

桜井らは SJL/J マウスを使用しリンパ節由来の細胞の移入時に IDO 代謝阻害剤を腹腔内注射もしくは除法剤を皮下に埋め込むと EAE の clinical score がわずかながら増悪することを報告している (ref 3)。これは我々の昨年度の報告と反対の現象である。しかしこの系において移入された脳炎惹起細胞はすでに活性化した状態であり抗原提示細胞による priming は終了している。そのため IDO 代謝阻害剤の免疫抑制効果はむしろ細胞を移入される側のマウス側の免疫系にのみ働いている可能性も否定しきれない。トリプトファン代謝とインターフェロンベータの関係についてはまだ研究されておらず、多発性硬化症患者にインターフェロン治療を行う上でもこのような個体差、使用時期による免疫寛容のメカニズムのさらなる解析をアミノ酸代謝の面からも並行して行っていくことが必要である。今後発展していくと考えられる遺伝子治療と同様テーラーメイド医療を実践し、特異的な治療法を開発する上の基礎実験として今回の結果は有用である。

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

E. 結論

自己免疫疾患における免疫寛容は動物モデルにおいてさえも病期および疾患によって異なっており、遺伝的多型性を持つヒトではさらに複雑なメカニズムの存在が考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

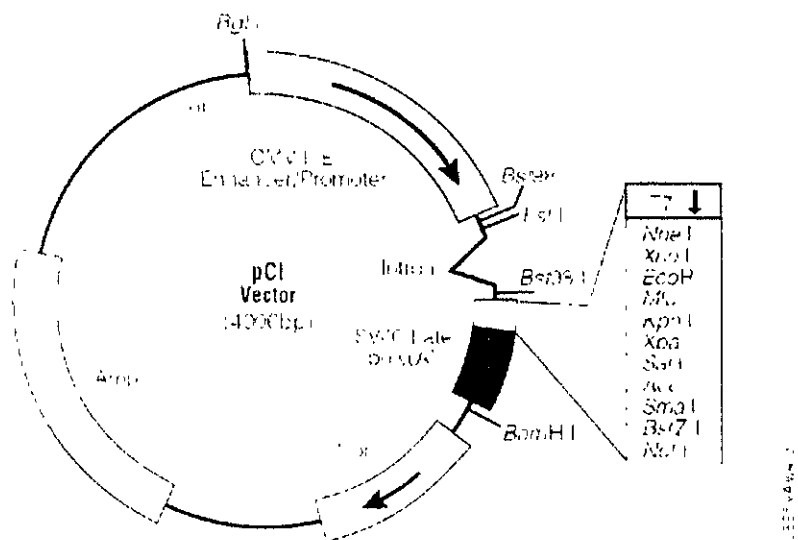


図 1 の説明

expression vector :

multiple cloning site を利用してマウス IDO 遺伝子 (ref. 1) を組み込んだ

```

1  gctaaacct atagagatg ctgggacatt ccttcagtgg ccaagtgggg ggtcagtgga
61  gtagacagca atggcaactca gtaaaatata tctacagaa ggttctagaa ggatccttga
121 agaccaccac atagatgaag atgtgggctt tgctctacca catccactgg tggagctgcc
181 cgacgcatac agcccctggg tccctgtggt tagaaatctg cctgtgctga ttgagaacgg
241 gcagcttcca gaagaagttg aaaagctgcc cactctgagc acggacggac tgagaggaca
301 caggttacag cgcctggcac acctggccct ggggtacata accatggcgt atgttgggaa
361 ccgaggggat gacgatgttc gaaaggtgct gcccgcgaat attgctgttc cctactgcga
421 gctctcagag aagttgggcc tgccctcctat tctgtcttat gcagactgtg tccaggcaaa
481 ctggaagaaa aaggacccca atgggcccac gacatacgag aacatggaca ttctgtcttc
541 atttctctgt ggggactgog acaagggtct cttctctgct tctctattgg tggaaatcgc
601 agcttctcct gcaatcaaag caatcccccac tgtatccagt gcagtagagc gtcaagacct
661 gaaagcattg gaaaaggcac tgcacgacat agctaccagt ctggagaaaag ccaaggnaat
721 ttttaagagg atgcgtgact ttgtggacct agacacgttt ttccacgttc tccgcatata
781 tctgtctggt tggaaatgca gctccaagct gccagaaggt ctgctgtatg agggggctctg
841 ggacacccca aaaatgtttt cagggggcag tgcaggccag agcagcatct tccagagtct
901 tgatgtcctt ctgggaataa aacacgaggc tggcaaagaa tctctgcag aattctcca
961 ggaaatgaga gactacatgc ctccagccca ccggaacttc cttttcttct tagagtcagc
1021 tccccagtc cgtgagtttg tcatttcaag acacaatgaa gacttgacga aagcctataa
1081 cgagtggtgtg aatggctctg tctctgtgag aaagtccac ctgcgaatag tagatactta
1141 cattatgaaa ccttcgaaga agaagcccac tgatggcagc aagtcggaag agccctcaaa
1201 tgtggaaagc agagggactg ggggtacgaa tcccatgact ttcttaagga gtgtgaaga
  
```

1261 tacaaccgag aaagctette tgagttggcc ttagtgtagc aagctccact tctatcaggg
 1321 cacagaaaac accttcatcc tgcatagct cattaaatca gatccaccaa gtaagactat
 1381 agaataattt gectgttgta tattatgtag atttcaaaaa tcatctgtgc attccctgta
 1441 ggaaaataat caagctgaac tatttaatga tattaaaatg atataagaaa taatataaaa
 1501 tatatttatg attgaatac aacaatgaga cccagtaaat aaaagttatt gtgaa

