

## 急性散在性脳脊髄炎における blood-brain-barrier 機能

分担研究者 古川 漸<sup>1)</sup>

共同研究者 市山高志<sup>1)</sup>、伊住浩史<sup>1)</sup>、末永尚子<sup>1)</sup>、梶本まどか<sup>1)</sup>

### 研究要旨

急性散在性脳脊髄炎 (acute disseminated encephalomyelitis: ADEM) の炎症病態に対する脳血管関門機能の関与を血清 matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)、tissue inhibitors of metalloproteinases 1 (TIMP-1) および造影 MRI から解析した。対象は 1997 年 6 月～2005 年 2 月に当科に入院した ADEM14 例。男児 8 例、女児 6 例、年齢 2～15 歳 (中央値 5.5 歳)。方法は急性期、回復期の血清 MMP-9 および TIMP-1 値を ELISA 法で測定した。また頭部造影 MRI を撮像し、急性期造影 MRI で enhanced lesion を有する Gd(+) 群 (7 例) と enhanced lesion を有しない Gd(-) 群 (7 例) に分け、血清 MMP-9、TIMP-1 値との関係を解析した。血清 MMP-9 値は両群とも急性期に上昇し、回復期に正常化した。血清 TIMP-1 値は Gd(+) 群では急性期は正常で回復期に上昇したが、Gd(-) 群では急性期に上昇し、回復期に正常化した。MMP-9 は脳の血管基底膜の主要構成成分であるコラーゲン IV を分解する。一方、TIMP-1 は MMP-9 活性を阻害する。ADEM 急性期での血清 MMP-9 高値は BBB 機能の低下を示唆した。血清 TIMP-1 値の動態は、造影 MRI 所見により異なった。Gd(-) 群において MRI 撮像時での TIMP-1 高値は、1) 病変のピークが MRI 撮像時以前だった、2) TIMP-1 の反応が迅速で、Gd(+) 病変を来たさなかつたことなどが推測された。

### 研究目的

急性散在性脳脊髄炎 (acute disseminated encephalomyelitis: ADEM) の炎症病態に対する脳血管関門機能の関与を血清 matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) および tissue inhibitors of metalloproteinases 1 (TIMP-1) の面から解析した。

### 研究方法

対象は 1997 年 6 月～2005 年 2 月に当科に入院した ADEM14 例。男児 8 例、女児 6 例、年齢 2～15 歳 (中央値 5.5 歳)。正常コントロール 33 例。方法は保存凍結血清を用いて ELISA キットにて MMP-9、TIMP-1 値を測定した。また頭部造影 MRI を撮像し、急性期造影 MRI で enhanced lesion を有する Gd(+) 群 (7 例) と enhanced lesion を有しない Gd(-) 群 (7 例) に分け、血清 MMP-9、TIMP-1 値との関係を解析した。

---

1) 山口大学医学部小児科

(倫理面への配慮)

本研究は保存血清を用いた実験であり、個人名等の個人情報保護され、公表はされないことより倫理面への影響は皆無である。

### 研究結果

ADEM 全 14 例の急性期血清 MMP-9 値は回復期およびコントロール群に比し、有意に高値だった(図 1)。ADEM 全 14 例の急性期血清 TIMP-1 値はコントロール群に比し、有意に高値だった(図 1)。急性期造影 MRI における Gd(+)群と Gd(-)群での検討では、血清 MMP-9 値は両群とも急性期に上昇し、回復期に正常化した(図 2)。血清 TIMP-1 値は Gd(+)群では急性期は正常で回復期に上昇したが、Gd(-)群では急性期に上昇し、回復期に正常化した(図 2)。

### 考察

MMP-9 は脳の血管基底膜の主要構成成分であるコラーゲン IV を分解する。一方、TIMP-1 は MMP-9 活性を阻害する。従って脳血管関門に対し、MMP-9 は攻撃因子、TIMP-1 は防御因子である。ADEM 急性期での血清 MMP-9 高値は BBB 機能の低下を示唆した。血清 TIMP-1 値の動態は、造影 MRI 所見により異なっていた。Gd(-)群において MRI 撮像時での TIMP-1 高値は、1) 病変のピークが MRI 撮像時以前だった、2) TIMP-1 の反応が迅速で、Gd(+)病変を来たさなかつたことなどが推測された。ADEM では MMP-9 と TIMP-1 のアンバランスが炎症病態形成に補助的に関与することが示唆された。

### 結論

ADEM の炎症病態過程において MMP-9、TIMP-1 の関与が示唆された。

### 文献

1) Ichiyama T, Kajimoto M, Suenaga N, Maeba S, Matsubara T, Furukawa S. Serum levels of matrix metalloproteinase-9 and its tissue inhibitor (TIMP-1) in acute disseminated encephalomyelitis. J Neuroimmunol in press

