

AQP4 抗体価の変動では PP の方法によらず、いずれにおいても治療前後で AQP4 抗体価の低下を認めた(図 5)。

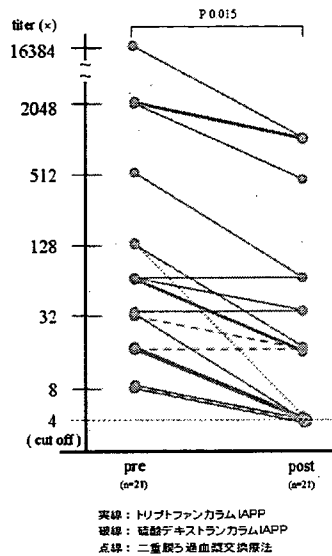


図 5. 血液浄化療法の治療前後における AQP4 抗体価変動

1 回の IAPP 各血漿処理量における AQP4 抗体の変動についての検討では、血漿処理量 500ml 毎における吸着カラム前後で AQP4 抗体価はいずれの処理量でも感度以下に低下した(図 6)。

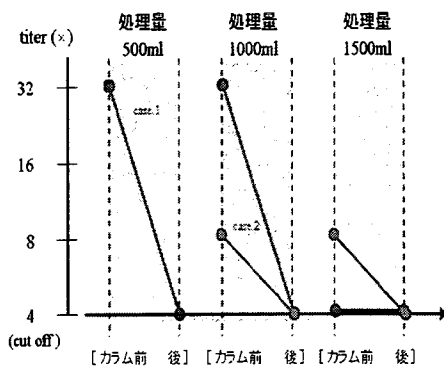


図 6. IAPP カラム前後の AQP4 抗体価変動

1 回の IAPP の処理量毎の IgG サブクラスの吸着率の検討では、IgG2, 4 はそれぞれ血漿処理量 1000ml において吸着率-8.4%, -20.0%であり、IgG1 は血漿処理量 2000ml において-0.2%であった。IgG3 は血漿処理量 2000ml において吸着率の 46.6%であった(図 7)。

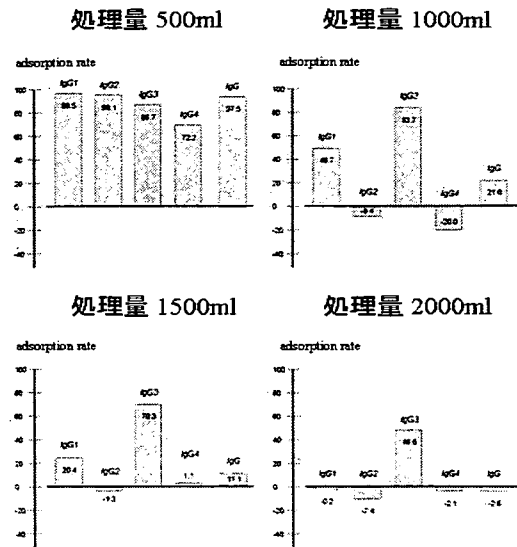


図 7. 1 回の IAPP における各血漿処理量毎の IgG サブクラスの吸着率

### 【結語】

MS に対する IAPP 療法は、安全で有効性の高い治療法である。ステロイド治療抵抗性の MS は、LSCL を有することが多く(85.1%), IAPP 療法の有効性が高い(65.2%)。PP はその種類によらず、AQP4 抗体を除去する。IAPP の至適血漿処理量について、今後検討を要する。

### 【文献】

- 1) Schilling S, et al : Plasma exchange therapy for steroid-unresponsive multiple sclerosis relapses: clinical experience with 16 patients. *Nervenarzt*. 2006 Apr ; 77(4):430-8.
- 2) Takahashi T, et al : Anti-aquaporin-4 antibody is involved in the pathogenesis of NMO: a study on antibody titre. *Brain*. 2007 May;130(Pt 5):1235-43.

【健康危険情報】なし。

【知的財産権の出願・登録状況】なし。

## 多発性硬化症に対する Mitoxantrone 治療

分担研究者 池田修一

共同研究者 加藤修明、田澤浩一、石井 亘、松田正之

### 研究要旨

ミトキサントロン mitoxantrone(MITX)は、日本では急性白血病などに対して保険認可されている抗癌薬の一種であり、免疫抑制作用を併せ持つことから MS にも有効であることが報告され、欧米では一般的治療法の選択肢の一つとなっている。今回我々は IFN- $\beta$  1b 治療にも関わらず再発、進行が認められる MS 患者、および副作用により IFN- $\beta$  1b による治療継続が困難であった MS 患者に対して MITX による治療を試み、本邦の MS 患者に対する有効性や合併症、その他考慮が必要な問題点を検討した。その結果、本邦 MS 患者に対しても MITX 治療は有効であることが示唆され、重篤な合併症は観察されなかった。一方、治療終了後早期に複数回の再発を繰り返している患者が見られ、その投与期間を含めた最適な投与法の確立が必要と思われた。

