475-478.
- 9) Kikuchi S, Shinpo K, Niino M, Tashiro K. Subacute syphilitic meningomyelitis with characteristic spinal MRI findings. *J Neurol*. 2003; 250: 106-107.
- 10) Kikuchi S, Fukazawa T, Niino M, Yabe I, Miyagishi R, Hamada T, Hashimoto S, Tashiro K. HLA-related subpopulations of MS in Japanese with and without oligoclonal IgG bands. *Neurology* (in press).
- 11) Niino M, Kikuchi S, Fukazawa T, Yabe I, Tashiro K. Genetic polymorphisms of osteopontin in association with multiple sclerosis in Japanese patients. *J Neuroimmunol*. (in press)
- 12) Fukazawa T, Kikuchi S, Niino M, Yabe I, Hamada T, Tashiro K. Multiphasic demyelinating disorder with acute transverse myelitis in Japanese. *J Neurol* (in press)
- 13) Houzen H, Niino M, Kikuchi S, Fukazawa T, Nogoshi S, Matsumoto H, Tashiro K. The prevalence and clinical characteristics of MS in northern Japan. *J Neurol Sci* (in press)
- 14) 菊地誠志, 深澤俊行, 新野正明, 宮岸隆司, 田代邦雄. 疫学および免疫学的側面からみた候補遺伝子の検討. *神経免疫学* 2002; 10: 21-22.
- 15) 輿水修一, 菊地誠志, 深澤俊行, 新野正明, 田代邦雄. 多発性硬化症における TNF- β 遺伝子多型についての検討. *神経免疫学* 2002; 10: 48-49.
- 16) 宮岸隆司, 新野正明, 深澤俊行, 菊地誠志, 濱田毅, 田代邦雄. 北海道在住の MS における DRB1*1501, DPB1*0301, DPB1*0501 の再検討. *神経免疫学* 2002; 10: 50-51.
- 17) 新野正明, 岩渕和也, 菊地誠志, 阿戸学, 諸橋大樹, 緒方昭彦, 小野江和則, 田代邦雄. ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 γ (PPAR- γ) 特異的リガンド, troglitazone による実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)抑制. *神経免疫学* 2002; 10: 110-111.
- 18) 菊地誠志, 深澤俊行, 新野正明, 宮岸隆司, 東琢哉, 田代邦雄. 疫学および免疫学的側面からみた多発性硬化症関連候補遺伝子の検討. *神経免疫学* 2002; 10: 185-190.
- 19) 深澤俊行, 出井聡. 神経難病 その診断から福祉の実際まで —MS (多発性硬化症)—. *Modern Physician* 2002; 22; 573-578.
- 19) 深澤俊行. 多発性硬化症における対症療法. *Modern Physician* 2002; 22: 931.
- 20) 深澤俊行. 多発性硬化症寛解期における IFN β 1-b の導入—患者への説明の秘訣. *Modern Physician* 2002; 22: 1160.
- 21) 深澤俊行. 脊椎脊髄疾患と薬物療法—特発性炎症性脱髄疾患 (多発性硬化症, 急性散在性脳脊髄炎). *脊椎脊髄ジャーナル* (in press)
- 20) 深澤俊行. 多発性硬化症の疾患感受性遺伝子. *日本臨床* (in press)

2.学会発表

a.国際学会

- 1) Fukaura H, Fukazawa T, Kikuchi S, Tashiro K. Interleukin-18 (IL-18) in CSF of patients with MS and ADEM. FOCIS meeting. San Francisco, 2002.
- 2) Koike F, Kondo T, Fukazawa T, Yamamura T. Immunomodulatory effects of Interferon β -1b in multiple sclerosis: cDNA microarray analysis of peripheral blood T and non-T cells. Second Annual Meeting of the Federation of Clinical Immunology Societies. San Francisco, 2002.
- 3) Niino M, Kikuchi S, Fukazawa T, Tashiro K. Gene polymorphisms in Japanese patients with multiple sclerosis. 127th Annual Meeting American Neurological Association, New York, 2002.

b.国内学会

- 1) 輿水修一, 菊地誠志, 深澤俊行, 新野正明, 田代邦雄. 多発性硬化症における TNF- β 遺伝子多型についての検討. 第 14 回日本神経免疫学会, 東京, 2002.
- 2) 宮岸隆司, 新野正明, 深澤俊行, 菊地誠志, 濱田毅, 田代邦雄. 北海道在住の MS における DRB1*1501, DPB1*0301, DPB1*0501 の再検討. 第 14 回日本神経免疫学会, 東京, 2002.
- 3) 新野正明, 岩渕和也, 菊地誠志, 阿戸学, 諸橋大樹, 緒方昭彦, 小野江和則, 田代邦雄. ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 γ (PPAR- γ) 特異的リガンド, troglitazone による実験的自己免疫性脳

脊髄炎(EAE)抑制. 第 14 回日本神経免疫学会, 東京, 2002.