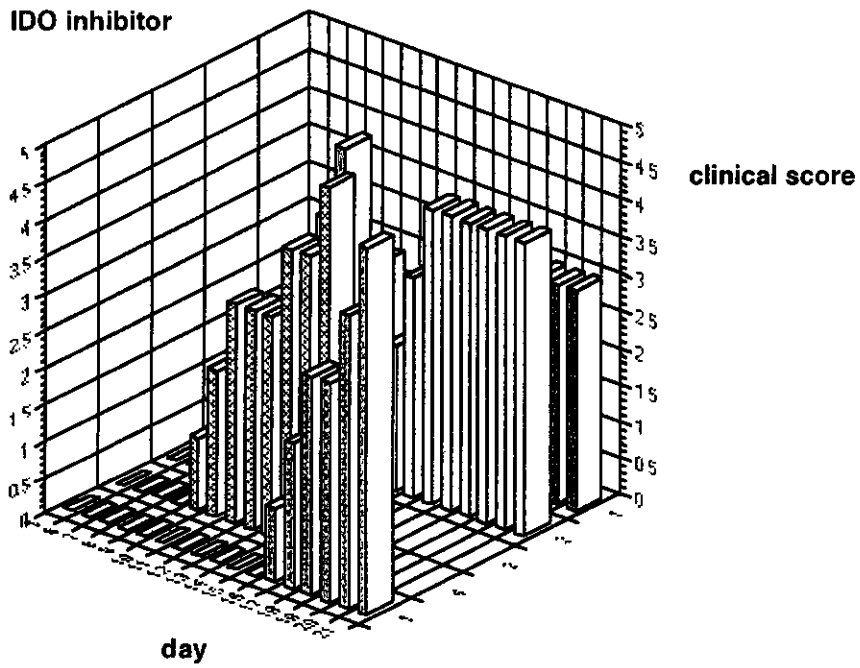
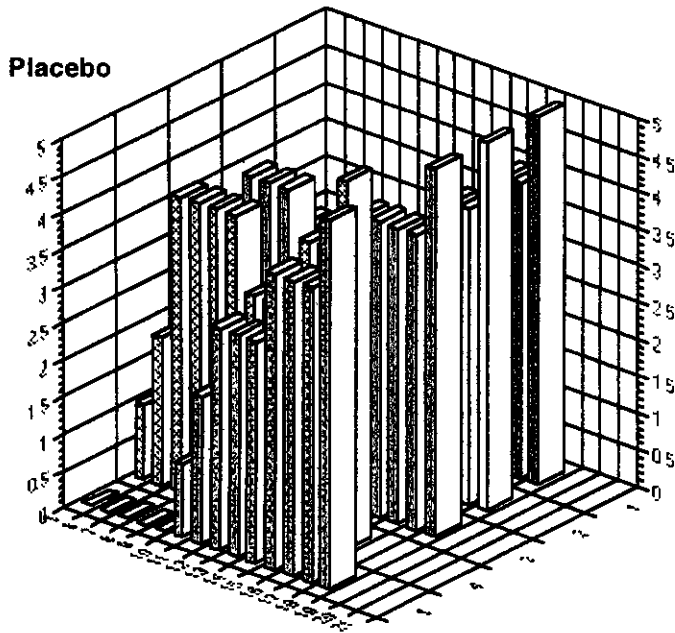


図 2 の説明

プラセボ群および IDO 代謝阻害剤をそれぞれ皮下に埋め込んだマウスを解析した (n=5)。

EAE の重症度を縦軸に、横軸は PTX 注射後日数である。

Clinical score

- 1) limp tail
- 2) hind limb weakness
- 3) partial hind limb paralysis
- 4) complete hind limb paralysis
- 5) moribund state

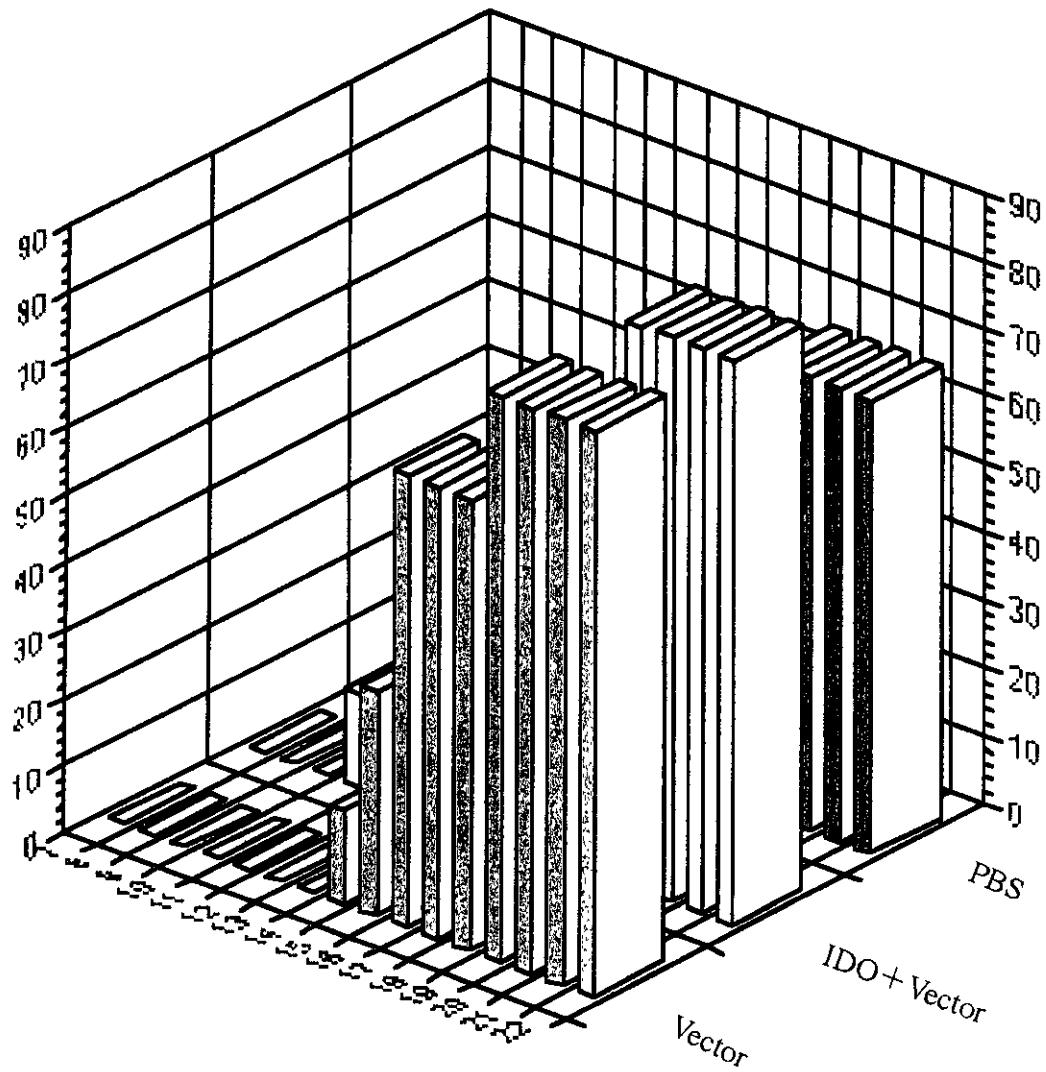


図3の説明

NOD マウスの糖尿病の発病率および週齢のグラフ

縦軸は糖尿病の発生頻度、横軸は週齢を示している。

それぞれ右より

生食使用群、IDO 遺伝子導入群、ベクターのみの群 (n=6)

