

安部真彰, 小笠原淳一, 木村明代, 川井元晴,  
根来 清, 神田 隆: 低血糖発作と手の鏡面運  
動を呈した 22 歳女性例. 第 81 回日本神経学  
会中国・四国地方会. 岡山, 2006. 12.

前田敏彦, 古賀道明, 樋口文宏, 尾本雅俊,  
川井元晴, 根来 清, 神田 隆: 脳外科手術後  
に急速に進行した腫瘍様多発性硬化症の 65  
歳男性例. 第 81 回日本神経学会中国・四国地  
方会. 岡山, 2006. 12.

清水文崇, 木村明代, 小笠原淳一; 川井元晴,  
古賀道明, 根来 清, 神田 隆: 広範な大脳病  
変を呈し脳生検標本を用いた multivirus  
real time PCR により確定診断に至った単純  
ヘルペス脳炎の 61 歳女性例. 第 81 回日本神  
経学会中国・四国地方会. 岡山, 2006. 12.

木村明代, 小笠原淳一, 尾本雅俊, 川井元晴,  
根来 清, 神田 隆: 四肢遠位部の疼痛発作を  
契機として Fabry 病と早期診断した 19 歳男性  
例. 第 81 回日本神経学会中国・四国地方会.  
岡山, 2006. 12.

釜谷志織, 古賀道明, 尾本雅俊, 小笠原淳一,  
川井元晴, 根来 清, 神田 隆: 拡張型心筋症・  
心室性不整脈を認め, Lamin A/C 遺伝子変異  
が確認された Emery-Dreifuss 型筋ジストロ  
フィー (EDMD) の 15 歳男性例. 第 81 回日本  
神経学会中国・四国地方会. 岡山, 2006. 12.

#### G. 知的財産権の出願・登録情報

特許取得: なし

実用新案登録: なし

その他: なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
（総合）研究報告書

「実験的自己免疫性脳脊髄炎を用いた多発性硬化症の病態解明と新規治療法開発」  
に関する研究

分担研究者 楠 進 近畿大学医学部神経内科教授

研究要旨

多発性硬化症（MS）は未だに詳細な病態が解明されておらず、治療法も確立されていない難治性疾患である。主な病態は自己抗原特異的T細胞による中枢神経髄鞘の傷害と考えられているが、その標的抗原は不明である。我々は初年度、その候補を検索するためにMS患者血清の神経髄鞘蛋白に対する抗体をELISA法にて測定した。その結果、脊髄病変の再発寛解を繰り返す2症例においてMBP、PLP、MOGのIgGあるいはIgMクラス抗体が陽性であった。さらなる症例数の積み重ねが必要である。次年度はMSの動物モデルとされる実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）を用いて新規治療法を検索した。選択的cyclooxygenase（COX）-2阻害薬であるcelecoxibはEAEを著明に抑制し、発症後の投与でも治療効果を認めた。celecoxibはCOX-2を介さない経路で免疫学的バランスをTh2に偏倚させ、免疫細胞の脳血液関門通過を促進する接着分子ICAM-1やP-selectin、ケモカインMCP-1の発現を抑制していた。今後の臨床応用が期待される。最終年度はNMO-IgGの対応抗原であるaquaporin-4（AQP4）のEAEにおける病態関与を検証した。EAEの脳・脊髄において、EAE症状にほぼ相関してAQP4-mRNAの発現がみられた。EAEの病態においてAQP4の関与が示唆された。

A. 研究目的

①MSの病態は、主に自己抗原特異的T細胞による中枢神経髄鞘の傷害と考えられているが、その標的抗原については不明の点が多い。Myelin basic protein（MBP）、proteolipid protein（PLP）、myelin oligodendrocyte glycoprotein（MOG）などの中枢神経髄鞘蛋白がその候補として挙げられており、これらに対する血液・髄液中の抗体価上昇例も報告されている。これらは欧米からの報告がほとんどであるが、MSの臨床像や疫学については人種間で大きな差があり、欧米人と日本人では特徴は異なる。本研究では日本人のMS症例において、抗体の種類や抗体価と病型との相関関係を検証して、病態解明および診断に役立てることを目的とする。

②次に、我々はMSの動物モデルであるEAEを用いて抗炎症薬による新規治療法の検索を行った。従来からindomethacinやステロイドなどがEAEに対して有効であると報告されているが、長期使用による副作用があり臨床応用には至っていない。我々は副作用が少ないとされるCOX-2阻害薬に注目しEAEに対する治療効果を検証した。

③最後に、視神経脊髄型多発性硬化症の多くの例でNMO-IgGが陽性であり、その対応抗原がAQP4であることが確認されている。AQP4は中枢神経だけではなく腎や胃粘膜にも存在する水輸送に関連する水チャネル分子である。脳では脳内水調節に関与し脳浮腫病態との関連が推定されている。本研究ではEAEにおけるAQP4の関与を解析した。

B. 研究方法

①近畿大学医学部神経内科にて、2003年以降にMSと診断された患者30名を対象とした（病型は古典型15例、視神経脊髄型15例）。採血は発症直後、あるいは再燃時に行った。MBP 83-99、PLP 183-199、MOG 35-55の各ペプチドを抗原としELISA法を用いてIgG、およびIgM抗体価を測定した。異常値の判定は、正常コントロールのOD値の平均値+3SD以上を陽性と判定した。②B6マウスにMOG（35-55）を用いてEAEを誘導し、nimesulid、celecoxib、meloxicamなど新旧COX-2阻害剤と、indomethacin、dexamethasoneなど従来からの抗炎症薬を用いて治療効果を比

較した。EAE マウスの血清、リンパ組織、脳脊髄などを経時的に採取し、血清からはMOG抗体価、サイトカイン、ケモカインなどを測定し、各組織は免疫組織染色やフローサイトメーターを用いて解析した。

③B6マウスにMOG(35-55)を用いてEAEを誘導し、脳や脊髄におけるAQP4-mRNAを定量PCRにて測定した。EAE誘導前、誘導後7、14、21、28、35日目に各5匹から脳、脊髄を採取した。各組織からcDNAを合成し、Lightcyclerにて定量した。

(倫理面の配慮)

患者検体を用いた研究については、インフォームドコンセントや個人情報保護を盛り込んだ実験計画書を大学内倫理委員会に諮り、承認を得た上で実施した。実験動物を用いた研究については、大学内動物実験委員会に実験計画書を提出し、承認を得た上で、学内「実験動物取り扱い指針」を遵守し遂行した。

### C. 研究結果

①2症例で血清抗体価が陽性であった。1例はMBP、PLP、MOGの全てに対してIgG抗体陽性。他方は全てに対してIgM抗体が陽性であった。

②celecoxibは他の薬剤と比べてEAEを強力に抑制し、発症後の投与でも有効であった。また同薬は抗MOG抗体のアイソタイプをTh2にシフトさせていた。これらの効果はCOX-2欠損マウスでも再現されることから、COX-2を介さない経路で作用していることが判明した。celecoxibは脳血液関門通過に重要な接着分子(ICAM-1、P-selectin)やケモカイン(MCP-1)の発現を抑制することによって、抗原特異的T細胞の中樞神経への侵入を阻止していると考えられた。

③脊髄ではEAE誘導後14日目に、大脳では21日目にAQP4-mRNA上昇のピークがみられた。病理組織上は脳、脊髄とも炎症所見がEAE誘導後21日目で最も著しかった。