### 研究目的

本邦では MS 患者の再発予防に利用できる薬剤は現在インターフェロン(IFN)  $\beta$  1a と  $\beta$  1b のみであり、本薬の投与にもかかわらず再発、進行が抑制できない患者や、副作用により本薬を使用できない患者では治療選択肢がない。そのため本邦ではこのような症例に使用可能な新たな治療選択肢が求められている。今回我々は本邦 MS 患者に対する MITX 使用の妥当性を検討することを目的に、IFN- $\beta$  1b 治療にも関わらず再発、進行が認められる MS 患者、および副作用により IFN- $\beta$  1b による治療継続が困難であった MS 患者に対して MITX による治療を試み、その有効性と合併症、その他考慮が必要な問題点を検討した。

---

信州大学医学部脳神経内科、リウマチ・膠原病内科

### 研究方法

対象は4名の MS 患者(男:女=1:3、平均年齢 42.3 歳、平均 EDSS 4.4) で、2名は IFN- $\beta$  1b を使用中、2名は副作用により IFN- $\beta$  1b を中止後である。投与法は、IFN- $\beta$  1b 使用中の患者には Month 1 に 12mg/m<sup>2</sup>、以後 Month 2,3,6,9,12 に 5mg/m<sup>2</sup> の MITX を(Mult Scler 2005)、IFN- $\beta$  1b 非使用中の患者には Month 1,4,7,10,13 に 12mg/m<sup>2</sup> の MITX を(Lancet 2002)、それぞれ1時間かけて点滴静注した。

治療前後で、神経所見、EDSS(Expanded Disability Status Scale)、髄液所見、脳・脊髄造影 MRI 所見、再発頻度、神経電気生理検査を評価した。また副作用評価のため一般採血、尿検査、胸部レントゲン、心エコー、BNP 測定を行った。治療前後の各因子の群間比較には paired t-test を行った。

### (倫理面への配慮)

本研究は院内倫理委員会の承認を得たうえで、全対象患者から文書によるインフォームド・コンセントを得た。

### 研究結果

4名の患者全てで1年間の治療を終了した。再発率は治療前平均 1.25 回/年(0.67~1.80)から治療後平均 0.25 回/年(0~1)へ減少した(p=0.1266)。EDSS 変化率は治療前平均+0.72/年(0.32~1.17)から治療後-0.75/年(-2.0~0.0)へ減少した(p=0.0597)。髄液 IgG index は治療前 1.85(0.64~3.01)から治療後 0.96(0.57~1.29)へ減少した(p=0.0840)。いずれも有意差は認めなかったものの改善傾向が見られた。副作用として白血球減少が全例に出現し、day 14.1 をピークに平均 1965/ $\mu$ l(投与前の 37.8%)への減少が見られた。1例でごく軽度の、1例で中等度の嘔気が出現したが自制内であった。1例でサイトメガロ網膜症を発症したがガンシクロビル治療により後遺症なく治癒した。心機能低下を認めた症例はなかった。

### 考察

複数例の日本人 MS 患者に対する MITX 治療は Komori らにより初めて報告され、欧米での報告と同様有効性が認められた(臨床神経 47:401,2007)。今回の我々の検討でも、有意差には至らなかったものの、日本人 MS 患者に対する MITX の有効性が示唆された。Komori らの報告では2名で食欲不振により投与中止

となったが、今回の我々のプロトコールで投与中止となった患者はいなかった。MITX 治療の問題点として心臓への蓄積毒性がある。144mg/m<sup>2</sup> を超えると心機能障害出現の可能性があるとされていて(J Neurol 2005)継続投与できない。そのため欧米での MITX 使用報告は多くが1年(あるいは多くとも2年)とその使用期間を限定している。Komori らは最大 96mg/m<sup>2</sup> まで継続投与可能としたが、今回の我々の検討では1年とその使用を限定して行った。その結果治療終了後の経過観察において、引き続き再発が抑制されている患者がいる一方で治療終了早期に複数回の再発を繰り返している患者も見られ、その投与期間を含めた最適な投与方法の確立が必要と思われた。

### 結論

日本人 MS 患者に対しても MITX 治療は有効であることが示唆され、既存治療に抵抗する症例や、合併症等により既存治療の継続が困難である症例に対しては、治療選択肢の一つとして検討され得る。その際には合併症を少なくし、かつ有効期間を延長可能な、日本人に適した MITX 投与方法の検討が必要である。

### 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

## 温度感受性 SV40 ラージ T 抗原を用いた新たなヒト *in vitro* BBB model の確立

分担研究者 神田 隆<sup>1)</sup>

共同研究者 佐野泰照<sup>1)</sup>, 清水文崇<sup>1)</sup>, 前田敏彦<sup>1)</sup>, 安部真彰<sup>1)</sup>, 鈴木倫保<sup>2)</sup>, 寺崎哲也<sup>3)</sup>