### 健康危険情報

なし

### 知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし

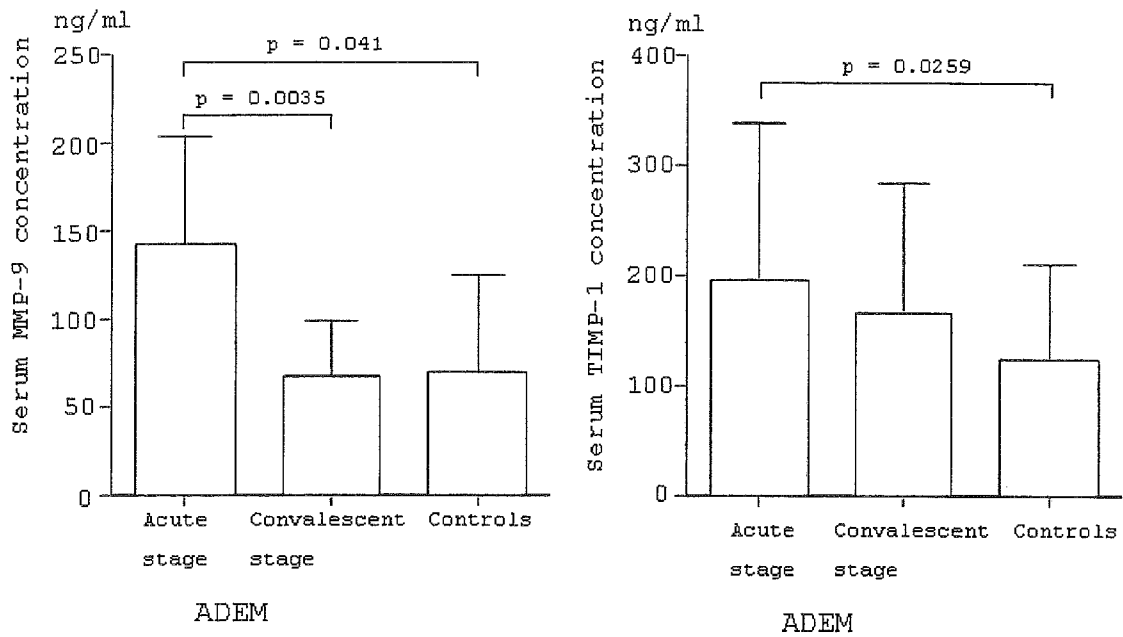


図 1. ADEMにおける血清MMP-9およびTIMP-1

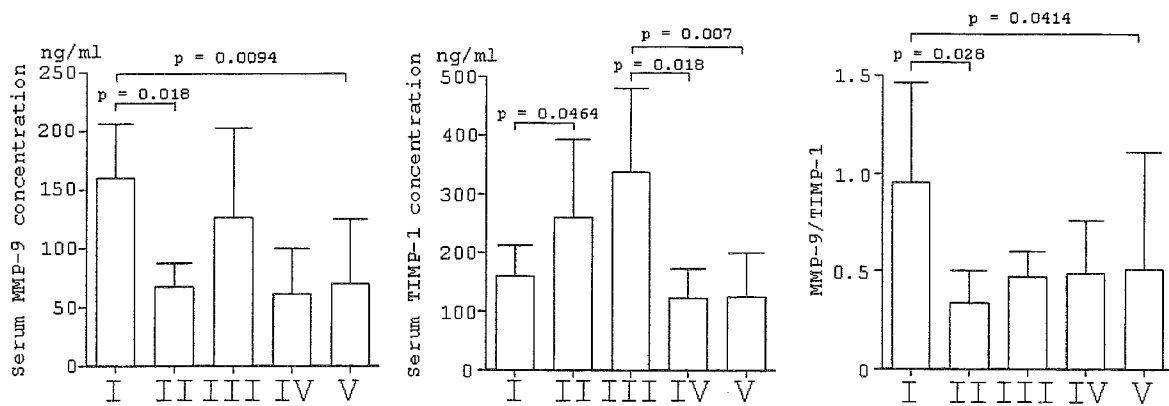


図 2. ADEMにおける血清MMP-9、TIMP-1およびMMP-9/TIMP-1比

I, Gd(+)病変を有する患者の急性期; II, Gd(+)病変を有する患者の回復期; III, Gd(-)病変を有する患者の急性期; IV, Gd(-)病変を有する患者の回復期; V, コントロール

# 中枢神経系の自己免疫性炎症性脱髄における

## Midkine の役割について-第二報-

分担研究者 錫村明生<sup>1)</sup>

共同研究者 竹内英之<sup>1)</sup>, 王金岩<sup>1)</sup>, 金世杰<sup>1)</sup>, 川ノ口潤<sup>1)</sup>, 張桂琴<sup>1)</sup>,  
久能玲子<sup>1)</sup>, 藺部佳史<sup>1)</sup>, 八幡泉<sup>1)</sup>, 水野哲也<sup>1)</sup>  
村松壽子<sup>2)</sup>, 村松喬<sup>2)</sup>

### 研究要旨

Midkine, (MK) は発癌、炎症、修復の過程で強く発現され、癌の進行、炎症の進展、組織修復に関与している成長因子であり、最近、MK 抑制による炎症性病態の抑制効果が報告されている。今回我々は、神経系の自己免疫性炎症における MK の役割を明らかにするため、MK ノックアウト (MK<sup>-/-</sup>) マウスと野生型 (WT) マウスを用いて実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を誘導し、その差異を検討した。MK<sup>-/-</sup>マウス EAE 群では、臨床症状は顕著に抑制され、MK 投与により抑制効果は消失した。MK<sup>-/-</sup>マウス EAE 群では、中枢神経系の炎症細胞浸潤が減少し、末梢リンパ節の CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>制御性 T 細胞 (Treg) が有意に増加しており、Th1 優位の自己免疫反応が抑えられていた。また、MK は容量依存的に Treg の活性化を抑制した。以上から、MK 抑制が Treg の活性化を介した多発性硬化症の新たな治療戦略となりうる可能性が示唆された。

### 研究目的

Midkine (MK) は塩基性アミノ酸とシステインに富む分子量 13kD のヘパリン結合性成長因子であり、発癌、炎症、修復の過程で強く発現され、細胞の生存や移動を促進し、癌の進行、炎症の進展、傷害を受けた組織の修復に深く関与していると考えられている<sup>1)</sup>。中枢神経系ではグリア細胞が産生する MK が神経細胞に作用し、発生、分化に重要な役割を果たすことが明らかとなっている。また最近、MK 抑制による炎症性病態の抑制効果が報告されている<sup>2, 3)</sup>。MK はマクロファージや好中球などの炎症性細胞の遊走を促進することから、中枢神経系

の炎症性病態にも関与すると想定されるが、詳細は不明である。今回、我々は、神経系の自己免疫性炎症における MK の役割を明らかにするため、MK<sup>-/-</sup>および WT マウスを用いて EAE を誘導し、その差異について検討した。

### 研究方法

すべての動物実験は、動物愛護の観点より、名古屋大学動物実験委員会の指針に則して行われた。MK<sup>-/-</sup>あるいは WT の C57BL/6 マウスに MOG<sub>35-55</sub> ペプチド 200μg を完全フロイドアジュバントと共に皮下接種後、百日咳毒素の腹腔内投与にて EAE を誘導し、臨床スコアを経時的に記録した。MK<sup>-/-</sup>マウス群への皮下埋め込みカプセルによる MK 持続投与した群 (MK<sup>-/-</sup>+MK) についても同様に検討し

<sup>1)</sup>名古屋大学環境医学研究所神経免疫分野

<sup>2)</sup>名古屋大学大学院医学系研究科生物化学講座

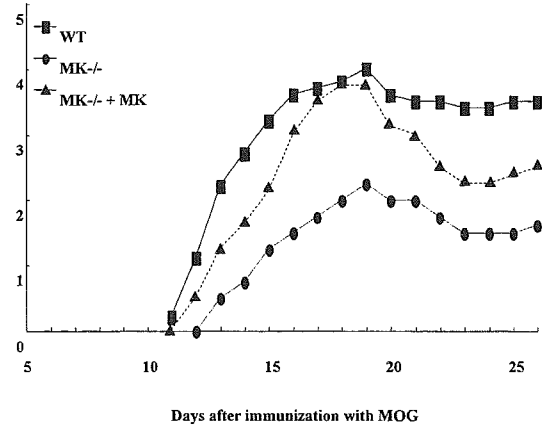
た。EAE 発症各時期に末梢リンパ節、中枢神経系に浸潤した単核球を抽出し、フローサイトメトリーにより CD4<sup>+</sup>T 細胞、CD8<sup>+</sup>T 細胞、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>制御性 T 細胞 (Treg) について解析した。さらに、分離したミクログリアによる、抗原提示関連分子発現および炎症性メディエーター産生能の差異について検討した。

## 研究結果

MK<sup>-/-</sup>マウス (図：●) では WT マウス (図：■) に比して EAE 発症率には差は見られなかったものの、臨床症状は顕著に抑制された。MK<sup>-/-</sup>+MK マウス (図：▲) では、この抑制効果は消失した。中枢神経系への浸潤細胞数は MK<sup>-/-</sup>マウスにおいて顕著に減少し、各マウス群由来の *ex vivo* での T 細胞誘導の検討でも、MK<sup>-/-</sup>マウスにおいて Th1 優位の自己免疫反応が抑えられていた。各マウス群由来のミクログリアの炎症性メディエーター産生能や抗原提示能の有意な差異は認められず、また、末梢リンパ節における CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T 細胞比にも有意な差異が認められなかったが、Treg は MK<sup>-/-</sup>マウスにおいて有意に増加し、MK<sup>-/-</sup>+MK マウスでは WT マウスと同程度に低下した。また、*in vitro* での検討にて、MK は容量依存的に Treg の活性化を抑制した。

## 結論

MK<sup>-/-</sup>マウスでは EAE 発症が顕著に抑制された。MK<sup>-/-</sup>マウスでは、Treg の増加により Th1 優位の自己免疫反応が抑制され、それにより中枢神経系への炎症細胞浸潤が減少した結果、EAE 発症が抑制されたと考えられた。MK 抑制が Treg の活性化を介して、多発性硬化症を初めとする自己免疫疾患の新たな治療戦略となりうる可能性が示唆された。



図：MK<sup>-/-</sup>マウスでは EAE が抑制され、MK 投与で抑制効果は消失する。

## 文献

1. Muramatsu, T. Midkine and pleiotrophin: two related proteins involved in development, survival, inflammation and tumorigenesis. *J. Biochem.* 132, 359-371. 2002.
2. Horiba, M. et al. Neointima formation in a restenosis model is suppressed in midkine-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 105, 489-495. 2000.
3. Maruyama K, et al. Midkine, a heparin-binding growth factor, is fundamentally involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis. Rheum.* 50, 1420-1429. 2004.