### D. 考察

①IgG抗体陽性例は脊髄病変の再発寛解を繰り返す43歳女性であった。IgM抗体陽性例は外転神経麻痺で発症した23歳女性であった。現時点では、病型と抗体価についての相関関係を述べることは困難であり、さらなる症例数の積み重

ねが必要である。

②celecoxibは他のCOX-2阻害薬と同様のPG産生抑制による抗炎症効果だけではなく、COX-2を介さない経路での免疫学的バランスのTh2偏倚や免疫細胞のBBB通過阻止の効果があるために他の抗炎症剤には無い強力なEAE治療効果を示したと考えられる。

③急性脳虚血ではAQP4欠損により脳浮腫が著減すると報告されている。EAEの病態においてもAQP4が炎症巣での浮腫を増長させている可能性がある。その反面AQP4が炎症巣の修復に働いている可能性もあり、検討が必要である。

### E. 結論

①中枢神経髄鞘蛋白に対する抗体はMS病態に何らかの影響を及ぼしている可能性がある。

②celecoxibはMSの新たな治療薬となる可能性がある。

③EAEの病態にAQP4の関与が示唆された。

### F. 健康危険情報：なし

### G. 研究発表

#### I 論文発表

1. Miyamoto K, Miyake S, Mizuno M, Oka N, Kusunoki S, Yamamura T. Selective COX-2 inhibitor celecoxib prevents experimental autoimmune encephalomyelitis through COX-2-independent pathway. *Brain* 129:1984 (2006)

#### II 学会発表

1. 宮本勝一、高田和男、西郷和真、楠 進. 多発性硬化症の血清中神経髄鞘成分に対する抗体の検討. 第47回日本神経学会総会 (平成18年5月11日 東京)

2. 宮本勝一、楠 進、三宅幸子、山村隆. 実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)に対するCOX-2阻害剤を用いた治療. 第18回日本神経免疫学会学術集会(平成18年3月2日 名古屋)

3. 宮本勝一、片岡和夫、楠 進. 実験的自己免疫性脳脊髄炎の中樞神経におけるaquaporin-4. 第48回日本神経学会総会 (発表予定)

### H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得、実用新案登録、その他：すべてなし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担総合研究報告書

多発性硬化症の疾患概念と病態，治療に関する研究

分担研究者 菊地誠志 国立病院機構札幌南病院神経内科

研究要旨

1) アジアにおける多発性硬化症（以下MS）の特徴と疾患分類・診断の問題点—新たな診断基準（McDonald 2001）における「除外基準」の妥当性を中心に—

近年，国際委員会の議論を経て多発性硬化症（multiple sclerosis; MS）に対する新しい McDonald の診断基準（2001年）が提唱されたが当該委員会にアジアの神経学者は含まれていない。本邦を含めたアジアにおける MS の臨床像が欧米のそれと異なることは従来から指摘されており，新たな診断基準を「国際的」な基準として臨床応用するためには少なくともアジア諸国での検証が必須である。特に，McDonald の診断基準で明記された除外基準は，これまでアジアの MS に特徴的とされた所見をむしろ反映しており，したがって多くの MS 症例が除外される可能性が高い。

2) 食事性脂質と NKT, T 細胞機能に関する研究

C57BL/6 マウスに高脂肪食を摂取させたところ， $\alpha$ -GalCer 投与による血中 IFN- $\gamma$  産生の低下や NKT 細胞数の減少が見られた。OVA に対する Th1 免疫反応は高脂肪食摂取により減弱していたが，この変化は CD1d<sup>-/-</sup> マウスでは見られなかった。高脂肪食摂取により NKT 細胞機能が変化したことが，Th1 反応の減弱につながったものと考えられた。

3) ウニ小腸由来 sulfonoquinovosyl diacylglycerol による実験的自己免疫性脳脊髄炎の治療  
ウニ小腸より脂肪酸構造の異なる 2 種の sulfonoquinovosyl diacylglycerol を抽出した。これらを EAE へ投与した結果，一方では病像を改善したのに対し，他方では悪化が見られた。その作用機序および構造と生理活性の関連につき検討中である。

1) アジアにおける多発性硬化症（以下MS）の特徴と疾患分類・診断の問題点—新たな診断基準（McDonald 2001）における「除外基準」の妥当性を中心に—

A. 研究目的

臨床的に確実と診断された本邦 MS 自験例において，McDonald の診断基準（2001年）で明記された「脊髄 MRI 病変 $\geq$ 3 椎体」「髄液細胞数 $\geq$ 50」という除外診断のいずれかを有する症例の割合とそれら症例のその他の臨床的特徴の有無を検討する。その結果をもとに国際的基準としての McDonald 診断基準の妥当性および疾患分類自体の問題点を検証する。さらに，髄液 oligoclonal IgG bands (OCB) の診断的有用性についても再検証する。

B. 研究方法

臨床的な再発・寛解，他覚的な多発性病変が確認され，MS 以外の疾患が除外できた症例のうち，急性期において髄液検査および脊髄 MRI 検査がともに施行された 158 例の日本人 MS 患者を対象とした。再発性の視神経炎のみ，再発性の脊髄炎のみ，あるいは再発性の脳幹病変のみの患者は除外した。鑑別診断のため，必要な場合には血管造影あるいは脳生検が適宜施行された。脊髄病変の拡がりや再発に関連した T2 強調画像所見にて評価した。髄液 OCB はすべて等電点電気泳動法を用いて検討した。

（倫理面への配慮）

臨床情報に関しては，個人情報漏れがないよう，十分配慮の上解析を行った。

### C. 研究結果

158 例中 32 例 (20.3%) において再発に関連した 3 椎体以上にわたる脊髄病変を認め、11 例 (7.0%) が  $50/\text{mm}^3$  以上の髄液細胞増多を示した。結局 33 症例 (20.9%) が「脊髄 MRI 病変  $\geq 3$  椎体」あるいは「髄液細胞数  $\geq 50$ 」のいずれかの除外基準を有していた。それら 33 例のうち 21 例は視神経脊髄型 MS (OSMS) と分類され、残りの 12 例の病変分布は視神経と脊髄に限定されず nonOSMS と分類された (症例供覧)。いっぽう、McDonald 診断基準を満たし、かつ、上記の除外基準を有さない 125 例の臨床特徴を再検討したところ、10 例 (8.0%) が大脳、小脳あるいは脳幹に MRI 上で非典型的に大きな拡がりを有する病変を呈していた (症例供覧)。昨年度の本会議で我々が提唱した optico-spinal fulminant MS (OS-FIMS), nonOS-FIMS, nonFIMS の分類に当てはめると、今回の検討で除外基準を満たした OSMS 21 例は OS-FIMS に、nonOSMS で除外基準を満たした 12 例および大脳、小脳あるいは脳幹に MRI 上で非典型的に大きな拡がりを示す病変を呈していた 10 例の計 22 例は nonOS-FIMS に、それ以外の 115 例は nonFIMS に適合・分類され、nonFIMS に分類された症例の臨床像は欧米での classical MS と相同であった。OS-FIMS と nonOS-FIMS における OCB の陽性率はそれぞれ 11.1%, 15.0% と極めて低値であり、また、臨床像は欧米でいう classical MS とまったく相同と考えられる nonFIMS における OCB 陽性率も 64.9% と欧米の報告に比してかなり低率であった。