### 研究要旨

【目的】多発性硬化症やアルツハイマー病などの難治性神経疾患では血液脳関門(BBB)がその発症に大きく関与している。これらの疾患の病態解明や新たな治療法開発に有用となるヒト *in vitro* BBB モデルを作成した。【方法】定法にてヒト脳微小血管内皮細胞(HBMECs)の一次培養を行い、温度感受性 SV40 ラージ T 抗原をレトロウイルスにて導入した。内皮細胞群を cloning し、characterization を行った。【結果】得られた内皮細胞群は 100%の純度であり、温度感受性を示した。Occludin, claudin-5, ZO-1, ZO-2 などの密着結合分子や GLUT-1, p-gp などの transporter を発現していた。電気抵抗および透過性の検証ではバリアー機能を有することが示された。【結論】HBMECs 由来条件的不死化細胞株の樹立に成功した。単離した内皮細胞群は温度感受性を示すと同時にバリアー構成内皮としての性質をよく保持していた。

### 研究目的

多発性硬化症 (multiple sclerosis: MS) では血液脳関門 (blood-brain barrier: BBB) の破綻が認められる<sup>1)2)</sup>。BBB の首座である脳微小血管内皮細胞を用いた *in vitro* BBB model は BBB 破綻の分子生物学的なメカニズムの解明のみならず、その破綻の修復という新しい MS の治療法開発のために必要不可欠なツールである。これまでラットやウシの脳を用いた *in vitro* BBB model は多数報告されているが<sup>3)</sup>、ヒト脳由来のモデルの報告は少ない<sup>4)-6)</sup>。一般に、ヒト脳微小血管内皮細胞は増殖能力に乏しく、数代の継代にて死滅する。よって SV40 ラージ T 抗原やテロメラーゼなどの遺伝

子を導入し不死化させることが必須であるが、これらの不死化細胞はしばしば生理的な形態や細胞学的特性を失い、腫瘍細胞としての属性

### 研究方法

性が強くなってしまいう傾向がある。安定した増殖能を示し、生理的な *in vivo* での細胞特性を残した内皮細胞株が最も理想的なヒト *in vitro* BBB model であるといえる。この目的を達成するために、我々は不死化遺伝子として温度感受性 SV40 ラージ T 抗原を用い、ヒト脳微小血管内皮細胞 (human brain microvascular endothelial cells: HBMECs) 由来条件的不死化細胞株を樹立した。

### 研究方法

定法にて HBMECs の一次培養を行い、温度感受性 SV40 ラージ T 抗原をレトロウイルスにて導入した。内皮細胞群を cloning し、

1) 山口大学医学部神経内科  
2) 熊本大学医学部脳神経外科  
3) 東北大学薬学部薬物送達学

characterization を行った。

(倫理面への配慮)

本研究はヒト脳を材料として用いるため、山口大学医学部倫理委員会による承認を得た上で研究を開始した。組織提供者に対し十分な説明の後、同意を得た上で組織を採取した。サンプルの匿名化に配慮し、プライバシーの保全に万全を尽くした。

研究結果

得られた内皮細胞群は 100%の純度であり、33℃にて増殖し、37℃では増殖が停止した。BBB 構成内皮細胞の特徴とされる spindle-fiber shaped morphology を呈しており、von Willebrand factor の発現および DiI-Ac-LDL の uptake も認められた。37℃の温度下にて高い TEER 値を示し、<sup>14</sup>C-イヌリンの低い透過率を示した。Occludin, claudin-5, claudin-12, ZO-1, ZO-2, JAM-A などの tight junction 構成分子の発現も認められた。Mdr1a(p-gp), MRP1, ABCG2 などの efflux transporter や GLUT-1, CRT, LAT1, 4F2hc などの influx transporter の発現も認められた。

考察

今回我々が樹立したヒト *in vitro* BBB model は 33℃では不死化遺伝子産物の作用により増殖を続けるが、37℃ではこの作用は消失し、不死化されていない BBB 構成内皮細胞のように増殖能を失った。これは 37℃に培養温度をシフトすることによって不死化細胞から生理的な内皮細胞に戻ることを意味する。37℃にて高い TEER 値および低いイヌリンの透過率を示し、かつ種々の transporter の発現も認められることから、*in vivo* の特性を

よく保持した *in vitro* BBB model であると考えられた。

結論

HBMECs 由来条件的不死化細胞株の樹立に成功した。単離した内皮細胞群は温度感受性を示すと同時にバリアー構成内皮としての性質をよく保持していた。

文献

- 1) Westland KW et al. Activated non-neural specific T cells open the blood-brain barrier to circulating antibodies. *Brain* 1999; 122: 1283-1291.
- 2) Kermode AG et al. Breakdown of the blood-brain barrier precedes symptoms and other MRI signs of new lesions in multiple sclerosis. Pathogenetic and clinical implications. *Brain* 1990; 113: 1477-1489.
- 3) Terasaki T et al. New approaches to *in vitro* models of blood-brain barrier drug transport. *Drug Discov Today*. 2004; 8: 944-954.
- 4) Kusch-Poddar M et al. Evaluation of the immortalized human brain capillary endothelial cell line BB19 as a human cell culture model for the blood-brain barrier. *Brain Res*. 2005; 1064: 21-31.
- 5) Ketabi-Kiyanvash et al. NNKIM-6, a new immortalized human brain capillary endothelial cell line with conserved endothelial characteristics. *Cell Tissue Res*. 2007; 328:19-29.
- 6) Weksler BB et al. Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *FASEB J*. 2005; 19: 1872-1874.