健康危険情報：なし

知的財産権の出願・登録状況

特許取得：

1. 特願 2005-329418 自己免疫疾患治療剤、およびその応用
2. 米国出願 11/266409 Method and composition for treating multiple sclerosis

実用新案登録：なし

# 実験的自己免疫性脳脊髄炎における抗トロンビン薬の効果

分担研究者 高 昌星

共同研究者 三好征司、市川元基、中山耕造、稲葉雄二、石川伸介、  
京ヶ島守、Taekyun Shin

## 研究要旨

実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) における病変局所におけるフィブリン沈着の意義を明らかにするため、抗トロンビン薬を用いて凝固・線溶系の役割を検討した。Lewis rat にモルモット髄鞘塩基性蛋白を感作した。感作後、毎日抗トロンビン薬 1 mg/day を、対照群には生理食塩水を皮下投与した。平均累積臨床スコアおよび平均発症期間においては有意な差が見られた。急性期におけるトロンビンアンチトロンビンⅢ複合体 (TAT) は抗トロンビン薬投与群で有意に低下していた。組織学的には両群で血管周囲性のフィブリン沈着が見られたが抗トロンビン薬投与群では軽度であった。抗トロンビン薬は凝固活性の中心であるトロンビンに選択的に結合することにより、凝固系でより下位にあるフィブリンの合成を阻害することの出来る製剤である。EAE の発症には凝固系の亢進が関与しており、抗トロンビン薬投与により、EAE が抑制されることを明らかにした。抗トロンビン薬は出血の少ない凝固阻止剤であり、また、非生物由来の薬物であるためより安全性に優れた多発性硬化症の治療薬となる可能性が示唆された。

## 研究目的

多発性硬化症 (MS) は中枢神経系の自己免疫疾患であり、その初期病変に血管周囲性にフィブリン沈着が見られることがよく知られているが、その意義については発症に関与しているのか未だに議論されている。実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) は MS の動物モデルとされており、MS の発症機序の解明に大きく貢献してきたが、EAE においても発症初期にフィブリン沈着がみられ、その意義については種々議論されている。EAE の発症機序に凝固・線溶系が関与している証拠が蓄積されてきているが、その詳細は今なお不明である。今回、我々は EAE における病変局所におけるフィブリン沈着の意義を明らかにするため、抗トロンビン薬を用いて EAE 発症における凝固・線溶系の役割を系統的に検討した。

- 1) 信州大学医学部保健学科
- 2) 信州大学医学部人体構造学
- 3) 信州大学医学部小児科
- 4) 信州大学医学部附属病院臨床検査

5) 愛知県がんセンター分子病態学部

6) National Cheju University

## 研究方法

Lewis rat にモルモット髄鞘塩基性蛋白 (GPMBP) をフロイントの完全アジュバントと共に感作した。感作後、毎日抗トロンビン薬 1 mg/day を皮下投与した。対照群には抗トロンビン薬と同等容量の生理食塩水を皮下投与した。投与後経時的に臨床症状を観察し、重症度を数値化し両群で比較した。重症度は遠位尾の麻痺 0.25、尾の完全麻痺 0.5、失調性歩行 1.0、後肢の不完全麻痺 2.0、後肢の完全麻痺 3.0 とした。また、一部のラットは急性期に屠殺し 3.8%クエン酸ナトリウムを用いて採血し、血漿を分離・凍結保存した。血漿中トロンビンアンチトロンビンⅢ複合体 (TAT) について ELISA 法を用いて測定した。また、血中 Fibrinogen、FDP D-Dimer を定量した。屠殺後、脊髄を採取しヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色およびフィブリン染色を施行し、組織学的に検討した。

## 研究結果

EAE は全個体で発症したが、平均発症日に有意な差は見られなかった。一方、平均累積臨床スコアおよび平均発症期間においては有意な差が見られた（表）。急性期における TAT は抗トロンビン薬投与群で有意に低下していた。 Fibrinogen、FDP D-Dimer については有意な差は見られなかった。 組織学的には両群で血管周囲性のフィブリン沈着が見られたが抗トロンビン薬投与群では軽度であった。

	発症率	平均発症日	平均積算臨床スコア	平均発症日数
アルガトロハン	17/19	12.8±0.9	5.0±2.8	2.9±0.8
対照群	17/18	11.6±0.9	9.1±0.8	3.9±0.5

表：EAE の臨床症状

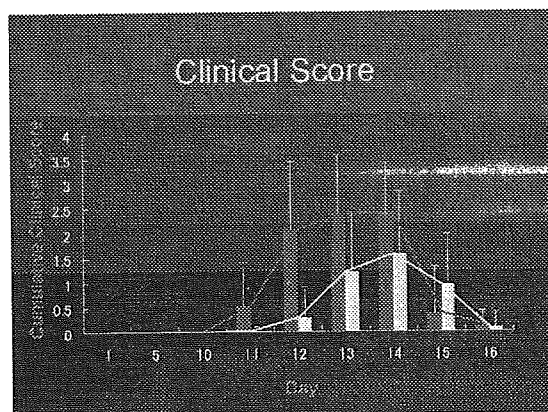


図 1：EAE の臨床症状

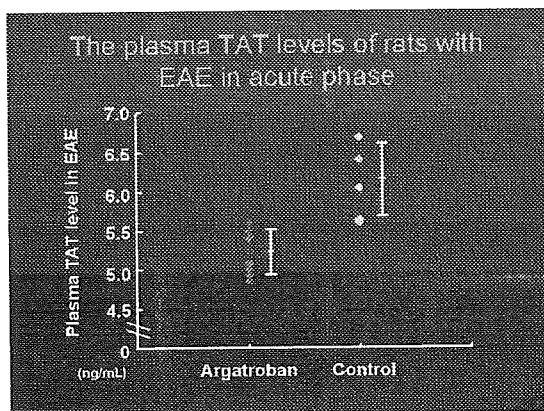


図 2：TAT

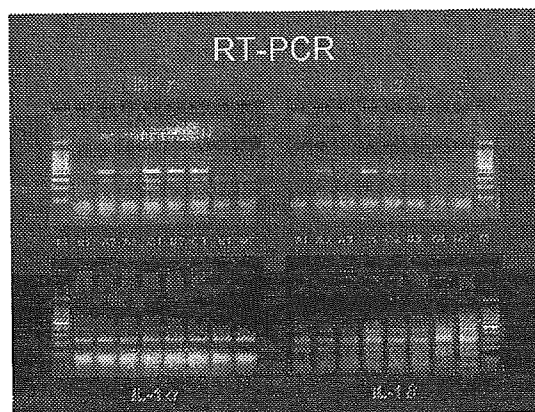


図 3：RT-PCR

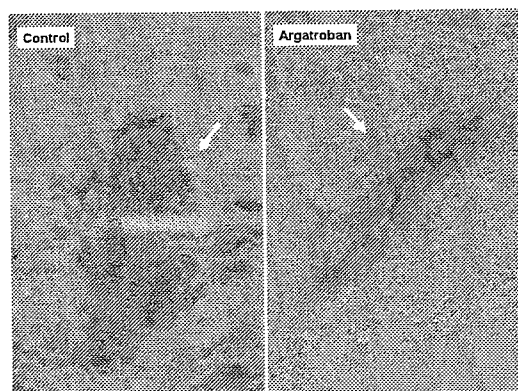


図 4：抗トロンビン薬投与群における血管周囲性のフィブリン沈着

## 考察

抗トロンビン薬は凝固活性の中心であるトロンビンに選択的に結合することにより、凝固系でより下位にあるフィブリンの合成を阻害することの出来る製剤である。これまでに、我々は EAE の臨床症状と TAT 活性とが相関を示すことを明らかにし、血漿中の TAT レベルが EAE の重症度のマーカーとなることを示した。また、血中のフィブリノゲンを除去することにより EAE の臨床症状が抑制されることを明らかにした。これらのことは EAE の発症