### D. 考察

脊髄に大きな拡がりを有する症例は MS と診断することができず、大脳、小脳あるいは脳幹にそのような所見を有する場合には MS と診断されることは非論理的であり、しかも、これらの特徴を有する症例が本邦を初めとしたアジア諸国に比較的多い。nonFIMS の臨床像は欧米でいう classical MS とまったく相同と考えられるが OCB 陽性率も 64.9% と欧米の報告に比して低い。これに関連して我々は以前、通常型 MS には HLA-DR15 に相関して OCB 陽性の群と DR4 に相関して OCB 陰性の群の少なくとも 2 群があることを報告したが、最近、スウェ

ーデンから全く同様の報告がなされた。臨床像は同じであっても OCB が陰性である通常型/古典型の MS が本邦を含めたアジアに多いことが確認されたわけであり、言い換えれば、MS 診断における OCB 検査の有用性は国際的には必ずしも高くない。臨床的多様性と人種差との関連を考慮した診断基準の改訂が必要である。

### 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

## 2) 食事性脂質と NKT, T 細胞機能に関する研究

### A. 研究目的

食事性脂質と多発性硬化症 (MS) を初めとした自己免疫性疾患との関係は古くから疫学的検討や動物実験が行われているが、そのメカニズムの詳細は明らかにされていない。われわれは以前に、動脈硬化食 (脂肪 15%, コレステロール 1.25%, コール酸 0.5%) 摂取が natural killer T (NKT) 細胞からの Th1 系サイトカイン産生増強を介してマウス動脈硬化促進的に働くことを見いだしている。今回は高脂肪食が NKT 細胞, T 細胞免疫系に与える影響につき検討した。

### B. 研究方法

5-8 週齢 C57BL/6 (WT B6) に通常食 (脂肪 4.3%, コレステロール 0.03%) および高脂肪食 (脂肪 21.2%, コレステロール 0.2%) を 3 週間摂取させ、 $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ -GalCer) 投与による血中 interferon (IFN)- $\gamma$ , Interleukin (IL)-4 産生を測定した。また肝臓、脾臓における NKT 細胞、樹上細胞の表面抗原をフローサイトメトリーで解析した。次に WT B6 および、CD1d<sup>-/-</sup> マウスに通常食、高脂肪食を摂取させ、ovalbumin (OVA) 323-339 ペプチドに対する T 細胞反応や遅延型過敏反応を解析した。また高脂肪食が human interphotoreceptor retinoid binding protein (hIRBP) 1-20 ペプチドにより誘導し

た experimental autoimmune uveoretinitis (EAU)へおよぼす影響を解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験は北海道大学遺伝子病制御研究所動物実験施設の倫理規定を遵守した。

### C.研究結果

高脂肪食摂取により、 $\alpha$ -GalCer 投与による血中 IFN- $\gamma$ 産生が低下した。血中 IL-4 産生には変化がなかった。高脂肪食摂取により肝臓、脾臓の NKT 細胞の割合は減少しており、NKT 細胞上の NK 受容体発現変化や樹上細胞上の CD1d 発現低下などを伴っていた。組織学的に、肝臓は脂肪肝を呈していたものの炎症細胞浸潤は認めなかった。OVA 323-339 ペプチドに対する T 細胞増殖反応と IFN- $\gamma$ 産生は高脂肪食摂取により減弱していたが、CD1d<sup>-/-</sup>マウスでは明確な変化は見られなかった。同様に OVA に対する遅延型過敏反応は高脂肪食を摂取させた WT B6 でのみ低下していた。高脂肪食摂取は EAU の臨床経過には影響を与えなかった。

### D.考察

今回の研究では高脂肪食摂取により NKT 細胞機能に変化が生じ、その結果 OVA に対する Th1 反応が減弱したことが考えられた。このことは MS の有病率が増加していることとは必ずしも一致はしないが、食事性脂質が NKT 細胞を介して獲得免疫系に影響をおよぼすということは非常に興味深いと考えている。EAU の結果で見られたように、すべてのモデルで同様の結果が得られるわけではないようであり、食事の種類や実験モデルによっては Th1 反応の増強が見られる可能性も考えられる。今後は NKT 細胞に作用している食事性脂質の成分および NKT 細胞機能や T 細胞免疫系の変化に関与している分子の同定が必要である。

### 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

## 3) ウニ小腸由来 sulfonoquinovosyl diacylglycerol による実験的自己免疫性脳脊髄炎の治療

### A.研究目的

免疫抑制活性を示すことが報告されている sulfonoquinovosyl diacylglycerol(SQDG)をウニ小腸より抽出し、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) への治療効果とその作用機序について明らかにすることを目的とした。

### B.研究方法

ウニ小腸の乾燥粉末から生化学的手法を用いて糖脂質を抽出、精製し構造解析を行った。EAE は C57BL/6 に MOG 35-55 ペプチドを完全フロイントアジュバンドとともに免疫し誘導した。2 種の SQDG のいずれか、または vehicle を連日腹腔内投与し症状を観察した。

(倫理面への配慮)

動物実験は北海道大学遺伝子病制御研究所動物実験施設の倫理規定を遵守した。

### C.研究結果

ウニ小腸より 7 種の糖脂質を抽出することが出来た。構造解析の結果この中の 2 種が脂肪酸構造の異なる SQDG であり、一方の脂肪酸は C14:0 と C16:0 で他方は C16:0 と C22:1 で構成されていることが判明した。SQDG を EAE に投与したところ C14:0、C16:0 で構成される SQDG を投与した群ではコントロール群に比べて症状の軽減が見られた。一方で C16:0、C22:1 で構成される SQDG を投与した群では病像の悪化が見られた。

### D.考察

SQDG にはヒト MLR やラット同種皮膚移植における拒絶反応の抑制効果などがあることが知られているが、その作用機序は十分に明らかにされていない。現在までの結果から SQDG は脂肪酸構造の相違により EAE に及ぼす影響が異なることが判明したが、両者の生理活性の質的相違を検討することで、作用機序を明らかに出来ると考えている。

### E.結論

ウニ小腸より脂肪酸構造の異なる 2 種の SQDG を抽出し EAE へ投与した結果、一方

では病像を改善したのに対し，他方では悪化が見られた．現在その作用機序に関して検討中である．

**F.健康危険情報**

なし

**G.研究発表**

ウニ小腸由来 sulfonoquinovosyl diacylglycerol による実験的自己免疫性脳脊髄炎の治療（第18回日本神経免疫学会学術集会 名古屋）

**H.知的財産権の出願・登録状況**

なし

MS に対する IFN- $\beta$  療法の作用機序に関する免疫学的検討

藤田伴子<sup>1</sup>、神戸直智<sup>2</sup>、内山 卓<sup>1</sup>、堀 利行<sup>1</sup>

京都大学大学院医学研究科 <sup>1</sup>血液・腫瘍内科学、<sup>2</sup>皮膚生命科学

研究要旨

多発性硬化症 (MS) に対する IFN- $\beta$  療法の作用機序を明らかにするために、ヒト肥満細胞 (MC) および樹状細胞 (DC) の免疫学的機能に対する I 型 IFN の影響について検討した。臍帯血 CD34+ 造血幹細胞より *in vitro* で分化させて調整した MC を用いて、Fc $\epsilon$ RI クロスリンク後のサイトカイン産生に対する IFN- $\alpha$  の影響を調べたところ、IFN- $\alpha$  処理によって MC の生存率には変化がなかったが、TNF- $\alpha$  の産生と OX40L の発現が低下し、逆に IL-10 と TGF- $\beta$  の産生が増加した。また、この変化に一致して MC の T 細胞増殖促進活性が抑制された。一方、IFN- $\alpha$  は樹状細胞 (DC) に作用して、OX40L の発現を亢進させたが、DC 依存性の T 細胞の活性化を間接的に抑制した。これはおそらく IFN- $\alpha$  処理によって IL-12 の産生が抑制されたためと考えられた。これらのことから、IFN- $\beta$  を含む I 型 IFN が MC と DC を介して T 細胞免疫応答を制御する方向に作用することが明らかとなった。IFN- $\beta$  の MS に対する効果の少なくとも一部には MC および DC への免疫制御的作用が関与していると考えられる。

