

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*

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．

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は血漿分離器はP506（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 ± 243.4 ml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は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サブセットに分けて検討した．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 をそれぞれ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．

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（ $n=6$ ）となかった（図1， $p < 0.05$ ）．1例は定期的IVIg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細胞（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細胞（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).

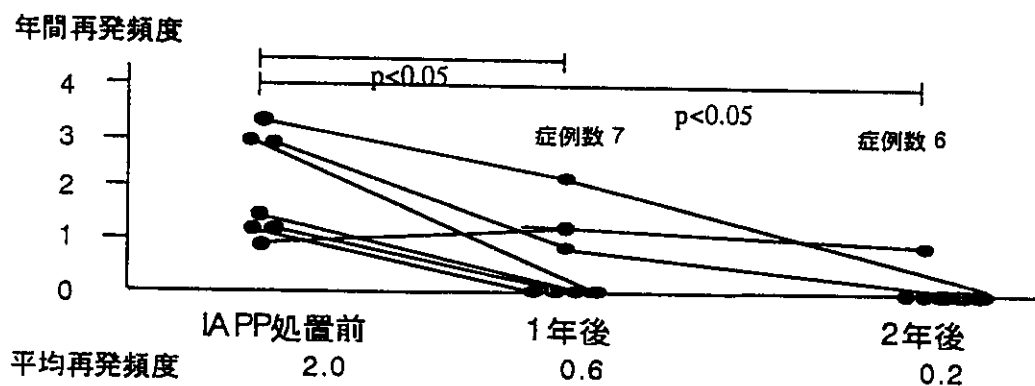


図1. IAPP処置前・1, 2年後の年間平均再発頻度

表1. IAPP処置前後における末梢血リンパ球サブセットの変動

CD	No. 主な分布	検体数	IAPP前	IAPP後	p値
CD4+ CD25+	IL-2R+ 活性化CD4細胞	14	19.4±5.0	14.2±4.8	$p < 0.001$
CD4+ CD45RA+	naive or suppressor-inducer	14	33.7±9.8	26.7±10.0	ns
CD4+ CD29+	helper-inducer	14	21.2±6.0	16.2±4.7	$p < 0.001$
CD8+ CD25+	IL-2R+ 活性化CD8細胞	12	2.4±0.6	1.2±0.5	ns
CD8+ CD11b dull	suppressor-effector	11	3.7±2.2	5.8±5.4	ns
CD8+ CD11b bright	cytotoxic-effector/NK	12	6.2±5.2	7.6±6.6	ns
CD3- CD16/56+	NK	13	6.7±2.6	10.2±5.1	$p < 0.005$
CD3+ CD16/56+	CTL	14	6.8±6.5	8.5±7.4	ns

表2. IAPP処置前後における血清サイトカインの変動

サイトカイン	n=8	IAPP前	IAPP後	p値
Interleukin-2 (IL-2)	U/ml	0.8 ± 0	0.8 ± 0	NS
Interferon- γ (IFN- γ)	IU/ml	0.10 ± 0	0.13 ± 0.1	NS
Tumor necrosis factor α (TNF- α)	pg/ml	5.0 ± 0	5.0 ± 0	NS
Interleukin -4 (IL-4) * n=7	pg/ml	7.0 ± 4.3	3.3 ± 1.3	0.049
Interleukin -10 (IL-10)	pg/ml	2.0 ± 0	2.3 ± 1.0	NS
Transforming growth factor - β	ng/ml	42.2 ± 13.2	35.7 ± 10.5	0.074

平成 14 年度「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等の解析に関する研究」

班会議抄録用紙

演題：

日本人多発性硬化症における遺伝子多型解析

所属・氏名：

新野 正明¹，菊地 誠志¹，深澤 俊行²

¹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分野

²北祐会神経内科病院

「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。

「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 例および健常対照者 103 例である。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。

「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、臨床像、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。