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

## 血液神経関門の regulator は血管周皮細胞である

分担研究者 神田 隆<sup>1)</sup>

共同研究者 清水文崇<sup>1)</sup>、佐野泰照<sup>1)</sup>、前田敏彦<sup>1)</sup>、安部真彰<sup>1)</sup>、柏村陽子<sup>1)</sup>、  
寺崎哲也<sup>2)</sup>、帯刀益夫<sup>3)</sup>

### 研究要旨

難治性自己免疫性末梢神経障害では、血液神経関門 (Blood-Nerve Barrier: BNB) の破綻が認められる。BNB の性質を解明することはこれらの免疫性神経疾患の病態解明並びに新たな治療法開発においては必要不可欠である。今回我々は、ヒト坐骨神経より BNB 構成細胞である神経内膜微小血管内皮細胞(PnMECs)および血管周皮細胞(pericyte)の単離に成功し、*in vitro* BNB model を確立した。得られた PnMECs は tight junction 構成分子を発現し、高い電気抵抗値を有しており、バリアー構成内皮細胞の性質を保持していた。また、pericyte から放出される液性因子により PnMECs の claudin-5 の発現が増加し、PnMECs の TEER 値の上昇、ならびに <sup>14</sup>C-inulin 透過性の低下を介しバリア機能を高めていることを確認した。さらに、astrocyte が産生するサイトカインである Ang-1, VEGF, TGF- $\beta$ , bFGF を、BNB を構成している pericyte も発現していることが明らかとなり、それらあるいはその他の未知の物質を介して BNB を制御している可能性が想定された。pericyte から放出される BNB のバリア機能を高める物質を同定することで、神経免疫疾患において BNB を直接的に制御するという新規治療戦略を立てることが可能である。

### 研究目的

ギラン・バレー症候群や慢性炎症性脱髄性多発根ニューロパチーなどの難治性自己免疫性末梢神経疾患においては、末梢神経実質と循環血液との間に存在するバリアーシステムである血液神経関門 (blood-nerve barrier: BNB) の破綻が認められる<sup>1)2)</sup>。BNB の性質を解明することはこれらの免疫性神経疾患の病態解明並びに新たな治療法開発においては必要不可欠である。血液脳関門(blood-brain barrier: BBB)は、脳微小血管内皮(brain

microvascular endothelial cells: BMECs), 星状膠細胞(astrocyte), 血管周皮細胞(pericyte)の3者から構成されるが、BNB は末梢神経神経内膜内微小血管内皮細胞(peripheral nerve endoneurial microvascular endothelial cells: PnMECs), 血管周皮細胞(pericyte)の2者のみから構成される。BBB において astrocyte は BMECs を regulate しバリア機能を増加させることが知られているが<sup>3)</sup>、BNB には astrocyte に相当する細胞はない。我々は昨年度温度感受性 SV40 ラージ T 抗原(tsA58) transgenic rat から単離した PnMECs が、BBB を構成する BMECs と同等なバリア機能と有していることを報告した<sup>4)</sup>。今回我々は BNB における

山口大学医学部神経内科

1) 東北大学薬学部薬物送達学分野

2) 東北大学医学部加齢医学研究所

3) YS 研究所

pericyte の役割を解明する目的でヒト坐骨神経から PnMECs, pericyte を単離し, pericyte が放出する液性因子による PnMECs への影響を検討した。

#### 研究方法

剖検例(LGMD 疑い, 不整脈死)より脳・坐骨神経を摘出後, BBB 由来の pericyte, BNB 由来の PnMECs, pericyte を単離し, ウイルスベクターを用い *tsA58*, *hTERT* を transfection し不死化した。33°C で培養, cloning を行い PnMECs, pericyte を単離した。単離した PnMECs のうち, spindle-fiber 状の形態, von Willebrand factor の発現および Dil-Ac-LDL の取り込み, tight junction 関連分子の発現, 高い電気抵抗(Transendothelial electrical resistance [TEER])値および低い <sup>14</sup>C-inulin 透過性, 4 条件満たしたものを BNB 構成 PnMECs とした。pericyte は ruffled-border 状の形態,  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), NG2 の発現, PDGF- $\beta$  Receptor (PDGF  $\beta$  R), osteopontin(OPN)の発現, von Kossa 染色陽性の 4 点をもって同定した。pericyte から放出される液性因子が PnMECs のバリア機能に変化を与えるか否かを検討するため, pericyte 培養の上清を回収し PnMECs に作用させ, TEER, <sup>14</sup>C-inulin 透過性の変化を検討した。さらに pericyte 培養上清が, PnMECs の tight junction 関連分子の発現に影響を与えるかどうかを real time PCR, western blot を用いて検討した。