A. 研究目的

多発性硬化症 (MS) に対して IFN- $\beta$  療法が何故有効であるのか、そのメカニズムの詳細は明らかでない。I 型 IFN ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\omega$  など) および II 型 IFN ( $\gamma$ ) はいずれも免疫賦活作用があり、T 細胞応答を増強すると考えられてきた。しかし、Th1 型の臓器特異的自己免疫疾患である MS に対して IFN- $\beta$  が病勢を抑えるという臨床結果は、このような IFN についての一般的な理解だけでは不十分であり、新しい作用機序

の解明が必要なことを示している。最近、IFN の中でもとくに I 型 IFN には、単純に免疫を賦活するだけでなく、標的細胞や作用の時期によって免疫制御性の活性を合わせもつことが明らかになりつつある。T 細胞に抗原を提示する樹状細胞 (DC) がその後の免疫応答の性格を決定することはよく知られている。MS の発症に DC が関与するという報告は多い。また、最近では、肥満細胞 (MC) も同様に適応免疫の制御に関与することが明らかにされている。



すなわち、MC は I 型アレルギー反応におけるエフェクター細胞であるだけでなく、T 細胞との相互作用が証明され、Th1 型免疫疾患との関わりも指摘されている。MS の病態においても、MC を欠損した W/W<sup>m</sup> マウスでは EAE の発症が起りにくく、発症しても軽症にとどまり、そこに同系マウスの MC を移入することによって野生型マウスのレベルまで重症化することが報告されている (J. Exp. Med. 191:813, 2000)。したがって、MC の制御機構の解明は MS の病態の理解にとって重要であるといえる。

そこで、本研究では、I 型 IFN が MC と DC という 2 つのアクセサリ細胞、その中でもとくに不明な点の多い前者への作用を介して免疫を制御する可能性について検討した。

## B. 方法

臍帯血単核球より分離した CD34<sup>+</sup> 細胞を SCF および IL-6 を添加して 8 週間以上培養し、ほぼ 100% c-kit 陽性となった細胞を臍帯血由来ナイーブ MC とし、これに IL-3 と IL-6 を加えて 5 日間培養して成熟させたものを用いた。MC の活性化はヒト IgE とヤギ抗ヒト IgE 抗体で FcεRI をクロスリンクすることによって行った。サイトカイン産生については、IgE と同時に IFN-α を添加し、FcεRI クロスリンク後の TNF-α、IL-10、TGF-β の産生への影響を RT-PCR と ELISA によって解析した。また、共刺激分子として重要な OX40L の発現を

フローサイトメトリーにて比較検討した。最後に、IFN-α 処理または非処理後 MC を洗浄し、抗 CD3 抗体刺激正常 CD4<sup>+</sup> T 細胞と共培養し、5 日後の T 細胞の増殖を [<sup>3</sup>H]TdR の取り込みにて測定した。

健常人末梢血より MACS 磁気ビーズカラムを用いて CD11<sup>+</sup> myeloid DC (mDC) および CD11c<sup>-</sup> plasmacytoid DC (pDC) を精製し、IFN-α 存在下、非存在下に LPS または CpG オリゴ DNA で刺激し、OX40L の発現をフローサイトメトリーにて比較検討した。また、CD4<sup>+</sup> T 細胞単独および DC の存在下に抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体で刺激し、1 日後の CD25、HLA-DR、OX40 などの活性化抗原の発現させる系で IFN-α 添加の影響を比較した。

(倫理面への配慮)

臍帯血および健常人末梢血は、学内倫理委員会のガイドラインに従って、提供者のインフォームドコンセントを得て採取し使用したものであり、倫理面の問題はない。

## C. 研究結果

まず初めに IFN-α が MC の生存率や細胞数には影響を及ぼさないことを生細胞数および改変 MTT アッセイで確認した。サイトカイン産生では、RT-PCR および ELISA いずれにおいても IFN-α により FcεRI クロスリンク後の TNF-α 産生が著明に抑制され、逆に IL-10 産生が増加していた。また、ELISA で確認できなかったが、RT-PCR では TGF-β の発現も増加していた。

フローサイトメトリー解析の結果、IFN- $\alpha$  処理 MC で OX40L の発現低下が認められた。これらの所見に一致して、抗 CD3 抗体刺激正常 CD4<sup>+</sup> T 細胞に対する MC の増殖促進活性が IFN- $\alpha$  処理により有意に抑制された。以上のことから、IFN- $\alpha$  は MC に作用してサイトカイン産生パターンと共刺激分子発現を変化させることによって T 細胞に対する共刺激活性を低下させることが示された。

一方、DC に対しては、IFN- $\alpha$  は mDC および pDC に対していずれも OX40L の発現を増強することが判明した。また、IFN- $\alpha$  は精製した CD4<sup>+</sup> T 細胞の活性化に対しては影響を与えなかったが、DC の共存下では活性化抗原である CD25、HLA-DR、OX40 の発現を低下させた。

#### D. 考察

I 型 IFN は抗ウイルス作用、細胞増殖抑制作用以外に様々な免疫調節作用を示すが、MC に対する作用は殆ど知られていない。本研究により、I 型 IFN が MC に作用し TNF- $\alpha$  産生と OX40L 発現を抑制し、逆に IL-10 産生を増加させることが明らかとなった。さらに、DC を用いた実験では、I 型 IFN が活性化 DC の OX40L 発現を増強することを見いだした。IFN と DC との関係については、2001 年に Ito らが I 型 IFN が mDC に作用して、IL-12 産生を低下させ、逆に IL-10 産生を亢進させること、そしてこのことに対応して T 細胞を制御性 T 細胞 Tr に分化させると報告している。わ

れわれは、この結果を再現するとともに、I 型 IFN が DC の共存下に T 細胞の活性化を抑制することを観察した。IL-12 のない環境下での OX40 シグナルはナイーブ CD4 T 細胞を Th2 に分化させる方向に働くことが知られている。したがって、IFN- $\alpha$  により IL-12 産生を抑制された mDC に OX40L が発現した場合には、免疫応答を Th1 から Tr または Th2 にシフトさせる方向に働くと推測される。以上の結果から、I 型 IFN は MC および DC を介して Th1 免疫応答を制御する方向に作用することが示唆された。

#### E. 結論

I 型 IFN は MC の TNF- $\alpha$  産生と OX40L 発現を抑制し、IL-10 産生を増加させ、また、mDC の IL-12 産生を抑制することにより、間接的に Th1 免疫応答を制御する。したがって、IFN- $\beta$  の MS に対する効果の少なくとも一部には MC および DC への免疫制御的作用が関与していると考えられる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Yasushi Matsubara Toshiyuki Hori, Rimpei Morita, Shimon Sakaguchi and Takashi Uchiyama. Phenotypic and functional relationship between adult T cell leukemia cells and regulatory T cells.