に凝固系が関与していることを示していると考えられる。実際、抗トロンビン薬を投与することにより、EAEの発症が抑制されることを今回明らかにしたが、その機序としては抗トロンビン薬投与による凝固カスケードにおけるトロンビンの活性を抑制することにより、凝固系が抑制され、その結果EAEの臨床症状が抑制されたと考えられる。抗トロンビン薬は非生物由来の凝固阻止剤であるため安全性に優れたMSの新たな治療薬として有用である可能性が示唆された。

## 結論

EAEの発症には凝固系の亢進が関与しており、抗トロンビン薬投与により、EAEが抑制されることを明らかにした。抗トロンビン薬は出血の少ない凝固阻止剤であり、また、非生物由来の薬物であるためより安全性に優れたMSの治療薬となる可能性が示唆された。

## 健康危険情報

なし

## 研究発表

### 1. 論文発表

1. Mirshafiey A, Matsuo H, Nakane S, Rehm BH, Koh CS, Miyoshi S: Novel immunosuppressive therapy by M2000 in experimental multiple sclerosis. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 27(2): 255-65, 2005.
2. Moon C, Ahn M, Kim H, Lee Y, Koh CS, Matsumoto Y, Shin T: Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in the early and peak phases of autoimmune neuritis in rat sciatic nerves. *Brain Res.* 1040(1-2): 208-13, 2005.
3. Moon C, Ahn M, Wie MB, Kim HM, Koh CS, Hong SC, Kim MD, Tanuma N, Matsumoto Y, Shin T: Phenidone, a dual inhibitor of cyclooxygenases and lipoxigenases, ameliorates rat paralysis in experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing its target enzymes. *Brain Res.* 1035(2):

206-10, 2005.

4. Mirshafiey, A. Rehm, B; Cuzzocrea, S; Matsuo, H., Mazzon, E., Nakane, S, Koh, C-S, Miyoshi, S. M2000, Foundation of a New Generation Among NSAIDs. *Letters in Drug Design & Discovery*, Volume 2, Number 5, August 2005, pp. 412-423(12)
5. Kim H, Ahn M, Lee J, Moon C, Matsumoto Y, Koh C-S, Shin T: Increased phosphorylation of caveolin-1 in the spinal cord of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neurosci Lett*, (in press)

## 2. 学会発表

1. 三好征司、中村元弘、石川伸介、京ヶ島守、稲葉雄二、市川元基、Taekyun Shin、高昌星：実験的自己免疫性脳脊髄炎における低分子ヘパリンの効果。神経免疫学会。2005.

## 知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし



arundic acid(ONO-2506)による再発性 EAE の抑制  
-臨床経過ならびに病理組織的検討-

分担研究者 野村恭一<sup>1)</sup>  
共同研究者 富岳 亮<sup>2)</sup>、滝沢功一<sup>2)</sup>、井口貴子<sup>1)</sup>、三井隆男<sup>1)</sup>  
木下俊介<sup>2)</sup>、高濱美里<sup>1)</sup>、大貫 学<sup>1)</sup>、高 昌星<sup>3)</sup>

### 研究要旨

再発寛解型の多発性硬化症（MS）の再発抑制療法として、現在、インターフェロン（INF）療法が行われているが、その治療効果は約 50%であり、INF 治療抵抗性の症例では新たな治療法が求められている。近年、MS の急性増悪時における脳内の astrocyte の役割が重要視されている。今回、我々は astrocyte の機能改善薬である arundic acid（ONO-2506）に注目し、ONO-2506 が MS の再発抑制薬になり得るかについて検討した。慢性進行型 EAE、再発寛解型 EAE モデルに ONO-2506 を経口投与し、神経症候を観察しさらに病理組織学的検討を行った。その結果、ONO-2506 は経口投与により慢性進行型、再発寛解型 EAE の神経症候の抑制と病理組織学的にも明らかな細胞浸潤の抑制効果を示した。ONO-2506 は MS の再発抑制薬になりうる可能性を認めた。

### 研究目的

Arundic acid (ONO-2506) は astrocyte の機能改善薬として近年開発され、現在、急性期脳血管障害の治療薬として注目されている。今回我々は、この ONO-2506 が多発性硬化症の治療薬としての可能性について検討するため、慢性進行型 EAE および再発寛解型 EAE モデルに ONO-2506 を経口投与し、神経症候ならびに病理学的検討を行った。

### 研究方法

動物：① 慢性進行型 EAE モデル作製には C57BL6 マウス 15 匹、② 再発寛解型 EAE モデル作製には NODLT マウス 15 匹を使用した。

EAE モデルの作製：抗原として myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) のアミノ酸配列 35-55 残基に相当する合成ペプチド (MOG<sub>35-55</sub>) を用い、EAE を誘導した。100 μg/マウスを両側の単径部皮下に分注、接種した。神経症候の発現を確実に安定化させるために pertussis toxin を尾静脈から注入した。神経症候は臨床スコア（0：臨床所見なし、1：尾のたれ、2：よちよち歩き、3：両下肢麻痺、4：四肢麻痺、5：死亡）を用い、抗原接種日より 60 日間、連続観察した。

ONO-2506 の経口投与：マウスの口腔から胃ゾンデを挿入し、ONO-2506 を経口投与した。ONO-2506 投与量は既知の実験結果から 30mg/kg/日とした。

① 慢性進行型 EAE モデルは、ONO-2506 30mg/kg/日を抗原接種当日

1) 埼玉医科大学医療センター神経内科  
2) 埼玉医科大学病院神経内科  
3) 信州大学医学部保健学科生体情報検査学科

から 30 日間連日に投与した。

② 再発寛解型 EAE モデルは、ONO-2506 30mg/kg/日を抗原接種当日から 30 日間（初回の寛解まで）あるいは 60 日間（再発の寛解まで）連日に投与した。

病理学的検討：臨床徴候の観察終了後（慢性進行性 EAE は 30 日後、再発寛解型 EAE では 60 日後）に大脳、小脳、全脊髄を摘出し、直ちに 10%ホルマリンで固定した。各中枢神経組織の 3 $\mu$ 切片を作製し H-E 染色した。各々の大脳、小脳、全脊髄を二重盲検法で無作為に、5 スライス措きに 3 スライスを観察し、細胞浸潤の有無を光学顕微鏡で観察した。また H-E 染色で脱髄が示唆された切片は髄鞘染色（K-B 染色）を行い脱髄の有無を確認した。

## 研究結果

### ① 慢性進行型 EAE モデルの検討（C57BL6 マウス）：

神経症候の検討では、ONO-2506 投与群は EAE 対照群に比べ抗原接種後の神経症候の発現が遅延し、平均臨床スコアの低下を認めた（図 1. 左）。また、病理学的検討では ONO-2506 投与群は EAE 対照群に比べ脳・脊髄ともに総計病巣数の減少を認めた（図 2. 左）。

### ② 再発寛解型 EAE モデルの検討（NODLT マウス）：

1) ONO-2506 の 60 日間投与群：神経症候の検討では、ONO-2506 投与群は EAE 対照群に比べ抗原接種後の神経症候の発現が遅延し、初回および再発時における平均臨床スコアの低下を認

めた（図 1 中央）。また、病理学的検討では ONO-2506 投与群は EAE 対照群と比べ脳・脊髄ともに総計病巣数の減少を認めた（図 2. 左）。

2) ONO-2506 の 30 日間投与群：神経症候の検討では、ONO-2506 投与群は EAE 対照群に比べ初回の神経症候の発症を完全に抑制し、再発の発症を遅延した。また、再発時における平均臨床スコアの低下も認めた（図 1. 右）。また、病理学的検討では、ONO-2506 投与群（30 日間）は EAE 対照群に比べ総計病巣数は低下したが、60 日投与群よりも病巣数は多かった（図 2. 右、図 3）。再発寛解型 EAE 対照群の H-E 染色では、細胞浸潤に加え脱髄を示唆する所見を認め、K-B 染色で細胞浸潤とその部位の脱髄を確認した。