Reference

1)

Gene 105 (2), 221-227 (1991)

2)

J. Immunol 160, 5181-5187(1998)

3)

J. Neuro Immunol 129, 186-196 (2002)

免疫吸着療法は多発性硬化症の免疫異常を調節し再発を抑制する

分担研究者： 野村 恭一

共同研究者： 三井隆男、高濱美里*、高砂子由佳子、滝澤功一、大島裕紀、
木下俊介、大貫 学*、富岳 亮

所 属： 埼玉医科大学神経内科、総合医療センター第4内科*

研究要旨

目的：頻回の再発をくり返す寛解再発型の多発性硬化症（RR-MS）患者に定期的な免疫吸着（IAPP）療法を施行し、再発予防効果について検討した。対象・方法：年間再発回数が1.2以上、あるいは治療開始前6か月間の再発回数が2回以上のRR-MS 8例を対象とし、定期的にIAPP療法を施行、治療前後での年間再発頻度を比較した。施行期間は2000年1月から2年間。IAPPは2日間連続を1クールとし、3~4か月ごとに施行した。血漿分離器はP506、吸着膜はTR-350、処理血漿は 2460 ± 243.4 ml。IAPP施行前、後4~6週において末梢血リンパ球サブセット、血清サイトカインを測定した。結果：IAPP施行前の平均年間再発頻度は2.0（n=7）であったが、施行後の1年間の再発率は0.6と明らかに低下し（ $p < 0.05$ ）、さらに、次年度の年間再発率は0.2（n=6）と有意に低下した（ $p < 0.05$ ）。リンパ球サブセットの検討では、IAPP施行後に活性化CD4細胞、helper-inducer細胞は施行前に比べ有意に低下し（ $p < 0.001$ 、 $p < 0.005$ ）、一方、NK細胞は明らかに上昇を示した（ $p < 0.005$ ）。血清サイトカインの検討では、IAPP施行前後に炎症性サイトカイン（IL-2、INF- γ 、TNF- α ）は有意な変化はなかった。抗炎症性サイトカインは施行後にIL-4は有意に低下（ $p < 0.05$ ）、TGF- β は低下傾向、IL-10は変化を認めなかった。結語：定期的なIAPP療法はRR-MS患者に対し再発予防効果を有する可能性が示唆された。

A. 研究目的

寛解再発型の多発性硬化症（RR-MS）、中でも頻回の再発をくり返すRR-MS患者において、定期的に免疫吸着（IAPP）療法を施行し、IAPP療法によるMSの再発予防効果について検討した。さらに、IAPP処置前後における末梢血リンパ球サブセットおよび血清サイトカインを測定

し、RR-MSに対するIAPP療法による免疫調節機構について考案した。

B. 研究方法

年間再発回数が1.2以上、あるいは治療開始前6か月間の再発回数が2回以上の寛解再発型のRR-MS 8例（男女比1:7、平均年齢38歳、平均罹病期間5.4年）に対してIAPP

療法を施行し、治療前後での年間再発頻度を比較した。IAPP 療法の施行期間は 2000 年 1 月から 1 年間(第 1 年度の観察期間)を目標とし、さらに、2001 年 4 月から 2002 年 3 月までを第 2 年度の観察期間とした。IAPP は原則として 2 日間連続(一部は 3 日間)を 1クールとし、12~16 週ごとに施行した(5 日間の入院治療を原則)。IAPP は血漿分離器 P 506(クラレ)、吸着膜は TR-350(旭メディカル)、抗凝固剤としてヘパリンを使用、処理血漿は 2460 ± 243.4ml であった。IAPP 施行前、IAPP 施行後 4~6 週において末梢血リンパ球サブセットおよび血清サイトカインを測定した。末梢血リンパ球サブセットはモノクローナル抗体 Becton Dickinson 社製の CD4、CD8、CD25、CD11b、CD45RA、CD29、CD3、CD16/CD56 を用い、二重フローサイトメトリー法で解析した。各抗体により CD4 系細胞、CD8 系細胞、NK/CTL 細胞の 3 群に分け、CD4 系細胞は CD25、CD45RA、CD29 により 3 サブセット、CD8 系細胞は CD25、CD11b により 3 サブセットに分け検討した。なお、各サブセットはそれぞれ 1×10^4 個の細胞を測定し、CELL Quest システムで解析した。さらに、IAPP 施行前、IAPP 施行後 4~6 週において血清サイトカインを測定した。炎症性サイトカインとして IL-2、INF- γ 、TNF- α 、抗炎症性サイトカインとして IL-4、IL-10、TGF- β それぞれ ELISA 法を用いて解析した。なお、全ての症例においてインフォームドコンセントを得たうえで IAPP 療法ならびに採血を施行した。

C. 研究結果

第 1 年度の観察期間では、IAPP

療法を施行した MS 患者の平均観察期間は 10.5 月 (n=8) であった。IAPP 施行前の平均年間再発頻度は 2.0 (n=7) であったが、1 年間の定期的な IAPP 療法の施行により年間再発率は 0.6 と明らかに低下した(図 1、 $p < 0.05$)。1 例は IAPP 施行後の穿刺部位からの出血により他治療に変更した。第 2 年度の観察期間では、1 例 1 回の再発を認めたが、他症例において再発を認めず年間再発率は 0.2 (n=6) となった(図 1、 $p < 0.05$)。1 例は定期的 IVIg(免疫グロブリン静注)治療に変更した。

末梢血リンパ球サブセットの検討では、IAPP 施行後には活性化 CD4 (CD4+CD25+) 細胞、helper-inducer (CD4+CD29+) 細胞は IAPP 施行前に比べ有意に低下し(表 1、 $p < 0.001$ 、 $p < 0.005$ 、paired t-test)、一方、NK (CD3-CD16/56+) 細胞は明らかに上昇を示した(表 1、 $p < 0.005$ 、paired t-test)。

血清サイトカインの検討では、IAPP 施行前後に炎症性サイトカインである IL-2、INF- γ 、TNF- α はいずれも有為な変化をみなかった。抗炎症性サイトカインの IL-4、IL-10、TGF- β では、IAPP 施行後の 4 週において IL-4 は有意に低下 ($p < 0.05$)、TGF- β は低下傾向、IL-10 は変化を認めなかった(表 2)。

D. 考察

近年、MS の再発予防薬として INF-1b が用いられているが、視力障害、筋力低下、運動失調などの症候を有する患者では、INF-1b の自己注射が出来ないことをしばしば認め、このような症例では INF-1b 以外の再発予防治療が望まれていた。従来、MS の治療法としては副腎皮