「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。

「結論」

MS の発症や臨床症状に HSP 70 遺伝子多型が関係している可能性は低いと考えられる。

平成14年度

「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等の解析に関する研究」

演題：多発性硬化症における脳萎縮

所属・氏名：1 東京理科大学理学部、2 東京女子医大神経内科、3 同神経放射線科
太田宏平^{1,2}、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

「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。

「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StatView 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、MRS所見などと比較検討した。

「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 $12.1 \pm 0.7 \text{ cm}$ 、側脳室横径は $2.6 \pm 0.5 \text{ cm}$ 、D/C比は 0.22 ± 0.04 、脳梁膨大部の厚さは $0.8 \pm 0.1 \text{ cm}$ 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。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の高い患者に脳萎縮の強い傾向がみられた。同様に脳萎縮がみられる時にはNAA/Crも低下していた。図に経時的に脳萎縮を観察したMS患者のMRI像と測定結果を示す。

「考察」MSの脳萎縮は脱髄や炎症による神経組織の破壊や脱落の結果と考えられている。また、脳萎縮は臨床で用いられるaxial像で充分評価することができ、健常対象に比べ明らかであった。特に大脳実質面積、側脳室面積は障害度などに関連性がみとめられる場合もあり、客観的指標の一つとして臨床応用が可能であると考えられた。しかし、脳梁膨大部の厚さはaxial像では撮影画像によるばらつきが多