## 考案

ONO-2506 ((R)-2-プロピルオクタン酸、分子式：C<sub>11</sub>H<sub>22</sub>O<sub>2</sub>、分子量：186.29) は急性期脳梗塞の新治療薬として注目されている<sup>1,6)</sup>。薬理作用は、ラットの中大脳動脈閉塞モデルにおいて、①脳梗塞形成の抑制<sup>2,3,6)</sup>、②脳浮腫の抑制<sup>2)</sup>、③神経症候の改善作用<sup>4,6)</sup>などが認められ、また、astrocyte 培養系において、④神経成長因子放出の抑制<sup>7)</sup>、⑤GABA 受容体の発現作用、⑥誘導型 NO 合成酵素 (iNOS)、cyclooxygenase-2 の発現抑制<sup>5)</sup>、⑦グルタミン酸トランスポーター発現亢進抑制<sup>7)</sup>などが報告されている。さらに最近、ONO-2506 には S-100 $\beta$  蛋白の増加抑制による astrocyte 異常活性化の抑制<sup>2)</sup>が報告されている。脳梗塞を含め脳内の炎症性変化などにより astrocyte は異常

活性化をきたし、S-100 $\beta$  蛋白、iNOS、COX-2、CINS-1 は産生亢進し、一方、GABA<sub>A</sub>、GSH、GLT-1/GLAST は抑制される。ONO-2506はこの astrocyte の異常活性化を抑制作用し、神経細胞障害やアポトーシスを抑制することが明らかとなっている。

我々は、この ONO-2506 による astrocyte の活性化抑制作用に着目し、免疫性神経疾患における治療および予防効果について検討した。既に免疫性末梢神経疾患であるギラン・バレー症候群 (GBS) の動物モデルである実験的アレルギー性神経炎に対して ONO-2506 は予防および治療効果を持つことが解明されている<sup>8)</sup>。今回は、免疫性中枢神経疾患である多発性硬化症 (MS) に対して ONO-2506 が再発抑制薬になりうるかについて検討した。

MS の動物モデルである慢性進行型 EAE、再発寛解型 EAE に ONO-2506 を連日、経口投与し、30-60 日間の神経症候の推移を観察、さらに、病理組織学的検討を行った。その結果、ONO-2506 の経口投与により、慢性進行型 EAE では神経症候の抑制効果を認め、また、再発寛解型 EAE では神経症候の抑制のみならず再発抑制効果をも示した。さらに、慢性進行型・再発寛解型 EAE のいずれにおいても ONO-2506 投与群では病理組織学的に細胞浸潤、脱髄病巣数の減少を認めた。

MS は中枢神経系の脱髄疾患であり、再発と寛解を繰り返すことを特徴とする疾患である。MS 再発のメカニズムは不明であるが、再発時において自己免疫性の活性化 T 細胞が大きな役割を果たし、これ

が血液脳関門 (BBB) を通過し中枢神経系内に侵入することが再発の誘因と考えられている。BBB は脳毛細血管の内皮細胞と astrocyte から構成されている。内皮細胞は tight junction により密に結合され、周囲は基底膜をはさみ astrocyte の足突起がロゼットを形成し、内皮細胞に密着した構造を呈している。ONO-2506 はこの astrocyte の異常活性化を制御することにより BBB の破壊を抑制し、慢性進行型・再発寛解型 EAE の神経症候ならびに再発を抑制したものと推測した。

ONO-2506 は多発性硬化症の再発・進行を抑制する経口薬剤となる可能性が示された。

## 結論

慢性進行型ならびに再発寛解型 EAE モデルでは、ONO-2506 の 30mg/kg/日 の経口投与により EAE の神経症候ならびに再発が抑制され、病理組織学的にも総計病巣数の減少を認めた。以上の結果より、ONO-2506 は多発性硬化症の再発・進行を抑制する経口薬となる可能性が示唆された。

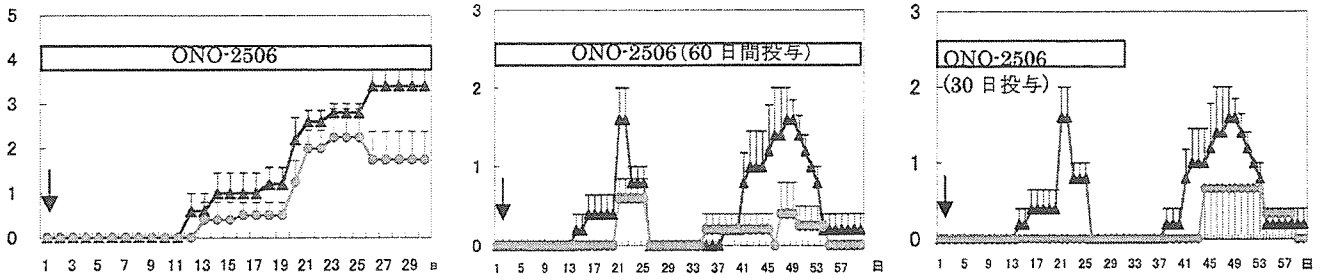


図 1. 慢性進行型・再発寛解型 EAE モデル (● : ONO-2506 投与群、▲ : EAE 群)

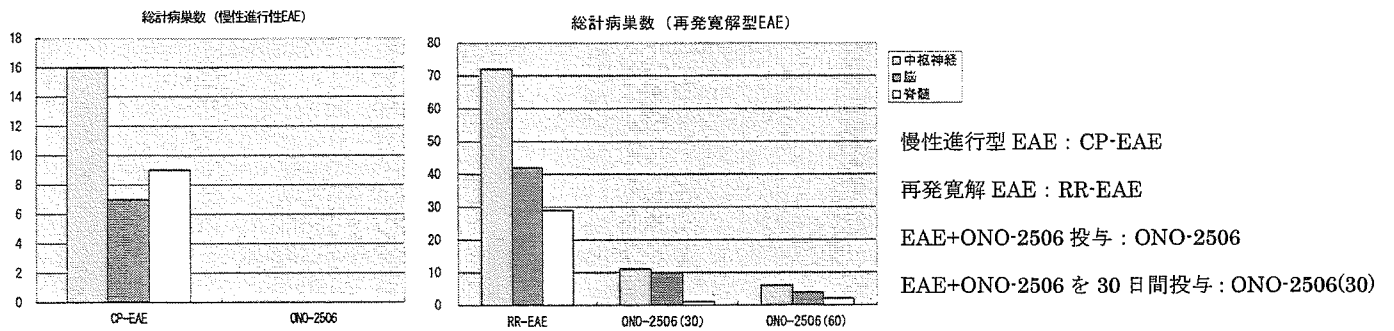
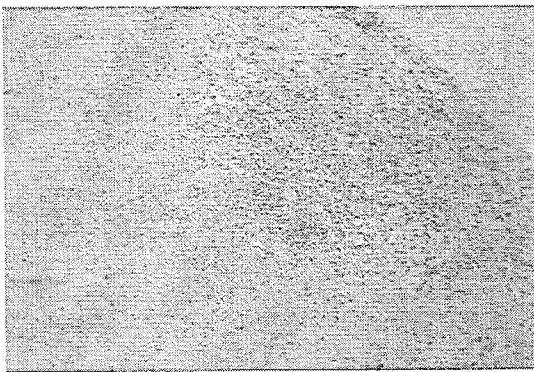