質ステロイド療法、血液浄化療法が用いられ、その有効性が確かめられている(1, 2, 3)。我々は、活動期 MS 患者に IAPP 療法を施行することにより活性化 CD4 細胞が低下することを確認していた。

今回我々は、血液浄化療法を定期的に施行することにより、MS の再発を予防できるのではと考え、全ての患者にインフォームドコンセントを得たうえで IAPP 療法を施行した。

IAPP 療法を施行した RR-MS 患者 8 例の 2 年間の臨床的検討では、IAPP 施行前の平均年間再発頻度は 2.0 であったが、定期的な IAPP 療法の施行により施行後 1 年間の再発率は 0.6 と明らかに低下した(図 1、 $p < 0.005$)。さらに、次年度の年間再発頻度は 0.2 となり、施行前に比較し有意な減少を認めた。

今回我々の少数例、非対照試験の検討では、IAPP 療法が MS の再発を抑制するまでの結論は出せないが、これら IAPP 処置群での再発回数は明らかに低下していた。末梢血リンパ球サブセットの検討では、IAPP 施行後に MS 活動期に上昇する活性化 CD4 細胞、ならびに helper-inducer 細胞は施行前に比べ有意に低下、さらに、MS 活動期に低下する NK 細胞細胞は明らかに上昇を示し、IAPP による免疫調節が疾患の再発を抑制したものと推測した。血清サイトカインの検討では、MS 活動期に上昇するとされる炎症性サイトカイン(IL-2、INF- γ 、TNF- α)に有意な変化を認めなかった。

一方、MS 非活動期に上昇するとされる抗炎症性サイトカイン(IL-4、TGF- β)は、むしろ IAPP 施行後に低下あるいは低下傾向を認めており、IAPP によりサイトカインは除去さ

れる可能性が示された。血清サイトカインの変化はこれを測定した血清が IAPP 施行後 4 週であり、IAPP 処置による直接的な変化を捉えているものではないものと推察した。

免疫性神経疾患における血液浄化療法の治療メカニズムは十分に理解されていない。自己抗体の除去 4)、免疫複合体の処理、サイトカインの調節 5)による細胞性免疫に影響を及ぼす 6)などがあるが、その詳細は未だ不明である。今回の IAPP 処置前後での検討では、Th1 系に属する活性化 CD4 細胞、helper-inducer 細胞が低下しており、INF- γ 、TNF- α などの炎症性サイトカイン調節によるものと推測している。NK 細胞の上昇に関しても同様に IL-4 などサイトカインによる調節機序が想定された。

E. 結語

寛解再発型の多発性硬化症(RR-MS)患者に対して定期的な免疫吸着療法(IAPP)を施行した。

① IAPP は、MS の再発予防効果を有することが示唆された。② IAPP は、活性化 CD4 細胞、helper-inducer 細胞を低下させ、NK 細胞は上昇させた。

文献

- 1) Schauf CL et al : Concerning the application of plasmapheresis to multiple sclerosis. Plasma Ther 1:33、1979
- 2) Weiner HL et al : Double-blind study of true vs. sham plasma exchange in patients with immunosuppression for acute attacks of multiple sclerosis. Neurology39:1143、1989

- 3) Schmitt E et al : Immuno-adsorption(IA) versus plasma exchange(PE)in multiple sclerosis - first trial of a double blind controlled trial. " Apheresis" 1990、 p293、 Alan R Liss、 New York
- 4) Glassman AB : Immune responses : the rationale for plasmapheresis. Plasma Ther 1: 13、 1979
- 5) 渋谷統寿 : Guillain-Barre 症候群、 Miller Fisher 症候群. 神経内科 42 : 487、 1995
- 6) Kanazawa H et al : Immunoabsorption therapy and cellular immunity. Therapeutic Plasmapheresis 8: 249、 1991

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 発表論文

a 雑誌

- 1) 野村恭一、木澤英樹、柴木謙次、滝澤功一、高砂子由佳子、三井隆男、大貫 学、富岳 亮、大野良三 : ONO-2506 による EAN 抑制作用の検討. 平成 12 年度厚生省免疫性神経疾患調査研究班 113-115、2001
- 2) 柴木謙次、野村恭一、井口貴子、三井隆男、大貫 学、島津邦男、濱口勝彦、大野良三 : 人參養榮湯による EAE 予防効果. 神経免疫学 9 (1) : 70-71、 2001
- 3) 高砂子由佳子、野村恭一、大野良三、島津邦男 : 慢性期ラクナ梗塞におけるリンパ球接着分子 LFA-1、VLA-4 と血管内皮接着分子 ICAM-1、VCAM-1 および脳血管危険因子との関連. 脳卒中

23 : 316-324、2001

- 4) 大貫 学、野村恭一、滝澤功一、大野良三、島津邦男、濱口勝彦、Bernard CCA : ONO-2506 の経口投与は慢性再発性実験的脳脊髄炎 (CR-EAE) の再発を抑制する. 神経免疫学 10 (1) : 112-113、2002
- 5) 柴木謙次、野村恭一、大野良三、島津邦男 : 人參養榮湯による実験的自己免疫性脳脊髄炎の抑制. 神経治療 19 : 159-166、2002
- 6) 野村恭一、大貫 学、滝澤功一 : ONO-2506 の経口投与は CR-EAE を予防する. 平成 13 年度厚生科学研究費補助金 特定疾患対策研究事業. 多発性硬化症に対するインターフェロン療法の研究班 報告書 31-39
- 7) 野村恭一、三井隆男、高濱美里、高砂子由佳子、滝澤功一、大島裕紀、木下俊介、大貫 学、富岳 亮 : 免疫吸着療法は多発性硬化症の免疫異常を調節し再発を抑制する. 平成 14 年度厚生労働科学研究費補助金 特定疾患対策研究事業. 多発性硬化症に対するインターフェロン療法の研究班 報告書
- 8) 三井隆男、野村恭一、島津邦男 : 病初期に一過性の中枢神経運動伝導時間の延長を認めギラン・バレー症候群の 1 例. 末梢神経 13 (1) : 2002
- b. 単行本
- 1) 野村恭一 : 脳血管障害、糖尿病療養指導、知識の総まとめ. 片山茂裕、河津捷二 監修 総合医学社. 73-76、2001
- 2) 野村恭一 : ダニと神経疾患. 21 世紀の神経免疫学 展望. 別冊 医学のあゆみ 109-114、 2001
- 3) 野村恭一、金子 厚、島津邦男 : プリオン病アトラス 100 撰 病初

