

例が男性であった。(表1) 年齢は、18歳から56歳で、発症からIFN-β導入までの期間は半年～36年であった。全ての症例でIFN-β導入前から視神経炎を認め、うち3例では患側の失明をきたしていた。脊髄病変は5例で見られ、4例では3椎体以上に及ぶ脊髄病変を呈していた。視神経、脊髄以外の中枢神経病変は5例に認められた。3例で薬剤過敏のエピソードがあり、自己抗体陽性例や自己免疫疾患の家族歴を有する症例が4例認められた。

IFN-β投与後2～67日に、主治医の目から見てそれまでの経過からは想像しがたい症状増悪を呈し、対麻痺3例、四肢麻痺2例、片麻痺1例、視力障害2例、髄膜炎2例を認めた。増悪巣は脊髄6例、視神経2例、大脳白質1例、脳幹1例であった。増悪後の各種治療に対する反応は5例で不良であり、4例が歩行不能の後遺症を残した。

考察

本検討においてはIFN-β投与後の症状増悪の判断基準を主治医の判断によったという点で、公平さに欠ける点が問題と考える。これらの症状増悪が自然経過での再発を見ている可能性もあり、IFN-βの副作用とは断定できず、IFN-β投与全例の経過を解析した上での判定が必要と考える。

また、症例選択の妥当性についての考察が必要と考えた。

我々の症例の中には薬剤過敏症を有する症例や、自己抗体や自己免疫疾患の家族歴を有する症例が複数認められた。多発性硬化症はTh1優位の疾患であると考えられ、IFN-βが

ヘルパーT細胞のバランスをTh2優位にすることを考えると、我々の症例の免疫学的背景が症状増悪に関与した可能性も考えられた。

更に、我々の症例はいずれも最終的に視神経、脊髄に病変を来とし、失明は4例、3椎体以上の脊髄病巣は全例に認められた。また、視神経、脊髄以外の中枢神経病変も全例に認められたが、SIADH症例が2例、吃逆で発症した症例が1例など、多発性硬化症の中枢病変としては典型的でない部分もある。Neuromyelitis Opticaに関してはWingchukらは2006年のneurologyに疾患概念の再考を提案しており、我々の症例についてNeuromyelitis Opticaとの関連を考察する必要があると考えた。

結論

関連8施設の協力を得て、IFN-β投与後に症状増悪を呈した多発性硬化症症例を抽出し、臨床像を検討した。1例は後にSjogren症候群が判明し、6例は視神経炎と3椎体以上の脊髄病変を有する多発性硬化症症例であった。いずれの症例もIFN-βが症状悪化に関与したと断定することは不可能であるが、増悪症状は重篤かつ、不可逆性の経過をとる例が多数であった。多発性硬化症に対してIFN-βを用いるにあたっては、個体の免疫学的背景や病型についての検討が必要であると考えた。

健康危険情報

増悪例に対する非介入観察研究である。

特許取得：なし

表 1 IFN-β 投与前後の各症例の徴候

症例	1	2	3	4	6	7
性別	F	F	F	M	F	F
発症年齢 (Y)	29	54	56	18	52	41
発症～IFN 投与 (Y)	10	0.5	36	1	10	0.8
視神経炎	+ (*)	+	+ (*)	+	+ (*)	+
脊髄病変	+ (**)	-	+ (**)	+ (**)	+ (**)	+
視神経脊髄以外の 中枢病変	大脳白質 中脳	大脳白質 SIADH	吃逆で発症 大脳白質	-	+	SIADH
その他	抗核抗体 陽性	薬剤過敏症 抗 SS-A/B 抗体陽性	薬剤過敏症 (IFN-β)		バセドウ病 の家族歴	薬剤過敏症 抗 TPO 抗体 陽性
IFN 投与後増悪まで (D)	2	45	53	22	60	23
増悪巣	胸髄 視神経	視神経 脳幹 頸胸髄	頸胸髄	胸髄 大脳	頸髄	頸胸髄
増悪症状	視力低下 対麻痺	失明 四肢麻痺 呼吸不全	対麻痺	片麻痺	髄膜炎 四肢麻痺	髄膜炎 対麻痺
増悪時治療	m-PSL pulse IVIg リンパ球 除去	m-PSL pulse IVIg	m-PSL pulse	m-PSL pulse アザチオ プリン	m-PSL pulse	m-PSL pulse 抗生剤
EDSS 変化	5.5→7.5	6.5→9.5	6.5→9.0	3.0→7.5	5.0→9.0	4.0→9.0
現在の EDSS	4.5	9.5	8.5	3	9.5	9

*失明 **連続する 3 椎体以上の脊髄病変

免疫性神経疾患に対する血液浄化療法 212 回の臨床的検討

班 員 埼玉医科大学 総合医療センター 神経内科 野村 恭一

共同研究者 埼玉医科大学 総合医療センター 神経内科

王子 聡, 伊崎 祥子, 小島 美紀, 吉田 典史, 高濱 美里

井口 貴子, 山里 将瑞, 大熊 彩, 三井 隆男, 大貫 学

埼玉医科大学 総合医療センター 人工腎臓部

金山 由紀, 小川 智也, 松田 昭彦, 松村 治

埼玉医科大学病院 神経内科 木下 俊介, 富岳 亮

【研究要旨】

各種の免疫性神経疾患に対する血液浄化療法の有効性が報告されているが, これまでに有効性・安全性などに関する総括的な報告はない. 各種の免疫性神経疾患に対して合計 212 回の血液浄化療法 (PP:Plasmapheresis) を施行し, その有効性ならびに安全性について検討した. 各種神経疾患に対する有効性の検討では, 重症筋無力症 MG 28 / 35 例 (80%), ギラン・バレー症候群 GBS 4 / 5 例 (80%), 多発性硬化症 MS 18 / 24 例 (75%), 横断性脊髄炎 ATM 2 / 3 例 (67%), 慢性炎症性脱髄性多発神経根炎 CIDP 1 / 3 例 (33%), 急性散在性脳脊髄炎 ADEM 1/1 例 (100%) で明らかな改善 (著効・有効を含む) を認めた (図 1). 安全性の検討では, 有害事象として主に施行中の血圧低下 59 / 212 回 (28%) を認めた (図 4). PP 療法は, 施行初期の血圧低下に留意すれば, 安全で有効性の高い治療法である.