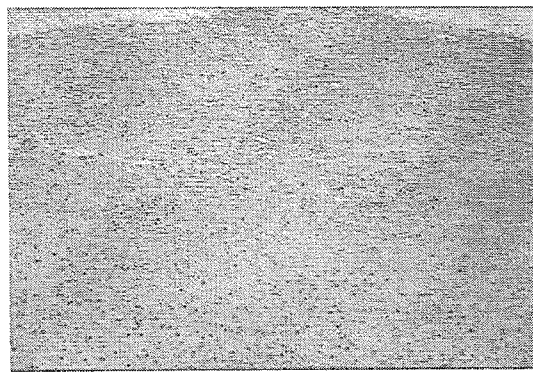
図 2. 慢性進行型・再発寛解型 EAE モデルの病理学的検討

再発寛解型 EAE 群



細胞浸潤と脱髄を認める

ONO2506(30日間)投与群



明らかな病変を認めない

図 3. 再発寛解型 EAE モデルの病理組織像  
 頸髄縦断面 HE 染色 100 倍像

Arundic acid(ONO-2506)投与群では、EAE の神経症候ならびに再発が抑制され、病理組織学的に病巣の減少を認めた。

Arundic acid(ONO-2506)は多発性硬化症の再発・進行を抑制する経口予防薬となる可能性が示唆された。

## 引用文献

- 1) Shintaku K, Tateishi N, Kagamiishi Y et al: Astroglia activation precedes the neural degeneration following MCA-occlusion. Soc Neurosci Abs 23:2175, 1997
- 2) Tateishi N, Kagamiishi Y, Shimoda T et al : Amelioration of brain damage following transient focal ischemia in rats by ONO-2506; relevance of its modulating action on astroglial functions. In Maturation Phenomenon in Cerebral Ischemia III, Defensive Mechanism Versus Apoptosis, Neural Recovery and Protection in Cerebral Infarction (ed Ito U, Fieschi C, Orzi F et al), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1999, p313-314
- 3) Asano T, Matsui T, Mori E et al : The effect of ONO-2506 on permanent focal ischemia in rats. In Maturation Phenomenon in Cerebral Ischemia III, Defensive Mechanism Versus Apoptosis, Neural Recovery and Protection in Cerebral Infarction (ed Ito U, Fieschi C, Orzi F et al), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1999, p315
- 4) Kagamiishi Y, Tateishi N, Shintaku K et al : Ameliorative effects of ONO-2506 on brain damage following the transient ischemia in rats. Soc Neurosci Abs 24:984, 1998
- 5) Shimoda T, Tateishi N, Shintaku K et al : ONO-2506, a novel astrocyte modulating agent, suppresses the increase of COX-2 and iNOS mRNA expression in cultured astrocytes and ischemic brain. Soc Neurosci Abs 24:984, 1998
- 6) Shintaku K, Tateishi N, Kagamiishi Y et al : Ameliorative effects of ONO-2506 on neurological deficits and infarction after transient MCA occlusion in rats. Soc Neurosci Abs 25:2108, 1999
- 7) Honjo K, Tateishi N, Shintaku K et al : Delayed increase of extracellular glutamate probably due to reduction of GLT-1 and GLAST following transient focal cerebral ischemia, and of its inhibition by ONO-2506. Soc Neurosci Abs 25:2108, 1999
- 8) 木澤英樹、野村恭一、島津邦男 : ONO-2506 の実験的自己免疫性神経炎に対する予防および治療効果. 神経治療 18:259-266, 2001

## 業績論文

野村恭一、高砂子由佳子、木下俊介、三井隆男、富岳 亮、島津邦男：慢性期ラクナ梗塞患者のリンパ球接着分子（LFA-1・VLA-4）、血管内皮細胞接着分子（ICAM-1・VCAM-1）の発現および血清サイトカインに対する Ibudilast の作用  
脳卒中 27 : 304-310, 2005

健康危険情報 なし

知的財産権の出願・登録状況

特許取得:なし・実用新案登録なし

# 食事中の脂肪酸組成の免疫性神経疾患への影響

分担研究者 松尾秀徳<sup>1)</sup>

共同研究者 近藤誉之<sup>1)</sup>、溝田貴光<sup>1)</sup>、澁谷統壽<sup>1)</sup>

## 研究要旨

食事中の脂肪酸と多発性硬化症の関連を検討するために食餌中の脂肪酸組成の変化が実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の経過に及ぼす影響を検討した。4 週齢雌 Lewis ラットを 3 群に分け、各群を脂肪酸組成の異なる 3 種類の栄養剤で飼育後、ミエリン塩基性蛋白で免疫し EAE を誘導し経過を観察した。ω6-rich (ω6/ω3=42.9) 群では、ω3-rich (ω6/ω3=0.25) 群、中間 (ω6/ω3=2.27) 群に比して発症が遅れ、重症度も有意に軽症であった。各群のリンパ組織の T 細胞サイトカイン産生能の検討では、その作用機序が Th1/Th2 バランスの変化であることは証明できなかった。

## 研究目的

必須脂肪酸は構造上から ω6 系と ω3 系に分類され、ω6 系にはリノール酸とその代謝産物であるアラキドン酸が属し、ω3 系には α リノレン酸とその代謝産物である EPA、DHA などが属する。近年、ω6 系脂肪酸の過剰摂取によるアラキドン酸の過剰がアレルギー性皮膚炎やアトピー性皮膚炎などのアレルギー性疾患の発症を促進することが報告されている。また、ω3 系脂肪酸の摂取が多発性硬化症 (MS) の患者において症状の再発を抑制することが報告されている。

今回は食事中の脂肪酸と多発性硬化症の関連を検討するために食餌中の脂肪酸組成の変化が実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の経過に及ぼす影響を検討した。

## 研究方法

1) 4 週齢雌 Lewis ラットを 3 群に分け (各群 n=6)、各群を脂肪酸組成の異なる 3 種類の栄養剤および水のみで 3-4 週間飼育後、ミエリン塩基性蛋白 (25 μg) および完全フロイントアジュバントで免疫し EAE を誘導し経過を観察した。

2) 免疫後 9 日目に各群 2 匹ずつのリンパ節、脾臓、胸腺より細胞浮遊液を作成し、CD3/CD28 抗体で 72 時間刺激培養後、上清中の、IFN $\gamma$  および IL-4 を ELISA 法で測定した。

## 倫理面への配慮

すべての動物実験は、動物愛護の観点より、国立病院機構長崎神経医療センターの動物実験指針 (動物実験委員会の指針) の範囲内で行われた。

## 研究結果

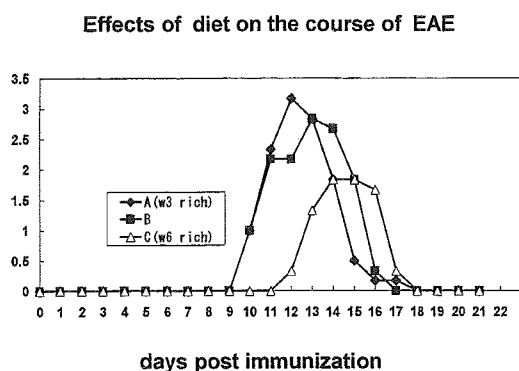
1) ω3-rich (ω6/ω3=0.25) 群は免疫後 10 日目より発症し、最高重症度は 0-5 の EAE スコアで 3.2±0.41、中間 (ω6/ω3=2.27) 群は 10 日

1) 国立病院機構長崎神経医療センター神経内科

2) 同臨床研究部

目に発症し、最高重症度は  $2.8 \pm 0.41$  であった。 $\omega 6$ -rich ( $\omega 6/\omega 3=42.9$ ) 群では発症が 12 日目  
で最高重症度も  $1.8 \pm 1.72$  と有意に軽症であつた。