(倫理面での配慮)

本研究はヒト脳・坐骨神経を材料として用いるため, 山口大学医学部倫理委員会による承

認を得た上で研究を開始した。組織提供者・家族に対し, 十分な説明の後, 同意を得た上で組織を採取した。サンプルの匿名化に配慮し, プライバシーの保全に万全を尽くした。

#### 研究結果

単離した PnMECs は spindle-fiber shaped morphology を呈しており, von Willebrand factor の発現および Dil-Ac-LDL の uptake も認められた。この PnMECs は高い TEER 値, 低い <sup>14</sup>C-inulin 透過性を示し, occludin, claudin-5 などの tight junction protein 構成蛋白を発現していた。また単離した pericyte は, ruffled-border 状の形態を呈し SMA, NG2, PDGF  $\beta$  R, OPN を発現し, angiopontin-1 (Ang-1), vascular endothelial growth factor (VEGF), transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), basic fibroblast growth factor (bFGF)などのサイトカインも発現していた。さらに pericyte が産生放出する液性因子により PnMECs の TEER 値が上昇, <sup>14</sup>C-inulin 透過性が低下し, バリア機能が増加した。claudin-5 の発現増加も確認できた。

#### 考察

今回我々はヒト坐骨神経神経内膜内微小血管の構成細胞である PnMEC および pericyte の単離に成功した。近年, BBB ばかりでなく BNB でも tight junction の維持に claudin-5 が重要であることが明らかになりつつあるが<sup>4)5)</sup>, 今回の検討で pericyte により放出されている液性因子が PnMECs の claudin-5 の発現を増加させ, BNB のバリア機能を高めている可能性が考えられた。また今回の解析で, BBB で



astrocyte が産生するサイトカインである Ang-1, VEGF, TGF- $\beta$ , bFGF を, BNB を構成している pericyte も発現していることが明らかとなり, それらあるいはその他の未知の物質を介して BNB の機能を高めている可能性が想定された.

#### 結論

ヒト坐骨神経から BNB を構成する PnMECs および pericyte の単離に成功した. BNB では pericyte が液性因子を介し PnMECs のバリア機能を高めており, BBB で astrocyte が果たすべき役割を BNB では pericyte が担っている可能性が考えられた.

#### 文献

- 1) Kanda T et al. Glycosphingolipid antibodies and blood-nerve barrier in autoimmune demyelinating neuropathy. *Neurology*. 2000; 54: 1459-64.
- 2) Lach B et al. Immunoelectron microscopic localization of monoclonal IgM antibodies in

gammopathy associated with peripheral demyelinating neuropathy. *Acta Neuropathol*. 1993; 85: 298-307.

- 3) Abbott NJ et al. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*. 2006 ; 7: 41-53.
- 4) Sano Y. et al. Endothelial cells constituting blood-nerve barrier have highly specialized characteristics as barrier-forming cells. *Cell Struct Funct*. 2007; 32: 139-147.
- 5) Kanda T. et al. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: decreased claudin-5 and relocated ZO-1. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2004; 75: 765-769.

#### 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

# 健常者及び多発性硬化症患者における免疫グロブリン G の樹状細胞分化の修飾

分担研究者 糸山泰人<sup>1)</sup>

共同研究者 佐々木 巧<sup>2)</sup>、大隈浩一<sup>2)</sup>、亀井慎太郎<sup>2)</sup>、奥田祥士<sup>2)</sup>、  
中野宏俊<sup>2)</sup>、濱本高義<sup>2)</sup>、藤原一男<sup>1)</sup>、中島一郎<sup>1)</sup>、三須建郎<sup>1)</sup>

## 研究要旨

免疫グロブリン G (IgG) 療法が多発性硬化症 (MS) の再発抑制に有効との報告があるが、IgG の抗原提示細胞への効果は不明である。そこで MS 9 例と健常人 8 例の末梢血単球培養系にモノカインを添加し、IgG の樹状細胞 (DC) の分化などへの影響を解析した。その結果、健常人の単球では IgG は CD1a (未成熟 DC マーカー) 及び CD40, CD80 (T 細胞活性化マーカー) の発現を一部抑制した。一方 IgG は CD83 (成熟 DC マーカー) の発現を亢進させた。また IgG は成熟 DC の血液脳関門通過に必要な CD49d (VLA-4 $\alpha$ 4 インテグリン) の発現を顕著に抑制した。これらは健常人、MS 共に観察された。IgG は両群の IL-12 産生を抑制したが、IL-10 は抑制しなかった。以上より IgG は DC の分化を制御し、免疫細胞の中枢神経内浸潤抑制とサイトカイン調節を介して MS の再発を抑制する可能性がある。