【研究対象・方法】

2004 年 2 月から 2006 年 12 月までの約 3 年間で, 埼玉医科大学総合医療センター神経内科に入院した各種免疫性神経疾患: 重症筋無力症 MG (35 症例), 多発性硬化症 MS (24 症例), ギラン・バレー症候群 GBS (5 症例), 慢性炎症性脱髄性多発神経根炎 CIDP (3 症例), 急性横断性脊髄炎 ATM (3 症例), Crow-Fukase 症候群 (3 症例) など計 73 症例を対象とした.

PP 療法は, 免疫吸着療法 (IAPP: Immuno Adsorption Plasmapheresis), 二重膜濾過血

【研究目的】

各種の免疫性神経疾患に対して合計 212 回の血液浄化療法 (PP:Plasmapheresis) を施行し, その有効性ならびに安全性について検討した.

埼玉医科大学総合医療センター 神経内科

埼玉県川越市鴨田辻堂町 1981

漿交換療法 (DFPP: Double Filtration Plasmapheresis), 単純血漿交換療法 (PE : Plasma Exchange) を含めて合計 212 回施行した。

有効性の判定は, PP 療法施行 1・2 週間後における神経症候について検討し, 著効 (完全回復)・有効・不変・増悪の 4 段階で評価した。また, 安全性の判定は, 有害事象: 自覚症状を含めた副作用, 臨床検査値異常について検討した。なお, MS ならびに ATM に対する PP 療法は, 十分なステロイドパルス療法施行するも明らかな改善を認めなかった症例において, IAPP を第一選択として PP 療法を施行した。倫理面への配慮として PP 療法施行にあたり全施行例において十分な説明を行い, 同意を得て施行した。

【研究結果】

PP 療法 212 回の内訳は, IAPP 197 回 (トリプトファンカラム 184 回, フェニルアラニンカラム 5 回, デキストラン硫酸カラム 8 回), DFPP 6 回, PE 9 回であった。

各種神経疾患に対する有効性の検討では, MG 28 / 35 例 (80%), GBS 4 / 5 例 (80%), MS 18 / 24 例 (75%), ATM 2 / 3 例 (67%), CIDP 1 / 3 例 (33%), ADEM 1/1 例 (100%) で明らかな改善 (著効・有効を含む) を認めた (図 1)。MG では 2 例 (6%) において PP 施行後に著効し, 完全回復を認めている。また, MG 35 症例のうち 32 症例で, 施行後 2 週間まで follow up した。その MG 32 症例における著効・有効を含めた有効率は, 施行 1 週後では, 27 / 32 (84.1%) であり, 施行 2 週後では, 18 / 32

(56%) であった (図 2)。

MS 24 症例のうち 21 症例 (88%) が 3 椎体以上の脊髄病変 (LCL: Long Cord Lesion) を有し, これら症例では 15 / 21 例 (71%) において有効性を認めた (図 3)。その他, 視神経炎 1 例, テント上病変を有する 2 例のいずれにおいても有効性を認めた。

安全性の検討では, 有害事象として施行中の血圧低下 59 / 212 回 (28%), カテーテル穿刺部の出血傾向 32 / 212 回 (15%), 深部静脈血栓症 1 / 212 回 (0.5%) であった。さらに, 血圧低下の検討では, PP 開始から 60 分以内に出現したものが 44 / 59 回 (75%) であり, PP の種類には関連性を認めなかった (図 4)。

抗凝固薬 (ヘパリン, 低分子ヘパリン, メシル酸ナファモスタット) と血圧低下の検討では, 60 分以内に血圧低下を認めた 44 症例と抗凝固薬との直接的な関連性はないが, 60 分以降に血圧低下を認めた 15 症例はヘパリン使用が大半であり, メシル酸ナファモスタット使用例は 4 例と少数例であった。

臨床検査値異常として, 白血球低下・増加, 免疫グロブリン値の低下などを認めた。

【考 察】

各種免疫性神経疾患に対する PP 療法の治療メカニズムとして, ①病因となる液性因子の除去, ②血清サイトカインの除去を始めとする体外免疫調節作用が考えられる。

LCL を有する MS の病因の一つとして, 抗 Aquaporin4 抗体 (抗 AQP4 抗体) の関与が報告されているが, 今回の我々が検討した

MS 24 症例のうち 21 症例(88%)が LCL を有しており、これら症例に対する PP 療法は 15 / 21 例(71%)において高い有効性を認めた。その治療メカニズムの一つとして、PP による抗 AQP4 抗体の除去が考えられた。今後の更なる検討が必要である。

PP 施行中の血圧低下の機序として、循環血漿量の減少、ブラジキニン・ショックなどが考えられる。今回の我々の検討では、血圧低下の出現時期は①開始から 60 分以内のもの 44 / 59 回(75%)、②開始後 60 分以降のもの 15 / 59 回(25%)の 2 群に分けられた。開始後 60 分以内の血圧低下症例は、使用した抗凝固薬の種類と関連はなく、血圧低下の機序としては、主に循環血漿量の減少によるものと思われた。一方、開始後 60 分以降の血圧低下症例では、抗凝固薬としてヘパリン使用例が大半であり、メシル酸ナファモスタットは 4 例のみであった。

一般に IAPP におけるブラジキニン・ショックの発生機序としては、陰性荷電した吸着カラムにおいて内因性凝固因子が活性化され、その結果ブラジキニンが産生されることとされている。今回の我々の検討では、60 分以降の血圧低下例のうちメシル酸ナファモスタット使用例が少数であったことより、メシル酸ナファモスタットがブラジキニン・ショックを抑制した可能性が高いと思われる。PP 施行中の、特に 60 分以降における血圧低下と、メシル酸ナファモスタットによるブラジキニン産生抑制に別ファイルで図表あり

関して、今後の検討を要する。

今回の我々の検討では、1 症例に対して PP 療法を 2~3 回施行した。しかし 1 症例に対する PP 療法の施行回数、1 回の PP 療法の血漿処理量に関して、十分な検討が行われていない。今後、病態・重症度に合わせた至適施行回数・血漿処理量についての更なる検討が必要である。