期にアテトーデ様運動が出現した Creutzfeldt-Jakob 病の 1 例 (印刷中)

c. 総説

- 1) 三井隆男, 野村恭一:
Guillain-Barre 症候群, EBM に基づく臨床データブック. 臨床医 27 (増加号):1610-1617, 2001
- 2) 濱口勝彦, 斎藤豊和, 桑原 聡, 野村恭一:ギラン・バレー症候群 臨床 up to date 1. ギラン・バレー症候群の診療を再考する Prog Med 21:87-94, 2001
- 3)大貫 学, 野村恭一、大野良三: γ -globulin と AIDP・CIDP. 臨床成人病 31: 1 4 7 1-1 4 7 4, 2001
- 4)濱口勝彦、松尾秀徳、野村恭一: ギラン・バレー症候群 臨床 up to date3 GBS の治療方針を提案する免疫グロブリン vs 血漿交換. Prog Med 22:1249-1256、2002
- 5)斎藤豊和、野村恭一: ギラン・バレー症候群 臨床 up to date 4. GBS の治療困難例および特殊例に対処する. Prog Med 22:2395-2402、2002
- 6)野村恭一: 自己反応性の抗大脳基底核抗体と大脳基底核病変を有するレンサ球菌感染後 ADEM. Brain & Nerve 12:13-14, 2003

2. 学会発表

- a. 国際学会 なし
- b. 国内学会

- 1)野村恭一, 三井隆男, 高濱美里, 高砂子由佳子, 滝澤功一, 柴木謙治, 富岳 亮, 大貫 学, 大野良三: 平成 13 年度班会議 免疫性神経疾患に対する調査研究班. 寛解再発性多発性硬化症に対する免疫吸着療

法. 2/5-6、2002

- 2) 大貫 学, 野村恭一, 滝澤功一, 大野良三, 島津邦男, 濱口勝彦, CCA Bernard: 第 14 回日本神経免疫学会 ONO-2506 の経口投与は慢性再発性実験的自己免疫性脳脊髄炎 (CR-EAE) の再発を予防する. 2/7-82002
- 3) 三井隆男, 野村恭一、前原貴子、高濱美里、高砂子由佳子、滝澤功一、大貫 学, 富岳 亮, 島津邦男: Guillain-Barre 症候群の臨床的検討. 第 43 回日本神経学会総会 (札幌) 5/29-31 2002
- 4) 高砂子由佳子、高濱美里、野村恭一、木沢英樹、柴木謙治, 木下俊介、富岳 亮, 大野良三、島津邦男: 脳梗塞急性期から慢性期にかけての白血球・血管内皮接着分子の変動とその役割. 第 43 回日本神経学会総会 (札幌) 5/29-31 2002
- 5) 中島洋平、糸川かおり、中里良彦、山元敏正、野村恭一、島津邦男: Acute quadriplegic myopathy の 1 例. 第 20 回日本神経治療学会 (金沢). 6/13-14 2002
- 6) 滝澤功一、名古屋春満、三井隆男、中里良彦、野村恭一、島津邦男: メガパルス療法が著効した頸髄炎の 2 例. 第 20 回日本神経治療学会 (金沢) 6/13-14 2002
- 7) 野村恭一、高濱美里、武井和夫、島津邦男: 後頸部痛、片麻痺、呼吸困難で発症し、経過中に四肢麻痺、脳幹症候を認めた 1 例. 第 16 回 埼玉脊椎・脊髄病研究会 (大宮) 7/28 2002
- 8) 三井隆男、野村恭一、島津邦男: 病初期に一過性の中枢神経運動伝導時間の延長を認めギラン・バレー症候群の 1 例. 第 13 回日本末梢神経学会 (浜松) 9/21 2002

9) 滝澤功一、三井隆男、野村恭一、島津邦男、大久保雄彦、村上三郎、平山廉三：皮膚筋炎の治療経過中にS状結腸癌、甲状腺癌、肺癌の合併を認めた1例。第36回日本老年医学会 関東地方会 9/28 2002

10) 野村恭一、三井隆男、高濱美里、高砂子由佳子、柴木謙次、滝澤功一、大貫 学、富岳 亮：免疫吸着療法は多発性硬化症の免疫異常を調節し再発を抑制する。平成14年度厚生労働科学研究費補助金特定疾患対策研究事業。多発性硬化症に対するインターフェロン療法の研究班。12/17 2002

11) 野村恭一、大島裕紀、三井隆男、大熊 彩、糸川かおり、木下俊介、富岳 亮、島津邦男：IVIg治療抵抗性となったCIDPに対してタクロリムスが有効であった1例。第2回重症筋無力症とプログラフ講演会 1/11 2003

12) 野村恭一、木下俊介、富岳 亮、大島裕紀、滝澤功一、高砂子由佳子、高濱美里、三井隆男、島津邦男、大貫 学：多発性硬化症の非活動期における末梢血ケモカインレセプター CCR5, CCR3.平成14年度免疫性神経疾患に関する調査研究班 班会議 1/28-29 2003

c. 招待講演

1) 野村恭一：神経・筋疾患の電気生理学的検査。2002 全日本鍼灸学会 埼玉地方会 大宮ソニック 3/3 2002

2) 野村恭一：ギラン・バレー症候群の診療 Update 日本小児科学会総会（仙台）ランチョンセミナー 6/27 2002

3) 野村恭一：アフェレシスによる神経疾患の制御：多発性硬化症に

対する免疫吸着療法。第22回日本アフェレシス学会学術大会（札幌）6/14-16 2002

4) 野村恭一：アフェレシスによる体外免疫調節。免疫吸着療法は多発性硬化症の再発を抑制する。第40回日本人工臓器学会大会（札幌）10/4 2002

5) 野村恭一：免疫吸着療法は多発性硬化症の再発を抑制する。第4回北関東免疫フォーラム（大宮）2/21 2003

H. 知的所有権

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

多発性硬化症における脳萎縮

分担研究者：太田宏平^{1, 3}

共同研究者：朴 千仙²、大原久仁子²、大橋高志²、清水優子²、小野由子³、
岩田 誠²

所属： 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

研究要旨 多発性硬化症（MS）における脳萎縮を把握するために、その評価法、脳萎縮の程度や臨床症状との関連について検討した。MS患者と患者対照の脳MRI axial像で脳梁膨大部と脳梁膝をみとめるT1強調画像を検索対象とした。この断面で大脳実質面積、側脳室面積、大脳横径、側脳室横径、脳梁膨大部の厚さを測定した。MS群の大脳実質面積、側脳室面積、大脳横径、側脳室横径、脳梁膨大部の各測定値は患者対照のそれぞれの値に比べ有意差がみとめられ、MSにおける脳萎縮が確認された。大脳実質面積、側脳室面積と各症例の重症度とは相関がみられ、特に二次進行型の患者に脳萎縮が強くみられ、客観的指標として有用であった。