## 研究背景

免疫グロブリン静注療法 (IVIG) は、種々の自己免疫疾患の有効な治療法であることが示されており、再発寛解型多発性硬化症 (RRMS) においても有効との報告がある。IVIG の作用機序として、抗 idiotypic 抗体による自己抗体の中和、補体介在性障害の抑制、活性化リンパ球からの炎症性サイトカイン産生抑制、Fc 受容体を介した炎症の抑制などが考えられているが、自己反応性 T 細胞の発生を促進する樹状細胞 (DC) への影響は十分検討されていない。RRMS において単球由来の DC (Mo-DC) が神

metalloproteinase-9 を産生することが示されており、また RRMS 患者の髄液中に Mo-DC の分化を促進する液性因子があるとの報告もある。したがって Mo-DC は MS の病態へ関与していることが十分考えられ、治療の標的細胞となる可能性がある。

本研究では、IVIG の IgG が健常人及び RRMS 患者の Mo-DC の分化、種々の免疫関連表面マーカー分子の発現、サイトカイン産生などどのような影響を与えるのかを検討した。

## 研究方法

### 被検者

当科外来に通院中の寛解期の RRMS 患者 9 名 (M/F=1/8、年齢 31-49 歳、中央値 42 歳) と健

1) 化学及血清療法研究所  
2) 東北大学医学部神経内科

常人 8 名 (M/F=1/7、年齢 27-49 歳、中央値 32 歳) の末梢血を採取し解析した。採血時には MS 患者はいずれもインターフェロン  $\beta$  やステロイドなどの免疫調整剤の投与は受けていなかった。本研究は東北大学医学部倫理委員会のガイドラインに従い、被検者に本研究の内容を説明し書面で同意を得て実施した。

#### Mo-DC の分化・誘導

末梢血から RosetteSep Human Monocyte Enrichment Cocktail を用いて単球画分を分離し、続いてプラスチック付着性の単球を分離して、GM-CSF 及び IL-4 存在下で 7 日間培養した (未熟 DC ; iDC)。その後、TNF- $\alpha$  及び IL-1 $\beta$  存在下で 2 日間培養して成熟 DC (mDC) を分化・誘導した。また、IVIg の DC 分化・誘導に及ぼす影響を調べるため、完全分子型 ヒト IgG 20mg/mL を必要に応じて培養開始時 (day 0) または 7 日目 (day 7) より添加した。

#### DC の解析

経時的 (day 0, 7, 9) に細胞を回収し、DC 分化・誘導に伴って発現する細胞表面抗原 (CD1a, CD83, CD40, CD80, CD86, CD49d, HLA-DR) を蛍光標識単クローン抗体で染色して、フローサイトメトリー解析を行った。また、DC が分化の過程で産生するサイトカイン (IL-12, IL-10) について調べるため、Cytotfix/Cytoperm kit (BD Bioscience) を用いて細胞内サイトカインのフローサイトメトリー解析を行った。

#### (倫理面への配慮)

本研究は東北大学医学部倫理委員会による認可を得て行われた。

#### 研究結果

(1) 健常者由来の Mo-DC では、IgG は未成熟 DC (imDC) のマーカーである CD1a 及び T 細胞活性化のマーカーである CD40、CD80 の発現を部分的に抑制した。

(2) IgG は成熟 DC (mDC) のマーカーである CD83 の発現を亢進させた。

(3) IgG は、mDC が血液脳関門を通過する際に必要な接着因子である CD49d (VLA-4 $\alpha$ 4 インテグリン) の発現を高度に抑制した。

上記の表面マーカー分子の発現については健常人、MS 患者で同様の結果を得た。

(4) IgG は健常人、MS 患者由来の細胞において、mDC の分化に関連する IL-12 の産生を抑制したが、IL-10 の産生は抑制しなかった。

#### 考察・結論

本研究により、IVIg は炎症を抑制する既知のメカニズムの他に、DC の成熟化を調整しその結果免疫細胞の中枢神経組織内への浸潤を抑制し、サイトカインプロファイルでは Th1 反応を抑制することにより、MS の再発抑制に寄与する可能性が示唆された。

#### 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

## グルタミン酸毒性阻害による多発性硬化症の治療戦略

分担研究者 錫村明生<sup>1)</sup>

共同研究者 竹内英之<sup>1)</sup>, 八幡泉<sup>1)</sup>, 菌部佳史<sup>1)</sup>, 金世杰<sup>1)</sup>, 水野哲也<sup>1)</sup>

### 研究要旨

多発性硬化症、虚血、神経変性疾患など様々な神経疾患の神経細胞傷害部に活性化ミクログリアおよびマクロファージの集簇が認められ、神経変性におけるこれらの細胞由来のグルタミン酸興奮毒性の関与が指摘されている。これまでに我々は、通常の生理状態での自身の恒常性維持の経路とは別に、活性化ミクログリアではグルタミンナーゼが誘導され、細胞外のグルタミンを基質にしてグルタミン酸を大量に合成し、ギャップ結合を介して細胞外へ放出することを明らかとした。