- Leukemia 19:482-483, 2005.
2. Hitomi Kaneko, Toshiyuki Hori, Soshi Yanagita, Norimitsu Kadowaki and Takashi Uchiyama. Introduction of OX40 ligand into lymphoma cells elicits anti-lymphoma immunity in vivo. *Exp. Hematol.* 33:336-343, 2005.
  3. Rimpei Morita, Takashi Uchiyama, and Toshiyuki Hori. Nitric oxide inhibits IFN- $\alpha$  production of human plasmacytoid dendritic cells partly via a guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent pathway. *J. Immunol.* 175:806-812, 2005.
  4. Javier Mestas, Steve P. Crampton, Toshiyuki Hori and Christopher C. W. Hughes. Endothelial cell co-stimulation through OX40 augments and prolongs T cell cytokine synthesis by stabilization of cytokine mRNA. *Int. Immunol.*, 17:737-747, 2005.
  5. Masakatsu Hishizawa, Kazunori Imada, Tomomi Sakai, Maki Ueda, Toshiyuki Hori and Takashi Uchiyama. Serological identification of adult T-cell leukaemia (ATL)-associated antigens. *Br. J. Haematol.* 130:382-390, 2005.
  6. Tomoki Ito, Yui-Hsi Wang, Omar Duramad, Toshiyuki Hori, Guy J Delespesse, Norihiko Watanabe, F. Xiao-Feng Qin, Zhengbin Yao, Wei Cao and Yong-Jun Liu. TSLP-activated dendritic cells induce inflammatory TH2 response through OX40-ligand: a master switch of interleukin-10 and tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J. Exp. Med.* 202:1213-1223, 2005.
  7. Toshiyuki Hori. Roles of OX40 in the pathogenesis and control of diseases. *Int. J. Hematol.* 83:17-22, 2006.
  8. Tomoko Fujita, Naoya Ukyo, Toshiyuki Hori, and Takashi Uchiyama. Functional characterization of OX40 expressed on human CD8+ T cells. *Immunol. Lett.* 106:27-33, 2006.
  9. Yasushi Matsubara, Toshiyuki Hori, Rimpei Morita, Shimon Sakaguchi, and Takashi Uchiyama. Delineation of immunoregulatory properties of adult T cell leukemia cells. *Int. J. Hematol.* 84:63-69, 2006.
  10. Masahiro Kawahara, Toshiyuki Hori, Yasushi Matsubara, Katsuya Okawa, and Takashi Uchiyama. Identification of HLA class I-restricted tumor-associated antigens in adult T cell leukemia cells by mass spectrometric analysis. *Exp. Hematol.* 34:1496-1504, 2006.

11. Tomoko Fujita, Naotomo Kambe, and Takashi Uchiyama and Toshiyuki Hori. Type I interferons attenuate T cell activating functions of human mast cells by decreasing TNF- $\alpha$  production and OX40 ligand expression while increasing IL-10 production. *J. Clin. Immunol.* 26:512-518, 2006.
12. Toshio Kitawaki, Norimitsu Kadowaki, Naoshi Sugimoto, Naotomo Kambe, Toshiyuki Hori, Yoshiki Miyachi, Tatsutoshi Nakahata, Takashi Uchiyama. IgE-activated mast cells in combination with pro-inflammatory factors induce Th2-promoting dendritic cells. *Int. Immunol.* 18:1789-1799, 2006.
13. Ai Kotani, Toshiyuki Hori, Tomoko Fujita, Naotomo Kambe, Yumi Matsumura., Takayuki Ishikawa., Yoshiki Miyachi, Kenichi Nagai, Yuetsu Tanaka, and Takashi Uchiyama. Involvement of OX40 ligand+ mast cells in chronic GVHD after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transpl.* in press.
2. 学会発表
1. Kawahara, M., Hori, T., Okawa, K., Uchiyama, T. Comprehensive analysis of MHC class I peptides presented on adult T cell leukemia cells by mass-spectrometry. 47<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Hematology, Atlanta, December 10-13, 2005.
2. 松原 靖、堀 利行、内山 卓. 4-1BBL 形質導入 AML 細胞を用いた白血病特異的 CTL の誘導. 第 67 回日本血液学会総会・第 47 回日本臨床血液学会総会、横浜、2005 年 9 月 17-19 日.
3. 河原真大、堀 利行、大川克也、内山 卓. LC/MS を用いた成人 T 細胞白血病の HLAclassI 拘束性腫瘍関連抗原の探索. 第 67 回日本血液学会総会・第 47 回日本臨床血液学会総会、横浜、2005 年 9 月 17-19 日.
4. Tomoko Fujita, Naotomo Kambe, Takashi Uchiyama, and Toshiyuki Hori. Interferon- $\alpha$  suppresses cytokine production and OX40L expression in human cord blood-derived mast cells: implication for the involvement of type I interferons in the mast cell-mediated immune regulation. Keystone Symposia, Breckenridge, Colorado, April 6-11, 2006.
5. 河原真大, 堀 利行, 大川克也, 内山 卓. 成人 T 細胞白血病(ATL)に発現する HLA 拘束性腫瘍関連抗原の網羅的解析. 口演発表, 第 65 回日本癌学会学術

総会，横浜，2006年9月28-30日。

6. 河原真大，内山 卓，堀 利行.

Kpm/LATS2 は AML 細胞の抗癌剤耐性に関与する. ポスター発表，第 68 回日本血液学会総会，第 48 回日本臨床血液学会総会，福岡，2006 年 10 月 6-8 日.

7. Tomoko Fujita, Naotomo Kambe, Takashi Uchiyama and Toshiyuki Hori.

Interferon-alpha suppresses TNF-alpha production and OX40 ligand expression while it increases IL-10 production in human cord blood-derived mast cells. ワークショップ口演発表，第 36 回日本免疫学会総会・学術集会，大阪，2006 年 12 月 11-13 日.

8. Rimpei Morita, Takashi Uchiyama, Toshiyuki Hori. Atrial natriuretic peptide

suppresses IFN- $\alpha$  production of human plasmacytoid dendritic cells. 第 35 回日本免疫学会総会・学術集会、横浜、2005 年 12 月 1 日-3 日.