【結論】

各種免疫性神経疾患に対する PP 療法は、施行初期の血圧低下に留意すれば、安全で有効性の高い治療法であることが示された。

【文 献】

- 1) 新版アフェレシス・マニュアル 日本アフェレシス学会編

【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

3 椎体以上の脊髄病変をもつ多発性硬化症(LCL-MS)患者 3 例に対するリツキシマブの効果

班 員 宇多野病院神経内科 田中正美
共同研究者 宇多野病院神経内科 ○今村久司 大野美紀 田原将行
澤田秀幸 齋田孝彦

要旨

3 椎体以上の脊髄病変をもつ多発性硬化症(LCL-MS)は、Wingerchuk らの提唱する NMO とほぼ同義で、難治であるが、Cree らが NMO へのリツキシマブ投与により 8 例中 6 例で再発が 0 になり、年間再発率の減少、EDSS も改善したと報告した。我々は、抗アクアポリン 4 抗体陽性 LCL-MS 患者 3 例に対して、リツキシマブ投与を行った。再発頻度は減少し、再発の重症度も改善したが今後のフォロー、データの蓄積が必要である。

はじめに

3 椎体以上の病変を有する多発性硬化症(ここでは LCL-MS とする)は、視神経、脳幹、脊髄中心に再発を繰り返す難治性の疾患である。

LCL-MS には高率に抗アクアポリン 4 抗体が検出される。また病変に IgG や補体の沈着が見られることなどから自己免疫機序が存在すると考えられている。

B 細胞除去療法は B 細胞陽性悪性リンパ腫だけでなく、自己免疫疾患で大きな効果を上げており、自己免疫機序が示唆されている LCL-MS に対してもリツキシマブの効果期待される。2005 年 Cree らは、NMO 8 例中 6 例で年間再発率が 0 になったという報告した。

当院での倫理委員会での承認に基

づき、抗アクアポリン 4 抗体陽性で、他の治療で再発を抑制しきれない 3 例の LCL-MS/NMO の患者に対してリツキシマブの投与を行った。

症例 1 53 歳女性

2002 年両下肢のしびれ感で多発性硬化症を発症、視神経、脊髄に再発を繰り返した。IFN β 1b、ミゾリビン、メソトレキセート、免疫グロブリン療法、定期パルス療法など施行するが効果なく、2006 年になり 1 ヶ月に 1 回程度の再発を繰り返したため、2006 年 5 月 15 日リツキシマブを導入した。リツキシマブ 500mg を 1 週ごとに 2 回投与し、経過を見ていたが 7 月 7 日に頸髄に再発。さらに 500mg を 4 回追加した。その後、11 月 30 日に視神経に再発。いずれもステロイドパルスで速やかに軽快した。

症例 2 30 歳女性 (台湾人)

2002 年視力低下で発症、2003 年の再発の際、UCLA 附属病院で多発性硬化症と診断を受けた。ステロイドパルス、血漿交換、免疫グロブリン療法を行われたが、十分な効果がなかった。シクロフォスファミドのパルスも開始されたが、再発を繰り返した。2004 年 7 月にリツキシマブ 500mg を 1 週ごとに 4 回投与され、その後、しばらく再発はみられなかった。

2004 年 11 月 10 日、当院初診時、造影病変があり 1 度パルスを行ったが明らかな自覚的な増悪は 2005 年 2 月までなかった。また、2005 年 1 月からミトキサントロンを導入したが頻回の再発を繰り返すため、2006 年 7 月 31 日からリツキシマブを導入、500mg を 1 週ごとに 4 回投与した。9 月 18 日に下肢の脱力、しびれ感を軽度認めステロイドパルスを行ったが、1 日で回復。その後、再発を認めていない。

症例 3 42 歳女性

2003 年 1 月胸部の異常感覚 (びりびり感) で発症、その後も頸髄、胸髄に再発を繰り返し、ステロイドパルスが行われた。血漿交換もステロイドパルスが十分でないときに行われたが十分な効果はみられなかった。2005 年 4 月 IFN β 1b を開始。2005 年 11 月ミゾリビンを導入したが、頻回の再発を繰り返すため 2006 年 10 月 12 日からリツキシマブを 500mg を 1 週ご

とに 4 回投与した。その後、現在まで、再発を認めていない。

考察

当院の 3 症例では、IFN β 1b やミゾリビン、ミトキサントロン、ステロイドの持続内服など行われたにもかかわらず、リツキシマブ投与前 12 ヶ月間での再発回数はそれぞれ、8 回、8 回、7 回であったが、投与後は、2 回/7 ヶ月、1 回/4 ヶ月、0 回/2 ヶ月となった。

いずれもリツキシマブ投与後は、再発頻度が減少しており、再発時のステロイドパルスへの反応も良好であった。

リツキシマブは、この 3 症例からも大きな効果を上げることが期待されるが、これらの症例の長期の経過観察や今後さらなる症例の蓄積により、リツキシマブの認容性や効果を実証する必要がある。

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

実験的自己免疫性脳脊髄炎の病態における複合型ガングリオシドの関与について

分担研究者 楠 進¹⁾

共同研究者 宮本勝一¹⁾、高田和男¹⁾、古川鋼一²⁾

研究要旨

ガングリオシドは神経細胞膜に豊富に存在し神経機能を調節している。免疫性末梢神経疾患では、抗ガングリオシド抗体が病態のマーカーであり、末梢神経障害に直接関与していることが知られている。一方、免疫性中枢神経疾患の病態とガングリオシドの関係について十分な検討は行われていない。本研究では、ガングリオシド合成酵素欠損マウス (GM2/GD2-KO) に対して実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を誘導して検証した。GM2/GD2-KO に active immunization EAE を誘導すると野生型マウス (Wt) と比較して発症が遅延した。Adoptive transfer EAE では、Wt 由来の抗原反応性 T 細胞を Wt と GM2/GD2-KO 各々に移入したところ GM2/GD2-KO では EAE 発症が遅延した。以上から、複合型ガングリオシドは細胞障害性 T リンパ球の血液脳関門透過性やミエリンへの接着などに影響を及ぼしている可能性が考えられた。