今回我々は、ミクログリアおよび腹腔マクロファージの炎症反応と神経細胞傷害に対するギャップ結合阻害剤 carbenoxolone (CBX) およびグルタミンナーゼ阻害剤 6-Diazo-5-oxo-L-norleucine (DON) の効果を検討し、さらに、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) マウスへの CBX および DON の投与による EAE 抑制効果について検討を行った。その結果、活性化ミクログリアおよびマクロファージは NO とグルタミン酸を産生することにより神経細胞死を誘導し、この現象は CBX と DON で抑制された。また、EAE に関しては、2 mg/kg CBX 投与群および 1.6 mg/kg DON 投与群で、有意な臨床症状抑制効果が認められた。

以上から、ギャップ結合阻害剤およびグルタミンナーゼ阻害剤によるグルタミン酸毒性の阻害が、多発性硬化症を含む各種神経疾患における神経変性に対して有用である可能性が示唆された。

### 研究目的

多発性硬化症の後遺症を規定する神経変性の病態に、活性化ミクログリア/マクロファージ由来の炎症性因子やグルタミン酸による興奮性神経傷害機序の関与が考えられている<sup>1,2)</sup>。

これまでに我々は、活性化ミクログリアからのグルタミン酸の産生・放出を解明した。通常の生理状態での自身の恒常性維持の経路とは別に、病態下では、活性化に伴い、ミクログリアにグルタミンナーゼが誘導され、細胞外のグルタミンを基質にしてグルタミン酸を大量に合成

し、ギャップ結合を介して細胞外へ放出する<sup>1)</sup>。

今回我々は、ミクログリアに近似した細胞系譜に属するマクロファージにおける同様のグルタミン酸産生機序の有無、および、ギャップ結合阻害剤およびグルタミンナーゼ阻害剤の EAE に対する有効性について、初代培養細胞および EAE マウスを用いて検討した。

### 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。

ミクログリアは C57BL/6 マウスの新生

<sup>1)</sup>名古屋大学環境医学研究所神経免疫学

仔から作成した混合グリア細胞初代培養より単離、マクロファージは同系マウスの腹腔から採取、単離した。これらの細胞へのLPS刺激と共にCBXまたはDONを添加し、この培養上清を大脳皮質神経細胞初代培養へ添加し、誘導される細胞死を色素排除法により評価した。また、炎症性因子産生については、サイトカインはRT-PCRおよびELISA、一酸化窒素(NO)はGriess法、活性酸素はNBT還元法、グルタミン酸は酵素比色法にて測定した。

さらに、C57BL/6マウスにMOG<sub>35-55</sub>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、CBX(0.2, 2, or 20 mg/kg)もしくはDON(0.016, 0.16, or 1.6 mg/kg)を隔日腹腔内投与した。

## 研究結果

活性化ミクログリアおよびマクロファージは、TNF- $\alpha$ などの炎症性サイトカイン、NO、活性酸素、およびグルタミン酸を産生し、共培養での神経細胞死を誘導したが、CBXおよびDONは容量依存的にNOとグルタミン酸の産生と誘導される神経細胞死を抑制した。

EAEに関しては、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が、治療群では、2 mg/kg CBX投与群および1.6 mg/kg DON投与群で、有意な臨床症状抑制効果が認められた。

## 結論

ギャップ結合阻害剤およびグルタミンナーゼ阻害剤により、*in vitro*での活性化ミクログリアおよびマクロファージ由来の

グルタミン酸産生を介した神経細胞死が抑制され、また、*in vivo*においてもEAE抑制効果が認められた。

以上より、ギャップ結合阻害剤およびグルタミンナーゼ阻害剤によるグルタミン酸毒性の阻害が、多発性硬化症を含む各種神経疾患における神経変性に対して有用な治療戦略である可能性が示唆された。

## 文献

1. Takeuchi H. et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces neurotoxicity via glutamate release from hemichannels of activated microglia in an autocrine manner. *J. Biol. Chem.* 281: 21362-21368, 2006.
2. Mizuno T, et al. Interferon- $\gamma$  directly induces neurotoxicity through a neuron specific, calcium-permeable complex of IFN- $\gamma$  receptor and AMPA GluR1 receptor. *FASEB J.* 2008 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：

1. 錫村明生、竹内英之、公開番号WO2007/088712「神経細胞の細胞死阻害剤及びスクリーニング方法」
2. 国際出願 PCT/JP2007/00005026144 神経細胞の細胞死阻害剤およびスクリーニング方法

実用新案登録：なし

## Midkine 阻害による多発性硬化症の治療戦略

分担研究者 錫村明生<sup>1)</sup>

共同研究者 竹内英之<sup>1)</sup>, 菌部佳史<sup>1)</sup>, 金世杰<sup>1)</sup>, 水野哲也<sup>1)</sup>, 村松壽子<sup>2)</sup>,  
村松喬<sup>2)</sup>, 中村義一<sup>3)</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、抗体医薬を代替していくと考えられている。我々はこれまでに、MK ノックアウトマウスや抗 MK 中和抗体あるいは RNA aptamer 投与野生型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 阻害により CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>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。今回我々は、MK 阻害による Treg 増加についての詳細な機序を検討し、また、EAE 発症後の MK 阻害による EAE 抑制効果について検討した。その結果、MK は CD4<sup>+</sup>T 細胞での SHP-2 発現を増加させ、STAT5 の脱リン酸化を介して FoxP3 発現を減少させることが明らかとなった。また、EAE 発症後での抗 MK RNA aptamer 投与群でも、EAE 発症率には差は見られなかったが臨床症状は有意に改善した。Aptamer を用いた MK 阻害は、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>。成人では健康時にはほとんど誘導されず、病態下で強く誘導される。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>。