く指標としては不適切であった。

「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。

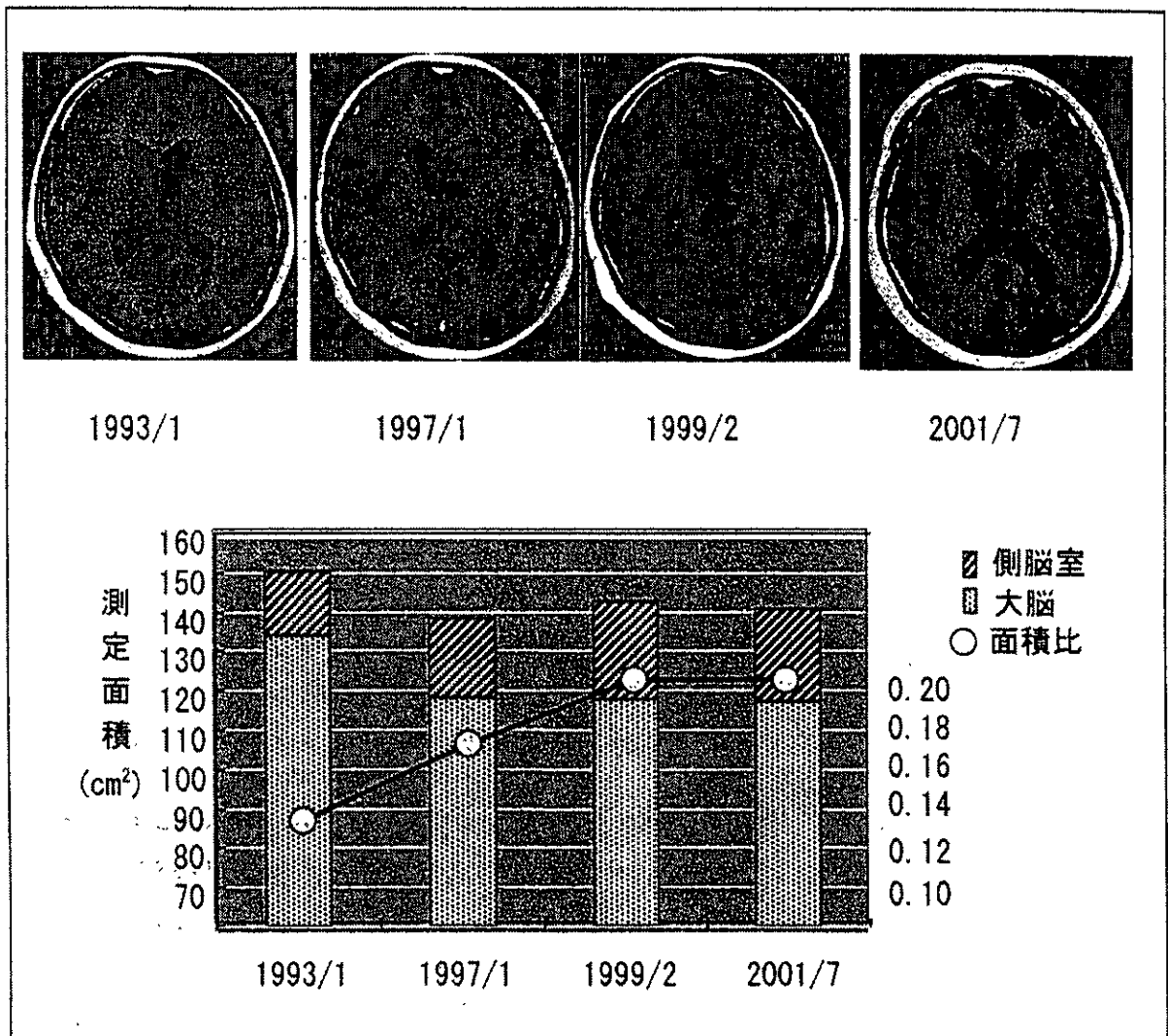


図 脳萎縮の経時的変化

平成 14 年度

「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等の解析に関する研究」
班会議抄録用紙

演題：「ベタフェロン治療導入のクリニカルパスとバリエーション管理」

所属・氏名： (班員) 川井充
(共同研究者) 山本敏之
(共同演者) 中村治雅 村井麻衣子 菊池猛 尾方克久
小川雅文 藤原由紀* 山村隆**

所属 国立精神・神経センター武蔵病院 神経内科
* 同 薬剤部
** 同 神経研究所 免疫研究部

【目的】 クリニカルパスは「医療チームが共同で作りに上げた、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、チーム医療の推進、患者満足度の向上、医療の標準化のために普及しはじめている。われわれは多発性硬化症 (MS) のインターフェロン β (INF- β) 自己注射治療導入のためのクリニカルパスを作成した。クリニカルパスの妥当性とバリエーションについて検討した。

【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。平均年齢は 37.5 歳であった。

【方法】 医師、看護師、薬剤師で構成されるチームによりクリニカルパスを作成した (表)。これに準じ、INF- β 導入が可能であった対象を評価する。また、入院期間が 20 日以上に延長した対象、INF- β 自己注射治療が不能であった対象をバリエーションとして評価する。

【結果】 INF- β の自己注射が可能であったのは 25 人で、入院期間は 15 日間が多かった。INF- β 導入後の有害事象は発熱が 22 人に現われた。多くは初回の皮下注射から 2-3 時間後に出現した。非ステロイド性消炎鎮痛剤 (NSAID) の内服により、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。退院時まで発熱が続いた

のは9人であった。関節痛や背部痛、MS症状の増悪は5人に現れた。これらの有害事象のため、退院後もNSAIDの内服が必要であったのは8人であった。血液検査では開始後1週間の検査で、白血球減少が3人、血小板減少が2人であった。しかし、退院前の血液検査では治療継続可能と判断された。治療開始になった対象のうち、入院日数が20日間を超えたバリエーションは、MSの再発治療後にINF-β導入した2人を含む5人であった。予定を超過した原因はINF-β導入後の再発治療が1人、入院時から肝機能障害が1人、関節痛や注射部位の皮膚の痛みと硬結のためが1人であった。また、INF-βの自己注射の導入不能であったバリエーションは5人であった。手技の習得困難が3人で、うち1人は家族が注射手技を覚え治療を継続した。他は心理検査で抑うつが強かった1人、プリックテストが陽性の1人であった。

【考察】 INF-β注射の有害事象には発熱が多いが、注射7回までに半数以上が消失した。また、血液検査の異常は開始2週間後には改善する事があった。これらの有害事象の管理のために2週間(注射7回)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。