研究目的

ガングリオシドは神経細胞膜に豊富に存在しており、ニューロンの分化促進、シナプス伝達の長期増強促進など、神経機能の調節に関わっていることが報告されている。急性の四肢筋力低下を主徴とする末梢神経障害であるギラン・バレー症候群や IgM パラプロテイン血症を伴うニューロパチーでは、多くの例で血清中抗ガングリオシド抗体の上昇を認める。抗 GD1b 抗体は深部感覚障害性失調を呈するニューロパチーで特異的にみられるが、ウサギを GD1b で感作すると、後根神経節の大径一次感覚ニューロンが選択的に障害され

る自己免疫性ニューロパチーが出現する。その他 Gal-C や GM1 などの感作によりウサギで明らかな症状をきたすニューロパチーのモデル動物が得られており、糖脂質に対する抗体は、末梢神経障害の病態に直接関与している因子であると考えられる。一方、免疫性中枢神経疾患の病態とガングリオシドの関係については、ガングリオシドの投与が実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を軽症化するという報告やガングリオシドを含む糖脂質に対する免疫反応が EAE の重症度を修飾するなどの報告があるが、これまで十分な検討は行われていない。

本研究では、多発性硬化症の動物モデルである EAE を用いて、神経系細胞や免疫担当細胞におけるガングリオシドの意義を検証した。

1) 近畿大学医学部神経内科
2) 名古屋大学医学部生化学

研究方法

名古屋大学・古川綱一教授により作成された GM2/GD2 合成酵素欠損マウス (GM2/GD2-KO)¹⁾に、myelin-oligodendrocyte glycoprotein (MOG)を用いて EAE を誘導し、野生型マウス (Wt) と比較した。また adoptive transfer を施行して、病態を詳細に解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は「動物の保護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」、「動物の処分方法に関する指針」、および(社)日本実験動物学会の「動物実験に関する指針」を遵守し、実験手技によって動物に苦痛が及ばないように最大限の配慮を行った。マウスの飼育数は、最小限の動物数で最大限の研究成果があがるように計画した。

研究結果

GM2/GD2-KO に active immunization EAE を誘導すると、Wt と比較して症状の重症度は変わらなかったが、発症が遅延した (図)。Adoptive transfer EAE では、GM2/GD2-KO と Wt 由来の MOG 特異的 T 細胞を、各々別の

Wt に移入し、EAE 症状を観察したところ、両群間で差異はなかった。次に、Wt 由来の MOG 特異的 T 細胞を Wt と GM2/GD2-KO 各々に移入したところ、GM2/GD2-KO では EAE 発症が遅延した。

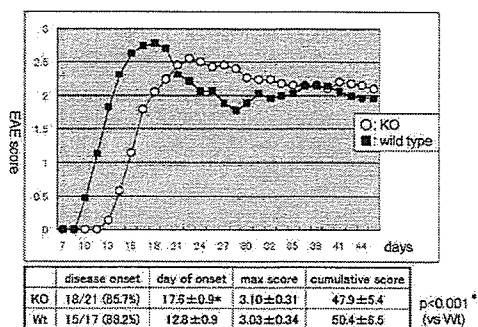
結論

以上の結果から、複合型ガングリオシドの存在を欠くと EAE 発症が遅延すると考えられた。複合型ガングリオシドの有無は T リンパ球の活性化および活性化された T リンパ球の機能には影響を与えない。一方、活性化細胞傷害性 T リンパ球の血液脳関門透過性やミエリンへの接着などに影響を及ぼしている可能性が考えられた。今後、さらなる検討が必要である。

文献

1) Takamiya K, Yamamoto A, Furukawa K, et al. Mice with disrupted GM2/GD2 synthase gene lack complex gangliosides but exhibit only subtle defects in their nervous system. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996; 93:10662

図 active immunization EAE



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

実験的自己免疫性脳脊髄炎に対する フリーラジカルスカベンジャーの効果の検討

分担研究者 佐古田三郎

共同研究者 森谷真之、中辻裕司

研究要旨

多発性硬化症 (MS) の病態に活性酸素種 (ROS) が関与している事が報告されている。このため MS の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) に対し、ROS スカベンジャーであるエダラボンの効果を検討した。急性型 EAE ではエダラボン投与により重症度は有意に改善し、組織学的解析では、エダラボン投与により脊髄へのリンパ球とマクロファージの浸潤抑制が認められた。この浸潤抑制効果を検討するため、血液脳関門 (BBB) モデルとして *in vitro* で単球の内皮細胞間隙通過に対するエダラボンの効果を検討したが、明らかな抑制は認められなかった。以上より、エダラボンは EAE の重症度を改善し、その機序の一つとして中枢神経系への炎症細胞浸潤の抑制が寄与していることが示唆された。

研究目的

近年、多発性硬化症 (MS) ならびにその動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の病態に、活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) が関与していることが示唆されてきており、単球の血液脳関門通過に ROS が関与することや、Lipoic acid などの抗酸化剤が EAE の重症度を改善することなどが報告されている。フリーラジカルスカベンジャーであるエダラボンは現在脳梗塞急性期に臨床適用されている薬剤であるが、このような背景から、EAE に対しても有効である可能性が考えられ、今回検討した。

研究方法

急性型 EAE は、SJL マウス (8 週齢雌) に PLP₁₃₉₋₁₅₁ ペプチド 150 µg を完全フロイントアジュバント (CFA) とともに免疫した。エダラボンは、高用量群 10 mg/kg、低用量群 3 mg/kg を 2 回/日で腹腔内投与 (ip) し、コントロール群は生理食塩水を投与した。投与期間は、予防的投与では免疫 5 日後 (days post-immunization, dpi) から 14 日間、治療的投与では 11 dpi から 7 日間とした。慢性型 EAE として、C57BL/6 マウス (8 週齢雌) に MOG₃₅₋₅₅ ペプチド 100 µg を CFA とともに免疫し、直後と 48 時間後に百日咳毒素 400 ng を ip した。20 dpi から 14 日間、同様にエダラボンを投与した。重症度は次のスコアに基づき評価した。0 ; 無症状、1 ; 尾の麻痺、2 ; 両後肢の軽度の麻痺、3 ; 両後肢の重度の