A. 研究目的

多発性硬化症（MS）の診療ではMRIの重要性は広く認識されているが、脳萎縮の存在もMRIでの知見を重ねるにつれ明らかとなっている。この研究では本邦でのMSの脳萎縮の実態を明らかにするために、MRIによる脳萎縮の評価法について検討し、ついで臨床所見との対比を試みた。

B. 対象と方法

対象はMS 22例（年齢28から55歳、平均37.1歳、平均EDSSは4.0）と年齢を一致させた中枢神経病変をみとめない患者対照14例（年齢20から49歳、平均36.6歳）。各対象の脳MRI axial像で脳梁膨大部と脳

梁膝をみとめるT1強調画像を検索対象とした。この断面で大脳実質面積（A）、側脳室面積（B）、B/A比、大脳横径（C）、側脳室横径（D）、D/C比、脳梁膨大部の厚さをNIH Image ver.1.62を用いて測定した。統計処理はStat View J4.02を用いて解析した。一部の患者では経年変化を観察した。さらに脳萎縮の程度と病系、患者の障害度、MR spectroscopy（MRS）によるN-acetylaspartate（NAA）/ creatinine（Cr）比などと比較検討した。

C. 結果

「結果」MS群の大脳実質面積は $128.9 \pm 10.9 \text{ cm}^2$ 、側脳室面積は $17.7 \pm 5.3 \text{ cm}^2$ 、

B/A 比は 0.14 ± 0.05 であった。また、大脳横径は 12.1 ± 0.7 cm、側脳室横径は 2.6 ± 0.5 cm、D/C 比は 0.22 ± 0.04 、脳梁膨大部の厚さは 0.8 ± 0.1 cm であり、各測定値は患者対照のそれぞれの値に比べ有意差がみとめられ、MS における脳萎縮が確認された（表 1、表 2、図 1）。大脳実質面積、側脳室面積、B/A 比と各症例の重症度とは相関がみられ、特に二次進行型で障害度（EDSS score）の高い患者に脳萎縮の強い傾向がみられた（図 1）。側脳室面積/大脳実質面積比が 0.14 より大の時を脳萎縮（+）と定義すると脳萎縮（+）患者では MRS での NAA/Cr 比は 2.0 を下回る場合が多くみられた（図 2）。図 3 に経時的に脳萎縮を観察した MS 患者（43 歳、女性：現在の EDSS は 8.0）の MRI 像と大脳実質面積、側脳室面積、B/A 比の結果を示す。発症初期（1993 年 1 月 19 日）の MRI ではわずかに側脳室の拡大が疑われたが、測定結果ではそれぞれの値は正常範囲内に収まっている。しかし、臨床症状は進行し発症数年後には車椅子生活となり、明らかな再発寛解を示さず、二次進行型に移行した。症状悪化に平行して 4 年後（1997 年 1 月 24 日）の MRI では脳萎縮は明らかにみとめられ、1999 年 2 月 8 日の MRI まで B/A 比は直線的に上昇を示し、脳萎縮は進行した。

D. 考察

MS の診断には MRI の所見が重要であり、診断のみならず、病型分類、活動性や治療効果の判定など、臨床に直結した多くの知見を明らかにするうえで大きな役割を果たしている。1990 年代後期には高磁場の MRI 装置や解析機器の進歩により MRI 画像上での定量的評価や MRS の臨床応用が可能となり、MS におけるこれら諸検査の有用性を検討されている。MS の脳萎縮に関す

る知見も徐々に集積され、脱髄や炎症修復時の組織硬化、軸索障害を含む神経機能不全や神経萎縮の結果、脳萎縮がみられると考えられている¹⁾⁻⁴⁾。また、MRS の研究では、MS 急性期病巣で choline/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⁵⁾⁻⁸⁾。本研究では MS では明らかに脳萎縮はみとめられ、特に EDSS score の高い進行例に多く、同時に脳萎縮例に神経細胞機能を反映する NAA/Cr 低下例が多いことを考えあわせると、MS の後期には自己免疫学的な炎症や脱髄とは異なる病態で病気が進展することが示唆された。また、MRI による脳萎縮の検索はより客観的評価法として臨床応用が可能であると考えられた。

E. 結論

MRI による脳萎縮の評価は臨床的な指標の一つとなりえる。

G. 参考文献

- 1) Trapp BD, Peterson J et al: Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *NEJM* 338: 278-85, 1998
- 2) Dastidar P, Heinonen T et al: Volumes of brain atrophy and plaques correlated with neurological disability in secondary progressive multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 165: 36-42, 1999
- 3) Losseff NA, Wang L et al: Progressive cerebral atrophy in multiple sclerosis: a serial MRI study. *Brain* 119: 2009-19, 1996
- 4) Matthews PM, Piore E, Narayanan S et al: Assessment of lesion pathology in multiple sclerosis using quantitative MRI morphometry and magnetic resonance spectroscopy.

Brain 119: 715-22, 1996

- 5) Rovaris M, Filippi M: The value of new magnetic resonance techniques in multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* 13: 249-54, 2000
- 6) Arnold DL, Wolinsky JS et al: The use of magnetic resonance spectroscopy in the evaluation of the natural history of multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 94 (supple 1): S94-S101, 1998
- 7) Davie CA, Hawkins CP et al: Serial proton magnetic resonance spectroscopy in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 117: 49-58, 1994
- 8) Bitsch A, Bruhn H et al. Inflammatory CNS demyelination: Histopathologic correlation with In vivo quantitative proton MR spectroscopy. *AJNR* 20: 1619-1627, 1999

F. 研究発表

- 1) 太田宏平他：多発性硬化症の脳萎縮. 第43回日本神経学会総会、札幌、2002年5月
- 2) 朴千仙他：多発性硬化症に対するMRSの検討. 第43回日本神経学会総会、札幌、2002年5月
- 3) 清水優子他：IFN β -1bによる多発性硬化症（MS）患者の免疫調節細胞の変化について. 第43回日本神経学会総会、札幌、2002年5月
- 4) 太田宏平：MSへの免疫抑制剤の治療エビデンス. 第1回MSワークショップ、仙台、2002年8月
- 5) 太田宏平：ヘルペス脳炎の再発と遷延. JHIF Workshop 単純ヘルペスウイルス感染症の再発抑制 38-41, 2002
- 6) 太田宏平：Epstein-Barrウイルス抗体と多発性硬化症の発症リスク（訳、解説 -Ascherio A et al: *JAMA*, 286:3083-3088, 2001). *JAMA* 日本語版 9:79-88, 2002
- 7) 太田宏平：神経疾患の総合的診療-多発性硬化症. *毎日ライフ* 4月号: 87-91, 2003