2) リンパ節、脾臓、胸腺のリンパ球のサイトカイン産生能はいずれの群でも Th1 優位で明らかな差はなかつた。



## 考案

$\omega 6$  系脂肪酸の過剰摂取はアラキドン酸からのプロスタグランジン E2 産生、炎症型ロイコトリエン産生を促進し炎症性疾患発症の一因となることが報告されており、MS では  $\omega 3$  系脂肪酸の補充により、再発が抑制されたとの報告がある。われわれはこれまでに  $\omega 3/\omega 6$  の高い栄養剤を与えたマウスで脾細胞におけるサイトカインバランスが Th1 優位となる傾向があること、ヒト末梢血においても  $\omega 3/\omega 6$  の高い栄養剤を投与するとサイトカインバランスが Th1 優位となり、 $\omega 3/\omega 6$  の低い栄養剤を与えたときには Th2 優位となる傾向があること明らかにしてきた。したがって、免疫性神経疾患の食事指導を考えると、これらの脂肪酸組成が疾患の活動性に影響を与える可能性が考慮する必要がある。しかし、今回の検討では高  $\omega 6$  脂肪酸の食餌により EAE が抑制されることが示唆され、ヒトの臨床研究とは異なる結果であつ

た。また、リンパ組織の T 細胞のサイトカインバランスの偏移も証明できなかった。これは、実験に用いた Lewis ラットが Th1 優位の免疫反応を示すことと関連する可能性が考えられた。また、今回は総脂肪摂取量については検討しておらず、脂肪酸組成だけでなく摂取量の影響についても検討する必要があると考えられた。

## 結論

$\omega 6$ -rich の食餌が EAE の発症に抑制的に作用することが示唆された。

## 健康危険情報

なし

## 知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし

# GFAP プロモーター・EGFP トランスジェニックマウスを用いた EAE の解析 —病理学的及びサイトカインの検索—

分担研究者 原 英夫<sup>1)</sup>

共同研究者 片岡 政子<sup>1)</sup>、田平 武<sup>2)</sup>

## 研究要旨

慢性型脱髄性自己免疫性疾患でアストロサイト由来の液性因子が病態に関与する可能性が推察される。そこで我々は GFAP プロモーターの制御下に EGFP を強発現するトランスジェニックマウス (GFAP-EGFP Tg) を用いて慢性型 EAE を誘導し、EAE の経過にともなう脊髄の炎症像、アストロサイトの反応とサイトカイン発現について総合的に解析した。その結果、ミクログリアが急性期にピークとなり以後減弱傾向を示すのに対し、活性化アストロサイトは慢性期にも存続する傾向がみられた。Luminex を用いた脊髄たんぱく抽出液の経時的解析の結果、EAE 慢性期に IL-10、IL-12 の上昇がみられた。免疫染色の結果、慢性期の脊髄において EGFP 陽性の活性化アストロサイトに TNF $\alpha$ 、IL-10、IL-12 の発現を認めた。以上の結果より、アストロサイト由来の IL-12 が Th1 T 細胞の増殖・維持を促し EAE の慢性化に関与している可能性が推察された。

## 研究目的

慢性型 EAE の病態におけるアストロサイト由来因子の関与を調べるため、GFAP プロモーターの制御下に EGFP を強発現するトランスジェニックマウス (GFAP-EGFP Tg) を用いて、EAE の臨床経過にともなう脊髄の炎症像、アストロサイトの反応、サイトカイン産生について組織病理学的に検索した。

## 研究方法

8-10 週齢の雄 GFAP-EGFP マウス (C57BL/6 背景、hemizygous) を、ミエリンオリゴデンドロサイト糖たんぱく質 (MOG) ペプチド 35-55 (100 $\mu$ g)、フロイント完全

アジュバントと共に感作し、感作日および感作 2 日後に百日咳毒素 (300ng) の腹腔内投与を行い、EAE を作成した。マウスの臨床症状を観察し、感作後 12 日から感作後 50 日に至るマウス脊髄病理組織切片における炎症像を KB 染色で検出した。EGFP 細胞を蛍光顕微鏡により形態学的に観察し、サイトカイン、Iba1、GFAP の免疫染色を行い経時的に比較した。組織標本より抽出した上清中のサイトカインについて Luminex を用いて測定した。

(倫理面への配慮)

研究対象となるヒト由来の試料は、研究の目的、危険性や個人情報に関する配慮などに関しての説明を十分に行いインフォームド・コンセントを得た上で長寿医療セ

1) 国立長寿医療センター研究所血管性認知症研究部

2) 国立長寿医療センター研究所所長



ンター病院・研究所の倫理委員会承認後に行った。

マウス由来の細胞、試料あるいは個体を用いる際は長寿医療センターの定める倫理規定、動物実験ガイドラインを厳守した上で計画、実行した。

## 研究結果

GFAP-EGFP マウスは、感作後 12 日に後肢不全麻痺を発症し、14-16 日に臨床症状のピークを認め、その後、尾下垂から後肢の不全麻痺レベルで慢性化がみられた。組織学的には、KB 染色にて髄膜および脊髄白質への単核球の浸潤と脱髄を認め、EAE を確認した。感作後 12 日(急性期)に Iba1 染色の増強が脊髄全横断面にみられ、経過とともに次第に白質病変部に限局し減弱した。EGFP 陽性細胞は対照群、無症候群、感作後 12 日(急性期)ではみられなかったが、感作後 28 日より白質の浸潤病変周辺部に、伸張した突起を有し腫大した活性化細胞像として認められた。灰白質では、突起をもたない細胞 EGFP 陽性細胞が観察された。免疫染色の結果、白質の EGFP 細胞は TNF $\alpha$ 、IL-10、IL-12 陽性であった。脊髄標本より抽出したたんぱく上清中のサイトカインの測定では、EAE の経過とともに、IL-10、IL-12 が上昇する傾向がみられた。

## 考察

本研究の実験結果から、EAE 急性期の反応性ミクログリアと対照的にアストロサイトは遅れて活性化されること、慢性期にも活性化が持続すること、また、EAE 慢性期

脊髄でみられた IL-10 および IL-12 の上昇は、活性化アストロサイト由来が主体であることが明らかになった。以上の結果より、慢性経過型 EAE の病態機序として、アストロサイト由来因子の関与が推察される。特に、アストロサイト由来 IL-12 は Th1 T 細胞の増殖・維持を介して EAE の慢性化に関与している可能性が示唆された。

灰白質にみられた EGFP 陽性細胞は、白質の活性化アストロサイトとは異なる形態を呈していたが、EAE の病態との関係は不明で、解析は今後の課題である。

## 結論

慢性型 EAE 経過中の脊髄で活性化アストロサイト由来の IL-10、IL-12 の上昇傾向がみられた。活性化アストロサイト由来 IL-12 が EAE の慢性化に関与している可能性が示唆された。

## 文献

Suzuki R. et al. Expression of the receptor for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PAC1-R) in reactive astrocytes. Brain Res Mol Brain Res. 115: 10-20, 2003

## 健康危険情報

なし

## 知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし

## ウイルス性脱髄モデルを用いた免疫性脱髄関連分子の探索

分担研究者 大原義朗<sup>1)</sup>

共同研究者 朝倉邦彦<sup>1)</sup>, 紺谷靖英<sup>1)</sup>, 高野(丸山)真澄<sup>1)</sup>

### 研究要旨

Theiler ウイルス DA 株による多発性硬化症モデルにおいて、脱髄の機序を解明する目的で、脱髄に密接に関与すると考えられているウイルス由来の L 蛋白の標的分子探索を行い、分子量約 50kDa の AP50 が同定された。AP50 は細胞膜からのエンドサイトーシスに関与する分子で、免疫系の重要な negative regulator である CTLA-4 の turnover に関連することが分かっている。今年度は AP50 と L 蛋白の結合 motif を改変した組み換えウイルスを作製し、脳内接種により野生株との病理学的な比較検討を行うとともに、T リンパ球表面 CTLA-4 の発現への影響を解析した。その結果、L 蛋白と AP50 の結合を阻害すると、炎症所見の軽減が認められ、脳内に浸潤しているリンパ球表面 CTLA-4 の発現が野生株よりも高く維持されていた。このことから L 蛋白は CTLA-4 の turnover を抑制することにより、宿主のウイルスに対する CTL 反応を抑えて持続感染に寄与している可能性が示唆された。