大阪大学大学院医学系研究科 神経内科学

麻痺、4；両後肢の完全麻痺、5；瀕死あるいは死亡。急性型 EAE 治療的投与において、脊髄組織を HE 染色および免疫組織化学 (CD3, CD11b) により評価した。また単球の transmigration assay を行った。transwell 上に内皮細胞株 bEND-3 を播種、confluent layer 形成後に、IFN- γ (100 U/ml) とエダラボン (25, 5, 1, 0.2 μ M) または Lipoic Acid (300 μ M) を添加し 24 時間培養した。急性型 EAE (12 dpi) の脾臓より磁気ビーズを用いて単離した単球を、layer 上に静置し、エダラボン存在下で 24 時間培養した。下のチャンバーに移行した単球の細胞数を計測した。

(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、大阪大学医学系研究科動物実験委員会の指針の範囲内で行われた。

研究結果

急性型 EAE に対する予防的投与では、高用量群・低用量群いずれにおいてもコントロールに比べて重症度は有意に改善しており

($p < 0.05$, 12, 13, 14 dpi)、治療的投与では高用量群において有意に改善していた

(14, 15, 16 dpi)。慢性型 EAE においても、高用量群において改善傾向が認められた (有意差は認めず)。急性型 EAE に対する治療的投与において、高用量投与群の脊髄の HE 染色において炎症細胞浸潤は抑制されており、免疫組織化学でも CD3 抗原陽性のリンパ球と CD11b 抗原陽性マクロファージの浸潤が抑制されていた。

transmigration assay における単球の内皮細胞間隙の通過は、エダラボンの存在下においてもコントロールと有意差は認められなかった。一方 Lipoic acid については、単球の内皮細胞間隙通過に対する抑制効果が認められた。

考察

エダラボン投与により、EAE 重症度改善およびリンパ球とマクロファージの脊髄への浸潤抑制を認めた。in vitro における単球の transmigration assay では、エダラボンによる抑制効果は認めなかった。このことから EAE で認められた炎症細胞浸潤抑制は BBB での抑制である可能性は低く、ケモカインやサイトカインなどの産生抑制などを介した間接的なものである可能性が推察されたが、今後の検討を要すると考えられた。

結論

エダラボンの投与により、EAE の重症度は改善し、その機序の一つとして中枢神経系への炎症細胞浸潤に対する抑制効果が寄与している可能性が考えられた。

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

抗体および aptamer を用いた Midkine 阻害に基づく

多発性硬化症の新規治療法開発

分担研究者 錫村明生¹⁾

共同研究者 竹内英之¹⁾, 王金岩¹⁾, 藺部佳史¹⁾, 金世杰¹⁾, 水野哲也¹⁾,
村松壽子²⁾, 村松喬²⁾, 中村義一³⁾

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。RNA aptamer は特定分子に特異的に結合する化学合成された半減期数時間～数日の修飾 RNA であり、主に antagonist として作用する。中和抗体を凌駕する様々な特性があり、今後ますます医薬品としての利用が高まってゆくと考えられている。我々は前回までに、MK ノックアウトマウスに誘導した実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) に対する検討から、MK 抑制により $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 制御性 T 細胞 (Treg) の増加を介して EAE が抑制されることを報告した。今回は、多発性硬化症の新規治療法開発を目指して、抗 MK 中和抗体および抗 MK RNA aptamer を用いた MK 阻害による EAE 抑制効果について検討を行ったところ、有意に EAE 発症が抑制された。中和抗体および RNA aptamer を用いた MK 抑制は、多発性硬化症をはじめとする自己免疫疾患に対する新たな治療法となりうるものと考えられる。

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¹⁾。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^{2, 3)}。

RNA aptamer は特定分子に特異的に結合する化学合成された半減期数時間～数日の修飾 RNA であり、主に antagonist として作用する。中和抗体を凌駕する様々な特性がある。1) 親和性が極めて高く、2) 合成が容易かつ低価格で、3) 化学修飾が容易で、4) ロット差が無く、5) 免疫排除を受けず、6) 毒性も極めて低い。最近、抗 VEGF aptamer が加齢黄斑変性症治療薬として承認され、今後ますます医薬品としての利用が高まってゆくと考えられている。

我々は前回までに、MK ノックアウトマウスに誘導した実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) に対する検討から、MK 抑制により $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 制御性 T 細胞 (Treg) の増加を介して EAE が抑制

¹⁾名古屋大学環境医学研究所神経免疫分野

²⁾名古屋大学大学院医学系研究科生物化学講座

³⁾東京大学医科学研究所遺伝子動態分野

されることを報告した。そこで、今回、我々は、多発性硬化症の新規治療法開発を目指して、抗 MK 中和抗体および抗 MK RNA aptamer を用いた MK 阻害による EAE 抑制効果について検討を行った。

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。

C57BL/6 マウスに MOG₃₅₋₅₅ ペプチド 200mg を完全フロイントアジュバントと共に皮下接種後、百日咳毒素を腹腔内投与し、EAE を誘導し、臨床スコアを経時的に記録した。治療効果判定のため、抗 MK 中和抗体（セルシグナルズ社製）は各々 0, 0.75, 7.5, 75 mg/kg を週 2 回経静脈投与し、抗 MK RNA aptamer（リボミック社製）は各々 0, 0.25, 2.5, 15 mg/kg を隔日腹腔内投与した。薬理効果判定のため、EAE 発症初期に脾臓から CD4⁺T 細胞を採取し、*in vitro* で MOG 刺激とともに抗 MK 中和抗体あるいは抗 MK RNA aptamer を濃度段階的に投与し、4 日後に免疫染色後フローサイトメトリーにより Treg の比率を解析した。

研究結果

In vitro での検討により、抗 MK 中和抗体投与群および抗 MK RNA aptamer 投与群では、濃度依存的に Treg を増加させることが確認された。