- 4) 深浦彦彰, 深澤俊行, 菊地誠志, 田代邦雄. 多発性硬化症患者における血清, 髄液中の IL-18 の検討. 第 43 回日本神経学会総会, 札幌, 2002.
- 5) 新野正明, 岩渕和也, 菊地誠志, 阿戸学, 諸橋大樹, 緒方昭彦, 小野江和則, 田代邦雄. ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 γ 特異的リガンド, トログリタゾンによる実験的自己免疫性脳脊髄炎抑制. 第 43 回日本神経学会総会, 札幌, 2002.
- 6) 深澤俊行, 川島淳, 武井麻子, 本間早苗, 濱田毅, 菊地誠志, 田代邦雄. 本邦 MS には DR15 に相関し OCB 陽性の群と DR4 に相関し OCB 陰性の 2 群がある. 第 43 回日本神経学会総会, 札幌, 2002.
- 7) 深浦彦彰, 浦茂久, 柴田まゆみ, 菊地誠志, 佐々木秀直, 森若文雄, 田代邦雄. パーキンソニズムを呈した抗リン脂質抗体症候群(APS)の 1 例. 第 20 回日本神経治療学会, 金沢, 2002.
- 8) 深澤俊行, 川島淳, 武井麻子, 本間早苗, 濱田毅, 菊地誠志, 田代邦雄. 多発性硬化症に対する interferon beta 1b 使用の問題点とその対策ム自験 33 例からの検討. 第 20 回日本神経治療学会, 金沢, 2002.

c.招待講演

- 1) 菊地誠志, 深澤俊行, 新野正明, 宮岸隆司, 田代邦雄. 疫学および免疫学的側面からみた多発性硬化症における候補遺伝子の検討. 第 14 回日本神経免疫学会, 東京, 2002.
- 2) 深澤俊行: 本邦多発性硬化症の疾患関連

遺伝子について—日本神経学会北海道地区生涯教育講演会。札幌，2002。

- 3) 深澤俊行. 日本における多発性硬化症の多様性とその病態—MS の病型とそのoverview. 第43回日本神経学会総会 札幌，2002。
- 4) Fukazawa T. Multiple sclerosis in Japanese. 第1回MSワークショップ。仙台，2002。

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

Table 1 Clinical profiles of MS patients

	Total (n=99)
Female : Male	2.96 : 1
Age ^a	35.9 ± 10.9
Age at onset ^a	26.3 ± 9.1
Mean duration ^a	9.7 ± 8.6
Course	
R-R course	64 (64.6%)
S-P course	35 (35.4%)
EDSS ^b	3.2 ± 2.6

R-R; relapsing remitting

S-P; secondary progressive

EDSS; Expanded Disability Status Scale of Kurtzke

^a mean (years) ± SD, ^b mean EDSS ± SD

Table 2 β2AR gene polymorphisms: case-control analysis of genotype and alleles

	MS patients Total N=99 (%)	Controls N=103 (%)
Codon 16		
Genotype frequency		
Arg / Arg	22 (22.2%)	26 (25.2%)
Arg / Gly	48 (48.5%)	49 (47.6%)
Gly / Gly	29 (29.3%)	28 (27.2%)
Allele frequency		
Arg	92 (46.5%)	101 (49.0%)
Gly	106 (53.5%)	105 (51.0%)
Codon 27		
Genotype frequency		
Gln / Gln	83 (83.8%)	81 (78.6%)
Gln / Glu	14 (14.1%)	22 (21.4%)
Glu / Glu	2 (2.0%)	0 (0.0%)
Allele frequency		
Gln	180 (90.9%)	184 (89.3%)
Glu	18 (9.1%)	22 (10.7%)

No significant difference in the distributions of β2AR polymorphisms was observed between the MS patients overall and the controls (p > 0.05)

Table 3 Age at disease onset in β2AR gene polymorphisms

Genotype	No.	Age at onset (mean age ± S.D.)
Codon 16		
Arg / Arg	22	27.3 ± 7.5
Arg / Gly	48	24.6 ± 8.4
Gly / Gly	29	28.4 ± 11.0
Codon 27		
Gln / Gln	83	27.2 ± 9.1
Gln / Glu	14	21.6 ± 8.7
Glu / Glu	2	22.5 ± 5.0

Statistical analysis was tested by ANOVA. No significant difference was detected between genotype and age at onset in each codon (p > 0.05)

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

分担研究者 横山和正 順天堂大学脳神経内科助手

研究要旨

必須アミノ酸であるトリプトファン¹の酸化酵素である indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)は、トリプトファンを分解することで生理的免疫寛容に重要な役割を持っている。昨年度の研究において IDO 代謝阻害剤が active challenge による実験的自己免疫性脳脊髄炎(experimental autoimmune encephalomyelitis: EAE) に対し抑制効果を持つことを報告した。本年度の研究では IDO 代謝阻害剤の in vivo に於ける作用について昨年とは異なる EAE モデルを利用して研究を行った。また細胞性免疫が EAE と同様に重要と考えられている 1 型糖尿病(IDDM)モデルマウス (NOD) においてマウス IDO 遺伝子を発現ベクターに組み込みマウスに遺伝子導入し、発症に関する影響を観察した。その結果 IDO 代謝阻害剤の発病抑制効果は両実験系ともに認められず、トリプトファン代謝阻害を利用した免疫寛容の誘導は universal ではなく EAE では導入期にのみおそらく抗原提示細胞と T 細胞との priming の時点で効果が認められる可能性が強く、将来多発性硬化症の治療への応用にはさらなるメカニズムの解明が必要である。