G. 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

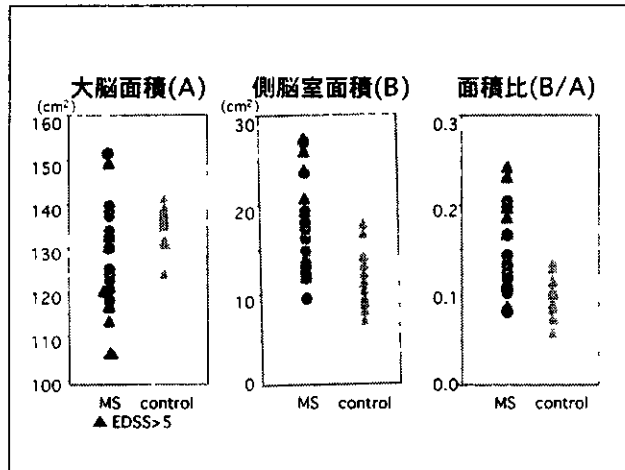


図1 大脳面積と脳室面積

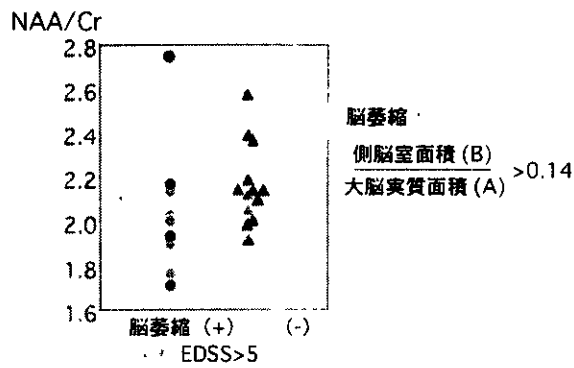


図2 脳萎縮とNAA/Cr

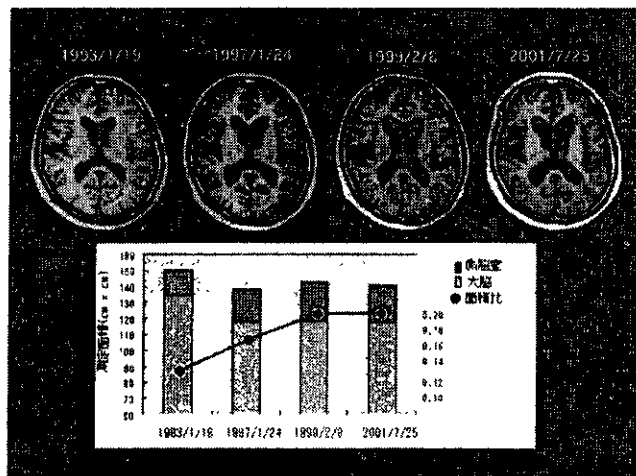


図3 脳萎縮の経時的変動

表1 大脳横径と脳室横径

	大脳横径(cm)	脳室横径(cm)	脳室/大脳横径比
MS	12.1 ±0.7	2.6 ±0.5*	0.22 ±0.04**
対照	12.2 ±0.4	2.1 ±0.5	0.18 ±0.04

*p=0.090 **p=0.0081

表2 大脳面積と脳室面積

	大脳面積(cm ²)	脳室面積(cm ²)	脳室/大脳面積比
MS	128.9±10.9*	17.7±5.3**	0.14 ±0.05***
対照	135.5 ±4.4	12.3±3.1	0.09 ±0.02

*p=0.0414 **p=0.0013 ***p=0.0010

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

培養ヒト脳毛細血管由来内皮細胞に発現する遺伝子の解析

分担研究者 神田 隆

共同研究者 大和田潔 久保寺尚子 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

研究要旨 ヒト脳毛細血管由来内皮細胞(HBMEC)の純粋に近い培養に成功し、その遺伝子発現パターンをケモカイン遺伝子を中心に検討した。対照としてヒト臍帯静脈由来内皮細胞(HUVEC)を用いた。非刺激状態では、CX₃CL1、CXCL10の2者はHUVECには存在せず、HBMECにのみ発現していた。検討した24種中、8種のケモカインにTNF α によるupregulationが観察された。HBMECのケモカイン発現はHUVECのそれと明らかに異なっており、この相違点が中枢神経系の自己免疫疾患の発症・進展に関与している可能性がある。

A. 研究目的

ヒト血液脳関門(BBB, blood-brain barrier)の本体である脳毛細血管内皮細胞における遺伝子発現パターンを、臍帯静脈由来内皮細胞との比較で明らかにする。

B. 研究方法

Cell Culture: ヒト脳毛細血管内皮細胞(HBMEC)は、68歳女性剖検脳(死後14時間)から採取した。可及的無菌的に大脳・小脳皮質を採取し、抗生物質を添加したDMEMで数回洗浄

した後に軟膜を剥離し、細切後Dounce homogenizerを用いてhomogenizeした。比較的大きな血管を孔径230 μ mの無菌ネットで除去した後、dispaseおよびcollagenase-dispaseで処理し、15%デキストラン/DMEM溶液に浮遊させて血管成分(主に内皮細胞塊からなる)を遠沈分離した。洗浄後、内皮細胞塊をI型コラーゲン塗布60mm plastic dish (Biocoat)上に播種し、EBM-2 media (BioWhittaker)を用いて37 $^{\circ}$ C、5%CO₂の条件下で培養を行った。培養10-14日目に純度の高い内

皮細胞コロニーをクローニングし、継代培養に用いた。本実験には培養3代目までのものを用いた。内皮細胞の同定には①抗 von Willebrand 抗原を用いた免疫染色、②DiI-acetylated LDL の uptake の二つを用い、HBMEC の純度はほぼ 98%以上を確保可能であった。ヒト臍帯静脈由来内皮細胞 (HUVEC) は三光純薬から購入したものをを用いた。

DNA microarray: DNA chip は Human 3K CHIP (Takara) を用いた。amplified RNA を鋳型とし、reverse transcriptase により逆転写反応で Cy3, Cy5dUTP をとりこませた。Internal control として lambda polyA RNA を逆転写反応時に等量ずつ添加し、ハイブリダイゼーションには 65°C、14 時間の条件下で Cy3 標識プローブと Cy5 標識プローブを混合して使用した。洗浄後、Affymetrix 428 array scanner を使用し、Cy3, Cy5 各検出波長において、シグナル強度に応じた 3 段階の検出感度で測定を行った。