### 研究目的

多発性硬化症 (MS) の原因あるいは発症の trigger の一つとしてウイルス感染の可能性が古くから示唆されている。Theiler ウイルス DA 株は、マウス脊髄に持続感染して免疫を介した慢性炎症性脱髄を引き起こすことから MS の動物モデルとして用いられている。我々はこれまで、この実験モデルにおいてその病態の解明と治療法の開発について取り組んできた。昨年度は、脱髄の機序を解明する目的で、脱髄に密接に関与すると考えられている Theiler ウイルス由来の L 蛋白 (ウイルス外殻蛋白の上流にあるシグナルペプチド) の標的分子探索を bacterial two-hybrid system を用いて行った。その結果、L 蛋白の標的分子候補として分子量約 50kDa の clathrin-associated protein AP50 (以下 AP50) が複数のライブラリーから同定された。さらに組み換え蛋白の発現系による検討で、in vitro、in vivo のいずれにおいても

AP50 と L 蛋白の interaction が確認された。本年度はこれらの結果を踏まえ、AP50 と L 蛋白の相互作用がウイルス持続感染・脱髄に及ぼす影響を、AP50 との結合 motif を改変した組み換えウイルスを作製して検討した。

### 研究方法

L 蛋白は 76 アミノ酸からなる疎水性蛋白であるが、そのアミノ酸配列の中で AP50 と結合する可能性があると考えられる tyrosine motif が 2ヶ所存在する。AP50 と L 蛋白の結合をさらに詳細に検討するため、この 2つの motif のいずれかまたは両方を他のアミノ酸に置換した L 蛋白 cDNA を作製して mammalian two-hybrid assay system を用いて培養細胞内での蛋白間の会合をルシフェラーゼの発現により比較した。

また、野生株の full-length cDNA をもとに、この 2つの tyrosine motif を改変した組み換えウイルスを作製した。この組み換えウイルスの in vitro での growth が野生株と同じであることを確認した上で、

<sup>1)</sup> 金沢医科大学微生物学講座

この組み換えウイルスと野生株をそれぞれ SJL/J マウスの脳内に接種して、急性期および慢性期(接種後 7 日、21 日、45 日、90 日)の脳および脊髄を灌流固定後摘出して、その病理像を、H-E 染色、K-B 染色、免疫組織染色により比較検討した。また、接種 7 日後の脳内に浸潤しているリンパ球を Percoll により分離し、リンパ球表面の CTLA-4 の発現を FACS により解析した。

### 倫理面での配慮

すべての動物実験は、動物愛護の観点より、金沢医科大学動物実験委員会の指針に従った。

### 研究結果

培養細胞(BHK-21、293T)を用いた mammalian two-hybrid assay system における検討では、AP50 の2つの tyrosine motif のいずれかを改変するだけで、AP50 とL蛋白の会合抑制が認められ、2つの motif を同時に改変するとさらに著明な会合抑制が認められた。このことからこれらの tyrosine motif は in vivo で2つの蛋白の会合に重要な役割を果たしていることが示された。

マウスの脳内に接種すると接種後 7 日目の脳や慢性期(接種後 21 日、45 日、90 日)の脊髄において、組み換えウイルス接種群では野生株接種群に比べて、炎症所見の減少やウイルス抗原量の低下が認められた。また FACS による解析では、脳内に浸潤しているリンパ球表面の CTLA-4 の発現レベルは、組み換えウイルス接種群の方が野生株に比べ高かった。

### 考察

持続感染・脱髄に重要な役割を果たしていると考えられている Theiler ウイルス L 蛋白と相互作用を示す標的分子の候補として、AP50 がクローニングされたが、さらに詳細な検討から、これらの蛋白の会合には L 蛋白の tyrosine motif が重要な働

きをしていることが確認された。この tyrosine motif を破壊した組み換えウイルスを用いた実験から、L 蛋白と AP50 の会合を抑制することにより、in vivo においては急性期および慢性期とも野生株を接種した場合に比べて、炎症所見の軽減や脳内に浸潤しているリンパ球表面の CTLA-4 の発現持続が認められた。

AP50 は clathrin 被覆小胞を形成する AP-2 複合体の構成要素であり、細胞膜からのエンドサイトーシスに関与する分子で、免疫系の重要な negative regulator である CTLA-4 の turnover に関連することがすでに分かっている。今回の結果から、L 蛋白はこれまでの I 型 IFN 産生抑制作用だけでなく、AP50 と会合することにより CTLA-4 のエンドサイトーシスを抑制し、宿主のウイルスに対する CTL 反応を抑制して持続感染に寄与している可能性が示唆された。今後 MS との関連がとくに示唆されているヘルペスウイルスなどで同様の機能を持つ蛋白が見出されれば、MS におけるウイルスの果たす役割を解明する一助となる可能性がある。

### 結論

脱髄発症に関連すると考えられる Theiler ウイルス L 蛋白の標的分子として同定された AP50 は、ウイルスの持続感染および脱髄の機構を解明するうえで重要な分子と考えられた。

### 健康危険情報

なし

### 知的財産権の出願・登録状況

特許取得:なし

実用新案登録:なし

## ウイルス性脱髄におけるウイルス非構成蛋白質の役割

分担研究者 大原義朗

共同研究者 高野（丸山）真澄、朝倉邦彦

### 研究要旨

タイラーウイルスは、マウスに急性致死性灰白脳脊髄炎を引き起こす GDVII 亜群と、脊髄に持続感染し脱髄を引き起こす DA 亜群に分類される。DA 亜群により引き起こされる脱髄は、その病態の類似性から多発性硬化症の実験モデルとして用いられている。しかし、その病変部位は主として脊髄であり、完全に多発性硬化症の病態を反映していない。そこで、脳に脱髄を引き起こす組換えウイルスを作製し、よりヒトの病態に近い実験モデルの作製を試みた。ウイルス非構成蛋白質リーダーの 1 アミノ酸を置換した組換えウイルスを作製し、マウス脳に接種したところ、ウイルスは脳において持続感染し、脱髄を引き起こすことが明らかになった。以上により、脳においても脱髄を引き起こす動物モデルの作製に成功した。

### 研究目的

タイラーウイルス DA 株は、マウス脊髄に持続感染し、感染をトリガーとする免疫応答メカニズムにより脱髄を引き起こすことから、多発性硬化症の実験モデルとして用いられている。しかし、ヒトの多発性硬化症は、脳において広範囲な脱髄を生じるにもかかわらず、現在の動物モデルは脊髄を中心に脱髄を生じる。従って、既存の動物モデルは、完全にヒトの病態を反映しているとは言い難い。そこで我々は、脳に脱髄を生じる動物モデル、すなわちヒトにより近い病態を示す動物モデルの作製を目的として研究を行った。

### 研究方法

DA 株 L の 57 番目のアミノ酸を DA 型セリンから GDVII 型プロリンに置換した組換えウイルスを作製した。

4 週令 SJL/J マウスに DA 株、GDVII 株または組換えウイルスを脳内接種し、脳および脊髄におけるウイルス量をプラークアッセイ法により測定した。また、ウイルス接種後の脳および脊髄における炎症細胞浸潤および脱髄病変を HE 染色法、KB 染色法および免疫染色法により検討した。さらに、脳および脊髄におけるウイルス抗原の存在部位を免疫染色法により検討した。

### 倫理面での配慮

全ての動物実験は、動物愛護の観点から、金沢医科大学動物実験委員会指針に従った。