A. 研究目的

トリプトファン代謝阻害剤である IDO inhibitor が実験的自己免疫性脳脊髄炎に対して抑制効果を示すかどうかを、昨年度の active challenge とは誘発方法が異なる MBP-TCR TG (ミエリンベースックプロテイン-T 細胞リセプタートランスジェニック) マウスを利用したシステムで検討し、さらには細胞性免疫特に T ヘルパー 1 型細胞が EAE と同様病態に重要であると考えられている NOD マウスを利用した 1 型糖尿病モデルにおいても発病抑制効果を持つのかどうかを、マウス IDO 遺伝子を組み込んだ発現ベクターを利用した遺伝子導入により行い、トリプトファン代謝阻害剤による免疫寛容のメカニ

ズムに関し昨年とは異なった観点からさらに解析することをその目的とした。

B. 研究方法

MBP-TCR トランスジェニックマウスは EAE の自然発症率が 5-30%であるが PTX(百日咳菌毒素)を腹腔内に投与することで 2 週間以内に 100%のマウスに病気を引き起こすことができる。PTX のみで免疫系を賦活させマウスに EAE を引き起こすことより多発性硬化症のモデルとしては簡易に利用でき有用である。そこで double blind 下に必須アミノ酸であるトリプトファン¹の酸化酵素である indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)代謝阻害剤を MBP-TCR トランスジェニックマウスの皮下

に埋め込んだ群とプラセボコントロール群とに分け、その後3日後腹腔内にPTX100 ngを注射し病状の変化を観察した。その後EAEの発症期間、重症度について検討した。

NODマウスによるIDDMモデルでは糖尿病の発現までに約8-12週間必要であり、尿検査、体重の変化で簡単に糖尿病の有無を判定することができる。しかしIDO代謝阻害剤は除放剤であり、その効果は約10日前後である。このためIDDMモデルを利用した実験系では経過中IDO代謝阻害剤の血中濃度を維持することが困難であり、マウスIDO遺伝子を組み込んだ発現ベクターを作製しin vivoでの実験を行った。コントロールとしてはvectorそのものを使用した。

プロメガ社のpCI mammalian expression vectorを使用した〔図1〕。マウスIDOは1555bpでありベクターのMultiple cloning siteのXhoI, NOTI siteを利用してマウスIDO遺伝子を組込んだ。プラスミッドDNAの調製は大腸菌培養後Qiagen社のキットを利用した。エンドトキシンによる影響を取り除くため同じくQiagen社のendofree plasmidキットを利用した。

ここでEAEモデルではBBB(blood brain barrier)の存在により標的器官である脳特異的プロモーターを持たないベクターの骨格では脳内に実際にDNAを到達させるのは困難と考えたためIDDMモデルのみで実験を行った。naked plasmid DNAワクチンの動物実験での有用性が報告されており(ref2)、第4週齢のマウスに麻酔を行い下腿筋へ100マイクログラムのプラスミッドDNAの筋肉内への注射を行った。

糖尿病の診断には体重変化、テストテープによる判定を半定量的に1週間ごとに行った。

C. 研究の結果

1) IDO代謝阻害剤によりトランスジェニックマウスを利用したEAEの重症度の改善、症状の発現を遅らせることはできなかった

(図2)。

2)

IDDMマウスにおける実験系において糖尿病の発現頻度、期間を低下させることはできなかった〔図3〕。

D. 考察

免疫寛容に関しては同一の病態モデルで最終病理像は同じであっても常に同じ機序が最初から最後まで働いているとは限らない。これは昨年度の報告で導入期にのみIDO代謝阻害剤によるEAEの抑制効果が認められたが、効果期には抑制効果が認められなかったこと、さらには本年度の実験で、PTX投与によるMBP-TCRトランスジェニックマウスにおけるEAEの発症を抑制できなかったことから明らかである。NODマウスに遺伝子導入した実験では疾患による免疫寛容のメカニズムが異なるためと考えた。ただし遺伝子導入したマウス内でのIDO遺伝子の発現を各種臓器ごとにおいて測定できておらず発現レベルが低いことが今回の有意差を認めなかった原因であることも否定しきれない。この点に関してはさらなる解析が必要である。以上のように2年間にわたり行ったEAEの実験から、IDO代謝阻害剤によるEAEの抑制は効果期における免疫寛容の誘導に関しては不可能であると考えられた。一方adoptive transferを利用した系では