無治療群では、MOG 免疫後 14 日後から EAE が発症し、後肢麻痺から四肢麻痺に発展した。一方、抗 MK 中和抗体投与群および抗 MK RNA aptamer 投与群では、EAE 発症率には差は見られなかったが症状は軽微であり、臨床症状には有意な差異が認められた。

結論

中和抗体および RNA aptamer を用いた MK 抑制により、有意に EAE 発症が抑制された。MK 抑制により抗原特異性 Treg の活性化が誘導され、これによる自己反応性 T 細胞の免疫反応の抑制および中枢神経系の炎症細胞浸潤の抑制の結果、EAE 発症が抑制されるものと考えられた。中和抗体および RNA aptamer を用いた MK 抑制が、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。

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

インターフェロン γ による神経細胞傷害の検討

分担研究者 錫村明生¹⁾

共同研究者 水野哲也¹⁾、竹内英之¹⁾

研究要旨

多発性硬化症の炎症病変に關与するインターフェロン γ (IFN- γ) の神経細胞傷害作用、及び IFN- γ のグルタミン酸神経毒性に対する増強作用について検討した。IFN- γ は dendritic beading 形成、ATP 産生障害等の神経細胞機能不全を誘導した。IFN- γ による dendritic beading は、グルタミン酸 AMPA 受容体阻害薬、Ca イオンキレーター、NO 合成酵素阻害薬によって抑制された。免疫染色及び免疫沈降法により IFN- γ 受容体と AMPA 受容体サブユニット GluR1 は複合体を形成していることが明らかとなり、さらに、IFN- γ はグルタミン酸(AMPA)による細胞傷害を増強することが示された。多発性硬化症の炎症性病変において産生される IFN- γ は、直接神経細胞変性に關与している可能性が考えられ、IFN- γ による神経細胞機能障害の制御を標的とした新規の治療法の開発が期待される。

研究目的

多発性硬化症において、自己反応性 Th1 細胞の産生する IFN- γ は、ミクログリアを活性化して、抗原提示関連分子の発現を増強する。オリゴデンドロサイトに対しては傷害性に作用すると考えられているが、神経細胞に対する作用は不明である。近年、多発性硬化症の病態において神経細胞変性の關与が注目されている。そこで、培養神経細胞をもちいて、IFN- γ の神経細胞における作用について検討した。

研究方法

(1) C57BL/6 マウス大脳皮質初代神経細胞および大脳皮質スライス培養を用いて、IFN- γ

による神経細胞傷害を以下の方法で解析した。神経細胞の機能不全を反映する dendritic beading を抗 MAP-2 抗体を用いた免疫染色によって評価し、ミトコンドリア機能を MTS assay、細胞内 ATP 測定にて、神経細胞死を抗 MAP-2 抗体による染色性の差異を利用して評価した。

(2) IFN- γ の dendritic beading 形成に対する、グルタミン酸受容体阻害剤、Ca イオンキレーター、NO 合成酵素阻害剤の効果について検討した。

(3) マウス大脳皮質培養神経細胞を用いて、グルタミン酸受容体刺激剤(NMDA、AMPA)による神経細胞傷害に対する IFN- γ の増強作用を検討した。すべての動物実験は、動物愛護の観点より、名古屋大学の動物実験指針（動物実験委員会の指針）の範囲内で行われ、倫理

1) 名古屋大学環境医学研究所 神経免疫分野

委員会の承認を得て行なった。

の制御を標的とした新規の治療法の開発が期待される。

研究結果

IFN- γ は dendritic beading 形成、ATP 産生障害等の細胞機能不全を誘導した。IFN- γ による dendritic beading は、グルタミン酸 AMPA 受容体阻害薬、Ca イオンキレーター、NO 合成酵素阻害薬によって抑制された。免疫染色及び免疫沈降法により IFN- γ 受容体と AMPA 受容体サブユニット GluR1 が複合体を形成し作用することが明らかとなった。さらに、IFN- γ はグルタミン酸(AMPA)による細胞傷害を増強した。スライス培養においても IFN- γ によって、dendritic beading が誘導され、AMPA 受容体阻害薬によって dendritic beading 形成は抑制された。

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

考察

多発性硬化症における神経細胞変性の機序は十分に解明されていない。今回の検討で Th1 細胞から産生される IFN- γ が直接神経細胞の機能不全を誘導する可能性が示唆された。IFN- γ は、IFN- γ 受容体と AMPA 受容体 GluR1 複合体を介して、細胞内 Ca 流入、NO 産生、ATP 低下により dendritic beading を誘導するものと考えられた。さらに、この受容体複合体の存在により、IFN- γ とグルタミン酸は神経細胞において相互に作用すると考えられた。

結論

多発性硬化症の炎症性病変において産生される IFN- γ は、神経細胞変性に関与している可能性があり、IFN- γ による神経細胞機能障害

ウイルス性脱髄の新規動物モデルの開発

分担研究者 大原 義朗¹⁾

共同研究者 鈴木 博義²⁾、齊藤 峰輝¹⁾、谷浦 直子¹⁾、大桑 孝子¹⁾

研究要旨

Theiler ウイルス(TV)は致死性の急性灰白脊髄炎を起こす急性亜群(GDVII 株)と脊髄に持続感染し脱髄を起こす慢性亜群(DA 株)に分類される。我々は両亜群の生物学的性状の違いを検討するため、DA 株の Leader 蛋白の 57 番目のセリンをプロリンに置換した変異ウイルス DAL_{pro} を作成し SJL/J マウスの脳内に接種した。接種後 45 日、90 日に脳と脊髄を組織学的に検討したところ、DAL_{pro} においては DA 株では形成されない広汎な白質を主体とする病変が形成されていた。病変は脳梁、皮質下白質、大脳基底核貫通線維に見られ、強い壊死が白質とその周囲の灰白質巻き込む用に生じていた。病変の周囲には多数の泡沫細胞の浸潤が見られたが、ウイルス抗原は病変周囲に存在する少数のミクログリア/マクロファージ系の細胞に見られるのみであった。この DAL_{pro} により形成される大脳病変は古典的な多発性硬化症の脱髄斑病変とは異なるものの、壊死の強い劇症型視神経・脊髄型の脱髄性疾患と病理学的に共通性があり、今後、それらの疾患の病態を解明してゆく上で有用なモデルと考えられた。