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

多発性硬化症の病型と治療法に関する検討

分担研究者：太田 宏平<sup>1,2</sup>

研究協力者：大橋 高志<sup>1</sup>、清水 優子<sup>1</sup>、大原 久仁子<sup>1</sup>、竹内 千仙<sup>1</sup>、岩田 誠<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 東京女子医科大学脳神経センター神経内科、<sup>2</sup> 東京理科大学理学部

研究要旨

多発性硬化症 (MS)の急性期治療としての免疫吸着療法 (IAPP) は評価が定まっていない。再発予防治療としてはインターフェロン (IFN)  $\beta$ -1b 療法が行われているが、安全に外来で導入するためのシステム作りが重要である。定期的な IAPP の再発予防治療としての確立も望まれる。我々は頭部外傷後に大脳白質に脱髄と考えられる巨大病変が出現した症例を経験したが、MS の発症機序を考える上でたいへん興味深い。

急性一亜急性期の MS 患者 4 人に対し、IAPP を施行し、いずれも中等度以上の症状改善が得られた。3 人に IFN  $\beta$ -1b の外来導入を行った。IFN  $\beta$ -1b は 2 週間毎に漸増した。いずれも自己注射手技は確立でき、1-2 週毎の外来受診で、副作用の有無は早期に確認できた。さらに、MS 患者 3 人（一部重複）に対して、予防的に IAPP を施行し、有効性を示唆する良好な結果が得られた。白質病変の精査・加療のために当科に入院した患者について、その経過と画像所見を詳細に検討した。

MS の中でも液性免疫が強く関与する一群があり、IAPP が特に有効である可能性がある。IFN を漸増することで、導入初期の副作用の発現を抑え、IFN 療法を外来で導入することができる。外傷後の脱髄巣の形成には抗体や補体が強く関与している可能性があり、多発性硬化症の発症機序を考える上で興味深いと考えた。

A. 研究目的

多発性硬化症 (MS)の急性期治療としてはステロイドパルス療法 (IVMP) が行われるが、IVMP が無効ないし治療抵抗性と考えられる患者も少なからず存在する。本邦では免疫吸着療法 (IAPP) が保険適応となっているが、その効果については評価が定まっていない。

再発予防治療としてはインターフェロン (IFN)  $\beta$ -1b 療法が行われているが、教育入院のための入院期間を捻出するのが困難なことが多く、IFN 療法の導入を遅らせる一因となっている。そのため、IFN 療法を安全に外来で導入するためのシステム作りが重要である。さらに、IFN 療法が無効ないし増悪を示す症例も少なからず存在するため、定期的な IAPP の再発寛解型 MS に対す

る再発予防治療としての確立が望まれる。

MS にはいくつかの病型が存在しており、機序によって治療法の選択が異なると考えられる。我々は頭部外傷後に大脳白質に脱髄と考えられる巨大病変が出現した症例を経験した。病変の形成には抗体や補体が強く関与している可能性があり、MS の発症機序を考える上でたいへん興味深い。

B. 研究方法

急性一亜急性期の MS 患者 4 人に対し、IAPP を施行した。内頸静脈または大腿静脈よりダブルルーメンカテーテルを留置し、トリプトファンカラム (イムソーバ TR-350<sup>®</sup>) を用いて、処理量は 2000-3000 ml とした。

IFN  $\beta$ -1b の外来導入のための医療者用プ

ロトコール、患者用クリニカルパスを作成し、IFN $\beta$ -1b 外来導入のためのシステムを構築した。IFN $\beta$ -1b は 1/4 量 (200 万単位) から開始し、2 週間毎に漸増した。3 例に IFN $\beta$ -1b の外来導入を行って、その安全性や患者満足度を評価した。

さらに、IFN 療法の導入にもかかわらず再発を繰り返す MS 患者 3 人 (一部重複) に対して、予防的に IAPP を施行し、その有効性を評価した。

また、白質病変の精査・加療のために当科に入院した患者について、その経過と画像所見を詳細に検討した。MR スペクトロスコピーを施行し病変の性質を評価した。

#### (倫理面への配慮)

本研究は過去の日常診療で実施された治療や検査結果に基づく研究であり、その遂行に当たり患者個人情報への守秘に配慮した。

### C. 研究結果

患者 1 は 31 歳の女性。IFN $\beta$ -1b 療法の導入後も再発を繰り返し、2005 年 3 月に延髄-上位頸髄レベルの再発で入院した。症状は約 2 週間かけて徐々に増悪、IVMP、IVIg を施行したが、さらに病巣が拡大し、呼吸困難が出現、IAPP を施行し、ようやく症状は改善傾向となった。

患者 2 は 34 歳の男性。IVMP を計 6 クール、IVIg を 2 回施行されたが、十分な改善が得られず、IAPP で視力障害は改善傾向となった。

患者 3 は 57 歳の女性。IFN $\beta$ -1b 療法の導後も視神経炎の再発を繰り返しているが、その都度、IAPP を行い、順調な視力の回復が得られている。3 ヶ月に 1 回の予防的 IAPP を行っており、1 年間再発は一度もみられていない。

患者 4 は 40 歳の女性。IFN $\beta$ -1b 療法の導入後に左頭頂葉の劇症型の再発で入院した。IVMP 3 クールで症状は改善傾向となり、頭部 MRI の病巣も縮小した。その後、定期的な IAPP を試みたが、それ以来、臨床

的な再発は起こしていない。

患者 5 は 35 歳女性。IFN $\beta$ -1b 療法の導入後、頻回に再発がみられるようになった。再発時に IAPP を施行したところ、直後より急速な視力の回復がみられた。定期的に IAPP を行い、それ以降再発がみられなくなった。妊娠のため、すべての治療を中止したところ、妊娠 4 ヶ月で両側性の視神経炎で再発した。IAPP を施行し、視力は回復傾向となった。

結果のまとめとしては、急性-亜急性期の MS 患者 4 人では、IAPP により、いずれも中等度以上の症状改善が得られ IAPP の再発予防効果についても有効性を示唆する良好な結果が得られた。

外来で IFN 療法を導入した 3 例は看護師の入念な指導より、いずれも自己注射手技は確立できた。1-2 週毎の外来受診で、臨床検査上の異常所見の有無や、注射部位反応の変化は早期に確認できた。

いずれの症例も感冒様症状は軽く、注射部位反応も発赤程度の軽微なものに留まった。

患者 6 は 59 歳の男性。酩酊状態で自転車に乗り転倒、右顔面を強打した。第 37 病日から右下肢の感覚障害、脱力が進行し、第 51 病日から右片麻痺が急速に増強した。頭部 MRI では、左頭頂葉にリング状の増強効果を示す巨大病変を認めた。IVMP を 5 クール施行したが、症状に明らかな改善はなかった。さらに、95 病日頃から急速に失語が進行病巣も拡大した。

### D. 考察

T 細胞性免疫が主体である MS に血液浄化療法が有効な理由としては、サイトカインの産生を変化させ、T ヘルパー 1 系細胞の免疫応答を促進して T ヘルパー 1 / T ヘルパー 2 バランスを改善することによるとされている。一方で、MS の病態に B 細胞や抗体が関与していることも古くから知られている。

Lucchinetti らは、MS が病理学的に 4 型に分類できることを示し、そのうち第 2 型で

は脱髄巣における抗体・補体の沈着が特徴的であることを示した。さらに彼らは第2型の患者における劇症型の再発に対して血漿交換 (PE) が有効であることを報告した。

Schmittらは、PE群とIAPP群ではほぼ同等の治療効果が得られたと報告している。さらに、野村らは、定期的にIAPPを施行するによって再発寛解型MSの再発率が有意に低下することを報告している。

今回検討した患者では、急性期の治療としては全例で中等度以上の改善が得られたと考えている。予防効果については、IAPPを定期的に施行している間は最長1年の間、一人も再発がなかった。まだはっきりしたことは言えないが、IAPPにはある程度の再発予防効果はあるという印象を持っている。