【結果】 HBMEC には BBB 特異的蛋

白である ATP-binding cassette subfamily B, member 1 (MDR, P-glycoprotein) と glucose transporter 1 (GLUT1) の遺伝子が発現し、HUVEC には全く発現していないことをまず確認した。Table 1 に検索したケモカインのリストとそのメッセージの発現を示す。今回調べ得た 24 種類のケモカインの内、非刺激状態で HBMEC にメッセージが確認できたのは 8 種類、HUVEC では 9 種類であった。非刺激状態で HBMEC に陽性、かつ HUVEC に陰性であるのは CX₃CL1 (fractalkine) と CXCL10 で、CXCL1 (GRO1 oncogene は) 両者とも陽性で HBMEC のシグナル強度が HUVEC に勝っていた。CCL5 (RANTES) および CXCL2 (GRO2 oncogene) は HUVEC のシグナルが HBMEC に勝っていた。CCL7, CCL18, CXCL12 の 3 者は HUVEC にのみきわめて低いシグナルが確認された。

Table 1 Chemokines expressed in non-stimulated HBMEC and HUVEC

CCL1 (I-309)	null	CCL7 (MCP-3)	U
CCL2 (MCP-1)	B=U	CCL11 (eotaxin)	null
CCL3 (Mip-1a)	null	CCL13 (MCP-4)	null
CCL4 (Mip-1b)	null	CCL16 (HCC-4/LEC)	null
CCL5 (RANTES)	B<U	CCL18 (PARC/DC-CK1/MIP-4/AMAC-1)	U

CCL19 (ELC/MIP-3b/exodus-3/CKb11)	null	CXCL8 (IL8)	B=U
CCL20 (LARC/MIP-3a/Exodus)	null	CXCL9 (monokine induced by interferon)	null
CCL21 (SLC/6CKine/exodus-2/TCA-4)	null	CXCL10	B
CCL25 (TECK)	null	CXCL12 (stromal-derived factor)	U
CXCL1 (GRO1 oncogene)	B>U	CXCL13 (BLC/BCA-1)	null
CXCL2 (GRO2 oncogene)	B<U	CX ₃ CL1 (fractalkine)	B
CXCL4 (PF4)	null	EMAP II	B=U

null, not expressed; B, expressed in HBMEC; U, expressed in HUVEC

D. 考察

血管内皮細胞は全身臓器にあまねく存在する重要な細胞であるが、臓器毎の character の違いが近年次々に明らかになっており、BBB の細胞学的理解には BBB を構成する内皮細胞の分析が必須である。発表者のグループは長らくウシ脳毛細血管由来内皮細胞を用いた機能解析を行っていたが、種差の問題や使用できる抗体、DNA プローブの限界から、ヒト細胞培養法の確立をこの数年間目指していた。今回、メッセージの解析が可能なレベルの純度の高いヒト脳毛細血管由来内皮細胞の培養に成功し、上記の結果を得た。培養 BMEC には HUVEC に存在しない BBB 特異蛋白である P-glycoprotein, GLUT1 のメッセージを確認し、本実験で用いた HBMEC が BBB を構成する毛細血管内皮細胞由来のものであることが明らかとなった。今回の解析で明らかになったケモカインの発現パターンのみをとってみても、HBMEC と全身諸臓器の内皮細胞の代表としての

HUVEC とでは大きな差異があり、この違いが BBB を介する免疫現象を制御している可能性が考えられる。現在、HBMEC に対して TNF α 、および MS 治療薬として広く用いられている interferon β 1b を添加し、同刺激下におけるメッセージ発現の解析が進行中である。

E. 結語

①ヒト脳毛細血管由来内皮細胞の純度の高い培養に成功し、非刺激状態におけるケモカインを中心としたメッセージ発現を DNA array を用いて分析した。②HUVEC との比較で、明らかな発現パターンの相違を確認した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

論文発表

a. 雑誌

1) Hiroki Sasaguri, Nobuyuki Sodeyama,

Yuki Maejima, Takashi Kanda, Hidehiro Mizusawa: Slowly progressive Foix-Chavany-Marie syndrome associated with chronic herpes simplex encephalitis. J Neurol Neurosurg Psychiatry 73: 203-204, 2002.

2) 藤本陽子、藤本 学、吉武聡子、大河内仁志、山脇正永、神田 隆、水澤英洋：CD83 によるミクログリア活性化の制御. 神経免疫学 10: 243-249, 2002.

3) Takashi Kanda, Masanaga Yamawaki, Hidehiro Mizusawa. Sera from Guillain-Barre patients enhance leakage in blood-nerve barrier model. Neurology 60: 301-306, 2003.

b. 単行本

1) 神田 隆：神経系用薬. 奈良信雄編 コメディカルの治療薬マニュアル. 中外医学社、pp368-398, 2002.

2) 神田 隆：生検、末梢神経系の正常構造、単神経障害、神経叢障害. 朝倉書店 杉本恒明、小俣政男、水野美邦編、内科学第 8 版、2003, in press.

c. 総説

1) 神田 隆：神経精神疾患治療の EBM. 慢性炎症性脱髄性多発根ニューロパチー. 脳の科学 24: 289-295, 2002.

2) Takashi Kanda: Editorial: Chronic hepatitis C infection and peripheral

neuropathy; is mixed cryoglobulinemia really important? Intern Med 42, 2003 in press.

学会発表

国際学会

1) Takashi Kanda, Yukiyo Numata, Masanaga Yamawaki, Hidehiro Mizusawa: Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: decreased claudin-5 and relocated ZO-1. Neuroscience 2002, Orlando, USA

国内学会

1) 神田 隆、大和田潔、入岡 隆、岡本尚子、山脇正永、水澤英洋：ヒト末梢神経神経内膜由来内皮細胞培養系の確立. 第 43 回日本神経学会総会、札幌

2) 神田 隆、沼田幸代、水澤英洋：炎症性末梢神経障害でのバリアー関連蛋白の変化：生検腓腹神経を用いた免疫組織化学的検討. 第 43 回日本神経病理学会総会学術研究会、東京

3) 横手裕明、日野太郎、秋山純子、石橋 哲、石川欽也、神田 隆、水澤英洋、服部亮、川良徳広、磯部光章：Becker 型筋ジストロフィーにおける心筋生検の検討. 第 43 回日本神経学会総会、札幌

4) 岡本尚子、大和田潔、有賀敏夫、笠間健司、神田 隆、水澤英洋：