研究目的

TV・DA 株は、マウス脊髄に持続感染し、炎症性脱髄を引き起こす。その病理像の類似性などから多発性硬化症 (MS) の実験モデルとして研究されている。しかし脱髄の機序はまだ解明されていない。我々は昨年度 DA 株変異ウイルスが脊髄のみならず大脳でも炎症性脱髄を引き起こすことを報告し、MS の新規モデルとしての可能性を提唱した。今年度はこの変異ウイルスによって引き起こされる病理学的病変について、さらに検討をおこなった。

研究方法

1. DA 株・L の 57 番目のアミノ酸をセリンからプロリンに置換した組換えウイルス DAL_{pro} を 4 週令の SJL/J マウスに脳内接種した。
2. 接種後 45 日、90 日で型どおり灌流固定後、パラフィン切片 (2.5 μm) を作成し、H-E 染色、K-B 染色、ボディアアン染色を行った。さらにアビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ法による免疫染色を行い、カプシド蛋白 VP1 (モノクローナル抗体) の分布、ミエリ塩基性蛋白 (MBP)、Neurofilament protein (NFP)、ミクログリア (Iba1) の変化を検討した。

¹⁾ 金沢医科大学 医学部 生体感染防御学部門

²⁾ 独立行政法人国立病院機構 仙台医療センター 臨床検査科

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。

研究結果

1. DA 株の病変

a) 病変分布

病変は脊髄、延髄、橋、中脳、視床下部に見られた。

b) 病変の組織学的所見

白質に海綿状変化とミエリンの染色性の低下が見られた。同時にリンパ球、形質細胞、マクロファージ/ミクログリアの浸潤があり、一部のマクロファージは黄色腫細胞となっていた。病変の近傍には peri-vascular cuffing が散在性に認められた。更に髄膜内血管の peri-vascular cuffing を伴う leptomeningitis も認められた。なお DA 株の病変は白質に限局していた。NFP 免疫染色, ボディアン染色で病変部の神経線維は保たれていた。

2. 変異ウイルス DAL_{Pro} の病変

a) 病変分布

DA 株で観察された病変(脊髄、脳幹部、視床下部)に加えて、大脳、大脳基底核にも病変が認められた。

b) 病変の組織学的所見

DA 株の病変とは異なり、激しい壊死性病変であった。KB 染色、MBP 免疫染色ではミエリンの崩壊があり、ボディアン染色, NFP 免疫染色では神経線維も病変内では消失していた。病変は脳梁、錐体路、基底核の貫通線維などの白質に接して発生しているが、白質ばかりではなく、周囲の灰白質も広汎に巻き込んでいた。病変の壊死巣内には

コレステリン結晶と黄色腫細胞が多数見られるが、リンパ球、形質細胞などの炎症性細胞浸潤は確認できなかった。病変の周囲には peri-vascular cuffing も認められた。

c) ウイルス抗原の免疫染色

病変内の壊死部にはウイルス抗原は見られなかった。少数のウイルス抗原陽性細胞が病変部周囲に散在性に認められ、これらの細胞は形態学的にはマクロファージまたはミクログリアと考えられる細胞であった。

考察

1. 野生株 DA も変異ウイルス DAL_{Pro} も脳幹部以下の病変分布は同じであった。病変の程度はやや変異株のほうが強い傾向であったが、基本的には類似した病変であった。
2. 野生株 DA も変異ウイルス DAL_{Pro} も脳実質内の病変だけでなく、leptomeningitis の病変を伴っていた。
3. DAL_{Pro} においても脳幹部以下の病変は白質に特異性があり、白質の高度な破壊はなく、白質の海綿状変化や vacuolated myelopathy 様の病変と考えられる病変が確認された。しかし、DAL_{Pro} の大脳病変は白質と灰白質の両方を含むような大きな壊死を主体とするものであった。この点については白質に対する特異性を失った壊死性脳炎の状態なのか、白質に起こった強い破壊性変化が周囲の灰白質まで波及し、灰白質の変化は2次的なものであるのか、今後の検討を要する。

結論

DAL_{Pro}についてはこれまで記載のなかった大脳病変が認められた。病変の組織学的所見は古典的慢性型のMSにみられるような脱髄斑形成を示す病変とは異なるものの、本邦で多く遭遇するような Devic 型といわれる劇症型の脱髄性疾患の病変にも共通性があるものであり、今後、このような形の神経免疫疾患の病態、病理を研究してゆく上で有用なモデルの1つになりうるものと考えられた。

文献

Takano-Maruyama M, Ohara Y, Asakura K, Okuwa T: Leader (L) and L* protein of Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) and their regulation of the virus' biological activities. J Neuroinflammation 3: 19-26, 2006.

Takano-Maruyama M, Ohara Y, Asakura K, Okuwa T: Theiler' s murine encephalomyelitis virus leader protein amino acid residue 57 regulates subgroup-specific virus growth on BHK-21 cells. J Virol 80: 12025-31, 2006.

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

C57L/J 雄マウスは去勢によりタイラーウイルス誘導による脱髄疾患の感受性が増大し、エストロゲンホルモン投与により疾患抵抗性を再獲得する

分担研究者 高 昌星¹⁾

共同研究者 Alyson Fuller²⁾, 矢彦沢裕之²⁾, Eui Young So²⁾

Mauro Dal Canto³⁾, C. Jane Welsh²⁾, Byung S. Kim^{2),3)}

研究要旨

タイラー脳脊髄炎ウイルス(TMEV)を感受性マウスに接種すると免疫性脱髄疾患(TMEV-IDD)を誘導することが出来る。我々はこれまで C57L マウスにおいては雄がより TMEV-IDD に感受性があることを示してきた。我々はさらに性差による TMEV-IDD 感受性の違いに及ぼすホルモンの影響を明らかにするため、エストロジェンを投与した去勢 C57L 雄マウスに TMEV を接種し、シャム手術を行った後、同様にエストロジェンを投与した対照マウスと比較検討した。雄マウスは去勢により、TMEV-IDD の発症率、臨床症状ともに増悪させ、エストロゲン投与により、これらがシャム手術対照群と同程度にまで改善されることが明らかになった。中枢神経系内におけるウイルスの複製は TMEV 持続感染にとって極めて重要であるが、エストロゲン投与により、ミクログリアやマクロファージにおける TMEV の複製が抑制されていることが明らかとなった。エストロジェンは NF κ -B の機能を抑制することが知られており、NF κ -B はウイルス複製のみならず、サイトカインやケモカインの産生に不可欠であることから、エストロジェンは NF κ -B の機能を抑制することにより、ウイルスの複製と初期の炎症反応を抑制したものと考えられる。