IFNの導入時にIFN $\beta$ -1bを漸増することで、とりわけ導入初期にみられる感冒様症状、注射部位反応、全身倦怠感などの副作用の発現を抑えることができるため、外来導入が可能となる。

外来導入を安全に行うためには看護師の積極的な介入が不可欠であり、また、導入後も継続的に指導、支援を行うことが大切である。

さらに、医師、看護師間の連携を深めることが重要であり、そのために、クリニカルパスを活用することはたいへん有用であると考えられる。

外傷を契機にMSが発症することはCharcotの時代から知られているが、外傷とMSの発症には相関がなかったとする報告がほとんどであり、外傷とMSの発症の関連についてはまだ十分な結論が出ていない。Lucchinettiのいう第2型では、特に病巣の辺縁にマクロファージの集積があり、MRIではリング状にenhanceされることも示されている。従って、本症例のようにリング状のenhancementを示すtumefactive lesionの形成には抗体や補体が強く関与している可能性があり、外傷後の脱髄病巣の形成機序を考える上で興味深いと考える。

## E. 結論

MSの中にも液性免疫が強く関与する一群があり、IAPPが特に有効である可能性がある。とりわけ視神経脊髄型MSの劇症型の再発や、IVMPが無効ないし効果不十分な治療抵抗例には積極的にIAPPを考慮すべきであると考ええる。また、妊娠中にも比較的安全に用いることができ、再発時の治療法としても有用である。さらに、MSの寛解期の予防的治療の選択肢としても今後検討すべきであると考えられる。

IFNを漸増することで、導入初期の副作用の発現を抑え、IFN療法を外来で導入することができるようになった。看護師が積極的に介入することで、安全、かつスムーズにIFN療法を導入、継続することができた。医師、看護師間の連携を深め、患者の不安を軽減する上で、クリニカルパスの活用はたいへん有用である。

頭部外傷後に大脳白質に脱髄と考えられる巨大病変が出現した症例を経験した。症状は外傷後1ヶ月以上経過してから出現、病巣は3ヶ月以上かけて拡大・進展し、ステロイドパルス療法に抵抗性であった。脱髄巣の形成には抗体や補体が強く関与している可能性があり、MSの発症機序を考える上で興味深いと考えた。

## F. 健康危険情報 なし

## G. 研究発表 I 論文発表

### 原著

- 1) 中村智美、太田宏平、丹羽直樹、竹内恵、内山真一郎、岩田誠：眼球挫傷をともなう頭部外傷後に大脳白質散在性病変が出現した1例。臨床神経学 44:108-110, 2004
- 2) Shimizu Y, Ota K, Kawahata K, Ohara K, Ohashi T, Iwata M: Induction of CD4+CD25+high regulatory T cells and expression for FOXP3 mRNA by



Interferon- $\beta$  1b in multiple sclerosis patients. *J Neurol Sci* 238 (supple 1): S246, 2005

- 3) 大橋高志、太田宏平、清水優子、大原久仁子、竹内千仙、岩田誠：インターフェロン $\beta$ -1b療法の導入法と副作用の対応に関する検討. *神経免疫学* 13: 101, 2005.
- 4) 清水優子、太田宏平、川畑仁人、大原久仁子、大橋高志、岩田誠：IFN- $\beta$  1bを投与した多発性硬化症患者末梢血のCD4+CD25+high制御性T細胞とFoxP3遺伝子発現の検討. *神経免疫学* 13: 103, 2005
- 5) 清水優子、太田宏平、川畑仁人、大原久仁子、大橋高志、岩田誠. IFN- $\beta$  1bを投与した多発性硬化症患者末梢血のCD4+CD25+high制御性T細胞とFoxp3遺伝子発現の検討. *東京女子医大総研紀要* 25: 61-62, 2005
- 6) 大橋高志、太田宏平、清水優子、大原久仁子、竹内千仙、岩田誠：多発性硬化症におけるインターフェロン $\beta$ -1b療法の外来導入の実際. *東京女子医科大学雑誌* 76, 205-211, 2006.
- 7) 清水優子、太田宏平、川畑仁人、大原久仁子、大橋高志、岩田誠：多発性硬化症における調節性T細胞とFOXP3 mRNA発現の検討(第2報). *神経免疫学* 14: 49, 2006.
- 8) 大橋高志、太田宏平、清水優子、大原久仁子、竹内千仙、岩田誠：多発性硬化症における免疫吸着療法の実際. *神経免疫学* 14: 52, 2006.

#### 総説

- 1) 太田宏平：多発性硬化症の免疫学・免疫遺伝学. *Modern Physician* 24: 1824-1828, 2004

#### II 学会発表

##### 国際学会

- 1) Takeuchi C, Ota K, Shimizu Y, Ohashi T, Ohara K, Ono Y, Iwata M: Interferon  $\beta$  1-b

treatment may reverse the axonal dys-function in multiple sclerosis. 7<sup>th</sup> Inter-national Congress of Neuroimmunology, 2004. 10, Venice.

- 2) Shimizu Y, Ota K, Ohara K, Ohashi T, Iwata M: Induction of CD4+CD25+ high regulatory T cells and expression for FOXP3 mRNA by Interferon- $\beta$  1b in multiple sclerosis patients. XVIIth World Congress of Neurology, 2005. 11, Sydney.
- 3) Ohashi T, Ota K, Shimizu Y, Ohara K, Takeuchi C, Iwata M: Immunoabsorption plasma pheresis therapy for the treatment of refractory attacks of multiple sclerosis. The 8th International Congress of Neuroimmunology, 2006. 10, Nagoya.
- 4) Shimizu Y, Ota K, Kawahata K, Ohara K, Ohashi T, Iwata M: Modification of Interferon-b1b on CD4+CD25+high regulatory T cells and expression of FOXP3 mRNA in multiple sclerosis. The 8th International Congress of Neuroimmunology, 2006. 10, Nagoya.
- 5) Ohara K, Ota K, Shimizu Y, Ohashi T, Iwata M: Depression score in multiple sclerosis patients. The 8th International Congress of Neuroimmunology, 2006. 10, Nagoya.
- 6) Takeuchi M, Ota K, Ohashi T, Shimizu Y, Mochizuki A, Kimura Y, Iijima M, Masuda Y, Ubano M, Iwata M: Peripheral neuropathy in patients with multiple sclerosis. The 8th International Congress of Neuroimmunology, 2006. 10, Nagoya.