【結論】 INF-β治療導入には、クリニカルパスが有効である。

	1日目	2日目	3~6日目	7日目	8~13日目	14~16日目
目標	治療に対する理解	安全な治療の導入	手技の習得 薬物の理解	有害事象の確認	手技の実践 管理の習得	日常生活への導入
治療・ 診察	インフォームド コンセント 診察 薬の処方	治療開始の 決定 皮下注 有害事象の モニタリング	有害事象の 確認	神経所見の 変化をcheck	有害事象に 対する治療 薬を決定	退院の決定 有害事象出 現時間から 自宅の注射 時間を決定
検査	採血 胸部X-p 心電図 心理検査	Prick test Vital sign	Vital sign	採血 Vital sign	Vital sign	採血 Vital sign
看護部	入院中の予 定の説明	有害事象の モニタリング	ビデオ学習 手技の教育		自己注射の 指導と評価	自己注射の 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 薬の説明		バイアルの 保管と破棄 法の指導	薬の確認 院外薬局へ 依頼

(表) 当院での INF-β 導入のクリニカルパス

平成 14 年度

「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等の解析に関する研究」

班会議抄録用紙

演題： 再発寛解型多発性硬化症患者末梢血リンパ球における IFN β -responsive genes (IRG) :
DNA microarray による解析

所属・氏名： 国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部
佐藤 準一、古池 史子、中西 恵美、三枝 隆博、山村 隆

【目的】 インターフェロンベータ(IFN β)は多発性硬化症(MS)で再発・進行を抑制するが、薬理学的効果発現機序は解明されていない。本研究では IFN β 治療前後で MS 患者末梢血リンパ球における遺伝子発現を包括的に解析した。

【方法】 再発寛解型 MS13 例で IFN β (Betaferon 800 MIU, sc, on alternate days)投与前(Pre)・投与後 3 カ月(3 mo)・6 カ月(6 mo)時に、MACS で末梢血リンパ球 CD3⁺ T 細胞, CD3⁺ non-T 細胞を分離、各 total RNA を抽出・増幅後に、1,263 cDNA microarray (Hitachi)を用いて遺伝子発現プロファイルを定量的に解析し、3 mo vs Pre, 6 mo vs Pre において Cyber-T で有意な変動を示した遺伝子群を同定した。

【結果】 IFN β 投与後 T 細胞で 13 遺伝子が発現変動 \uparrow (IRF7, ISG15, IFI56, IFI6-16, IFI60, IFI30, ATF3, TLR5), \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。ISG15, IFI56, IFI6-16, IFI27, TSC22, SULT1C1 は 3-6 ヶ月持続的上昇を認めた。Th2 cytokine である IL-4, IL-10 は T 細胞で発現低下傾向、Th1-related chemokine receptor CCR5 は T, non-T 細胞で発現上昇傾向を認めたが、統計学的有意差は得られなかった。

【考察】 MS 患者末梢血リンパ球で 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 の同定されている既知の IRG で、5 遺伝子(IFI30, IFI27, TSC22, ATF3, SLC7A1)では IFN 反応性が報告されている。本研究で新たに TLR5, SULT1C1, RPC39, RAB11A, IL-3, AKAP4, GNA13 の IFN β による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。

【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となる可能性がある。

「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等の解析に関する研究」班

主任研究者 山村 隆

国立精神・神経センター神経研究所

〒187-8502 東京都小平市小川東町 4-1-1

TEL : 042-341-2711 (内線 5241)

FAX : 042-346-1753

VI. 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 疾病研究第六部	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
	佐藤準一	国立精神・神経センター神経研究所 免疫研究部	室長
	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 専攻神経病体学講座神経内科学	講師
	横山和正	順天堂大学脳神経内科	助手
	野村恭一	埼玉医科大学神経内科	助教授
	太田宏平	東京理科大学理学部	教授
	神田 隆	東京医科歯科大学大学院脳神経機能 病態学	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	研究生
	深澤俊行	北佑会神経内科病院	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5241） FAX：042-346-1753	部長