研究目的

多発性硬化症(multiple sclerosis: MS)はヒトにおける中枢神経系脱髄疾患の代表的疾患であり、その発症機序に中枢神経系の髄鞘に対する自己免疫が関与していると考えられているが、現在もなおその起炎抗原は不明である。MS では自己免疫を誘導する因子は不明であるが何らかのウイルス感染がその引き金になっているものと考えられている。この観点より感受性マウスにMSに酷似した脱髄性病変を引き起こすタイラー脳脊髄炎ウイルス(Theiler's murine encephalomyelitis virus: TMEV)による免疫性脱髄疾患の動物実験モデル(TMEV-induced demyelinating disease: TMEV-IDD)はMSの病因の解明及び治療の開発に非常に有用である。MSの発症には性差があり、女性は男性の2~3

倍多いことが知られている。興味深いことに妊娠中の性ホルモンの変化、更年期、外因性ホルモンの投与はMSの臨床症状を改善させ、性ホルモンがMSの臨床症状の発現に役割を担っていることが示唆される。TMEV-IDDの感受性に関しても性差があることが知られており、TMEV-IDDの比較的抵抗性のC57Lマウスでは雄では23%に感受性がみられるが、雌では全く感受性がなく、TMEV-IDDを発症しない。性ホルモンであるエストロジェンはTMEV-IDDに影響を及ぼすことが考えられるが、これまで報告はみられない。また精巢はテストステロンの主な供給源であるが、その一部はエストロジェンに転換する。今回我々は、去勢したC57LマウスにTMEVを接種後、エストロジェンを投与し、TMEV-IDDの感受性の変化およびその機序を検討した。

1)信州大学医学部保健学科

2)Northwestern 大学医学部微生物学-免疫学

3)Northwestern 大学医学部病理学

研究方法

MSの動物モデルとして、MSのウイルス感染モデルであり、慢性進行型MSの動物実験モデル

であるタイラー脳脊髄炎ウイルス(Theiler's murine encephalomyelitis virus: TMEV)による免疫性脱髄疾患(TMEV-IDD)を作製した。TMEV BeAn 8386 株は 7.5%ウシ胎児血清を含む DMEM 培養液を用い、BHK-21(baby hamster kidney-21)細胞内で繁殖させた後、純化したものを用いた(173R)。4~6 週齢の C57L/J マウス左脳内に TMEV BeAn8386 株を一匹あたり 3×10^6 PFU (plaque-forming unit)を接種した。雄マウスは脳内 TMEV 接種 10-25 日前に去勢手術を行なった。対照群の雄マウスも同様にシャム手術を行ない、精巣は摘出せずに残した。手術 7 日前から毎週 2 回オリーブオイルに溶解したエストロゲン(β -estradiol)を皮下投与した。対照群にはオリーブオイルのみを投与した。また他の群では TMEV 接種 7 日前にエストロゲンを含むペレを皮下に植え込み、持続的にエストロゲンが放出されるようにした。TMEV 接種後連日、臨床症状をスコア化して記録し、去勢群、去勢+エストロゲン投与群および対照群と比較検討した。さらに病理学的検索と共にマウスからリンパ球(脾細胞)を得、サイトカインプロファイルなどの免疫学的指標を検索した。

研究結果

去勢 C57L/J 雄マウスではほぼ 100%が発症し、より臨床症状の増悪がみられた。一方シャム手術を受けた対照群 C57L/J 雄マウスの発症率はほぼ 50%であった。また去勢 C57L/J 雄マウスにエストロゲンを投与された群では発症率はほぼ 50%であり、シャム手術対照群とほぼ同様であり(図1)、組織学的にもシャム手術を受けた対照群 C57L/J 雄マウスでは軽度の脱髄が(図2A)、去勢 C57L/J 雄マウスでは広範な脱髄がみられ(図2B)、去勢 C57L/J 雄マウスにエストロゲンを投与された群では脱髄は軽微であった(図2C)。エストロゲン投与群では TMEV 特異的 Th1 免疫応答が末梢でも中枢神経系でも低下していた。さらに in vitro でエストロゲンはマクロファージにおけるウイルス複製を直接抑制し、エストロゲン投与の去勢 C57L/J 雄マウスの中枢神経系ではミクログリア/マクロファージにおけるウイルス RNA 量は低下していた(図

3)。またエストロゲン投与により TNF- α により誘導される脳血管内皮細胞における VCAM-1 の発現が低下していた(図4)。これらは TMEV 感染によりグリア細胞で産生される NF- κ -B を抑制することにより低下したと考えられる。

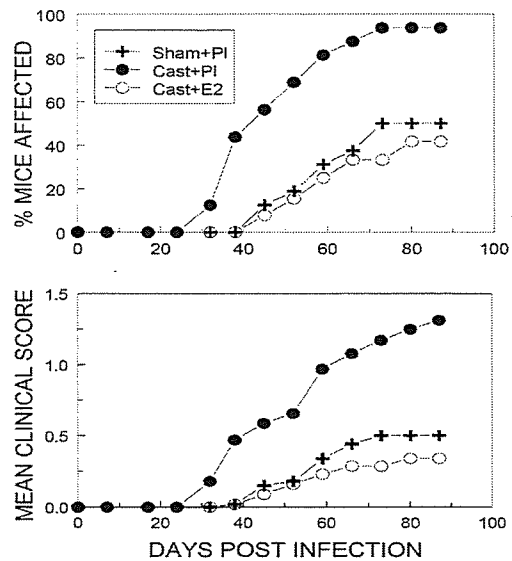


図1:臨床経過:発症率および臨床症状