##### 国内学会

- 1) 大橋高志、太田宏平、竹内千仙、大原久仁子、清水優子、岩田誠：多発性硬化症の診断、McDonaldの診断基準をもちいて. 第45回日本神経学会総会、2004. 5、東京
- 2) 清水優子、太田宏平、大原久仁子、大橋高志、岩田誠：IFN- $\beta$  1b療法を行った多発性硬化症患者末梢血の免疫調節細胞および細胞傷害活性の経時的変化. 第45回神経学会総会、2004. 5、東京

- 3) 大原久仁子、清水優子、太田宏平、岩田誠: 多発性硬化症のIFN- $\beta$ 療法による細胞内サイトカインの変化. 第45回神経学会総会、2004. 5、東京
- 4) 朴千仙、太田宏平、清水優子、大原久仁子、大橋高志、岩田誠: 多発性硬化症の $^1\text{H-MRS}$ . 第45回神経学会総会、2004. 5、東京
- 5) 太田宏平: 慢性・再発性ヘルペス脳炎. 第39回脳のシンポジウム、2004. 3、東京
- 6) 大橋高志、太田宏平、清水優子、大原久仁子、竹内千仙、岩田誠: インターフェロン $\beta$ -1b療法の導入法と副作用の対応に関する検討. 第17回日本神経免疫学会学術集会、2005.3、福岡
- 7) 清水優子、太田宏平、川畑仁人、大原久仁子、大橋高志、竹内千仙、岩田誠: IFN- $\beta$ 1bを投与した多発性硬化症患者末梢血のCD4+CD25+high制御性T細胞とFoxp3遺伝子発現の検討. 第17回日本神経免疫学会学術集会、2005.3、福岡.
- 8) 大橋高志、太田宏平、清水優子、大原久仁子、竹内千仙、岩田誠: インターフェロン $\beta$ -1b療法の外来導入に関する検討. 第46回日本神経学会総会、2005.5、鹿児島
- 9) 大原久仁子、清水優子、太田宏平、竹内千仙、大橋高志、岩田誠: インターフェロン- $\beta$ 1bによる多発性硬化症の細胞内サイトカインの変化. 第46回日本神経学会総会、200.5、鹿児島
- 10) 清水優子、太田宏平、川畑仁人、大原久仁子、竹内千仙、大橋高志、岩田誠: 多発性硬化症の調節性T細胞とFoxp3遺伝子発現についての検討. 第46回日本神経学会総会、2005.5、鹿児島
- 11) 太田宏平、大澤美貴雄、大橋高志、清水優子、飯嶋睦、岩田誠. 多発性硬化症における事象関連電位. 第8回日本薬物脳波学会、2005.7、横浜
- 12) 清水優子、太田宏平、川畑仁人、大原久仁子、大橋高志、岩田誠: 多発性硬化症における調節性T細胞とFOXP3 mRNA発現の検討 (第2報). 第18回日本神経免疫学会学術集会、2006.3、名古屋
- 13) 大橋高志、太田宏平、清水優子、大原久仁子、竹内千仙、岩田誠: 多発性硬化症における免疫吸着療法の実際. 第18回日本神経免疫学会学術集会、2006.3、名古屋
- 14) 大橋高志、太田宏平、丸山恵子、大原久仁子、竹内千仙、岩田誠: 頭部外傷後に大脳白質に巨大病変が出現した1例. 第8回Neuroimmunology Conference、2006.4、東京
- 15) 中島一郎、深澤俊之、太田宏平、野原千洋子、蕨陽子、大橋高志、宮沢イザベル、藤原一男、糸山泰人: 視神経脊髄型多発性硬化症の多様性と変化. 第47回日本神経学会総会、2006.5、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

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
総合研究報告書

arundic acid (ONO-2506) による慢性進行型・再発寛解型 EAE の抑制  
— ONO-2506 は多発性硬化症の予防薬となるか —

分担研究者 野村恭一 埼玉医科大学 総合医療センター 教授  
共同研究者 富岳 亮、滝沢功一、大貫 学、  
三井隆男、木下俊介、高濱美里、井口貴子

研究要旨

arundic acid (ONO-2506) は astrocyte の異常活性化を抑制することが知られ、現在、急性期脳梗塞の治療薬として注目されている。myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) のアミノ酸配列 35-55 残基を抗原として、①慢性進行型 EAE (C57BL6 マウス)、②再発寛解型 EAE (NODLT マウス) を作製し、ONO-2506 を 30mg/kg/日、抗原接種当日から 30 日、60 日間、連日あるいは隔日に経口投与し、神経症候を検討した。なお、病理組織学的検討は ONO-2506 連日投与群の 30 日、60 日目において施行した。

結果：①慢性進行型 EAE では、ONO-2506 連日ならびに隔日投与群は EAE 対照群に比べ神経症候の発現が遅延し、また明らかな軽症化を示した。病理組織学的検討は、ONO-2506 連日投与群は EAE 対照群に比べて脳・脊髄における総計病巣数の明らかな減少を認めた。②再発寛解型 EAE では、ONO-2506 連日ならびに隔日投与群は EAE 対照群に比べ初回および再発時の神経症候を抑制した。病理組織学的検討では、ONO-2506 連日投与群は EAE 対照群に比べ脳・脊髄における総計病巣数の減少を認めた。

以上より、ONO-2506 は多発性硬化症の再発・進行を抑制する経口治療薬となる可能性が示唆された。

A. 研究目的

再発再発寛解型の多発性硬化症 (RR-MS) の再発予防として、現在、インターフェロン (INF) 治療が行われているが、全症例に有効ではなく、一部の症例においては十分な再発を抑制しえないことを経験する。このような INF 治療抵抗性の症例においては新たな再発予防薬の開発が求められている。

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。

B. 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 (MOG35-55) を用い、EAE を誘導した。100  $\mu$ g/マウスを両側の単徑部皮下に分注、接種した。神経症候の発現を確実に安定化させるために pertusis 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、抗原接種当日より 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/日を抗原接種当日から 30 日間連日または隔日投与した。

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) 連日または隔日投与した。

病理学的検討: ONO-2506 連日投与群と非投与群 (EAE 対照群) は、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 スライスおきに 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。

なお、実験に使用した動物は、実験用に認められた動物であり、実験終了に伴い一酸化炭素による安楽死とし、病理組織学的検討

のための組織標本を作製した。

### C. 研究結果

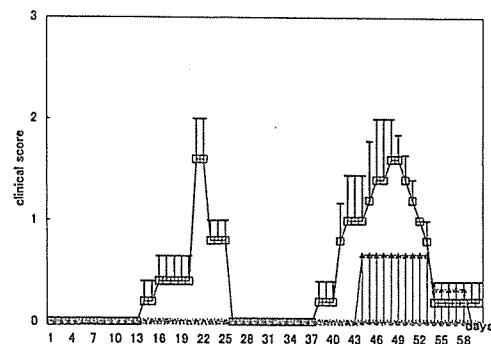
臨床症状:

慢性進行型 EAE モデルの検討 (C57BL/6 マウス)

① コントロール群 ( $\square$ ) は、抗原接種後 12 日に神経症候を発現し、その後、平均臨床スコアは徐々に増悪を認め、26 日に 3.4 に達し 30 日まで持続した。

② ONO-2506 連日投与群 ( $\triangle$ ) は、13 日に神経症候を発現し、23 日から 25 日にかけて平均臨床スコアは 2.25 に達し、その後 1.75 に軽減した。

③ ONO-2506 隔日投与群 ( $\circ$ ) は、20 日に平均臨床スコア 0.667 の神経症候を発現し、21 日から 0.33 に軽減し、その後 30 日まで持続した。



再発寛解型 EAE モデルの検討 (NODLT マウス)

④ コントロール群 (+) は、抗原接種後 14 日に神経症候を発現し、21 日に平均臨床スコア 1.6 のピークを示し、26 日に改善する 1 回目の EAE を認め、抗原接種後 38 日に 2 回目の EAE を発現、48 日に平均臨床スコア 2 のピークを示し、54 日に改善した。

⑤ ONO-2506 60 日間連日投与群 ( $\triangle$ ) は、抗原接種後 21 日から 25 日にかけて平