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。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、などの中和抗体を凌駕する様々な特性があり、今後抗体医薬を代替していくものと考えられている。

我々は前回までに、MK 阻害により Treg の増加を介して EAE が抑制されることを報告した。そこで、今回我々は、MK 阻害による Treg 増加についての詳細な機序の検討と、実用化を目指した、抗 MK RNA aptamer の EAE 発症後投与による EAE 抑制効果について検討した<sup>4)</sup>。

### 研究方法

<sup>1)</sup>名古屋大学環境医学研究所神経免疫学

<sup>2)</sup>名古屋大学大学院医学系研究科生物化学

<sup>3)</sup>東京大学医科学研究所遺伝子動態分野

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 MOG<sub>35-55</sub> 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。抗 MK RNA aptamer (リボミック社製) は 15 mg/kg を EAE 発症確認後から隔日腹腔内投与した。MK の細胞内シグナル解析のため、脾臓 CD4<sup>+</sup>T 細胞へ各種細胞内リン酸化シグナル阻害剤および MK を投与し、Western Blotting および flowcytometry により SHP-2、リン酸化 STAT を解析した。

## 研究結果

*In vitro* での検討により、MK 刺激により CD4<sup>+</sup>T 細胞での SHP-2 発現が増加し、STAT5 の脱リン酸化を介して FoxP3 発現を減少させることが明らかとなった。末梢リンパ節および中枢神経系浸潤リンパ球の解析では、自己反応性 Th1/Th17 細胞の免疫反応が MK 阻害 EAE マウスで有意に減少していた<sup>4)</sup>。

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が、EAE 発症後での抗 MK RNA aptamer 投与群では、臨床症状は有意に改善した<sup>4)</sup>。

## 結論

MK 抑制により CD4<sup>+</sup>T 細胞での SHP-2 発現が低下し、STAT5 リン酸化を介した FoxP3 の発現増加とそれに伴う抗原特異性 Treg の活性化が誘導され、これによる自己反応性 Th1/Th17 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。

EAE 発症後の MK 阻害での有効性が確認されたことから、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戦略たりうるものと考えられる。

## 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.
4. Wang J, Takeuchi H. et al. Inhibition of midkine alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis through the expansion of regulatory T cell population. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008 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：

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
3. 国際出願 PCT/JP2006/322659 調節性 T 細胞の機能異常に基づく疾患の治療剤、およびその応用

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、奥野龍禎、木下允

## 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の重症度はエダラボン投与により有意に改善し、組織学的解析では脊髄におけるリンパ球とマクロファージの浸潤が減少していた。またEAE脊髄におけるinducible NO synthase (iNOS)、MHC class II、vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1)の発現もエダラボン投与により減少した。in vitro においては、ミクログリアにおけるiNOS発現抑制、およびリンパ球-内皮細胞間接着抑制を認めた。エダラボンはEAEの重症度を改善し、その機序として細胞浸潤の抑制ならびに中枢神経におけるミクログリア活性化の抑制が関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、抗酸化剤がEAEの重症度を改善することが報告されている。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としてS/JLマウスにPLP<sub>139-151</sub>ペプチドを免疫した。免疫5日あるいは11日後から、エダラボン(高用量群20 mg/kg/day、低用量群6 mg/kg/day)を2回/日に分け腹腔内投

与(ip)して重症度を評価した。慢性進行型EAEとしてC57BL/6マウスにMOG<sub>35-55</sub>ペプチドを免疫し、直後と48時間後に百日咳毒素をipした。免疫20日後から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;両後肢の重度の麻痺、4;両後肢の完全麻痺、5;瀕死あるいは死亡。

急性型EAEにおいて免疫5日後からエダラボン(20 mg/kg/day)をipし、免疫11あるいは12日後に脊髄を摘出した。HE染色、免疫組織化学[CD3, Iba-1, MHC class II, inducible NO synthase (iNOS), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)], およびウエスタンブロット(MHC class II, iNOS, VCAM-1)により評価した。



ミクログリア細胞株をエダラボンの存在下で CD40 刺激抗体・IFN- $\gamma$  で刺激し、ウエスタンプロット(iNOS)により検索した。adhesion assayとして、マウスから単離したリンパ球を ConA 刺激し、蛍光ラベルした後に、TNF- $\alpha$  刺激したマウス内皮細胞株の layer 上に静置した。一部の細胞には培地にエダラボンを添加して実験した。洗浄して非接着細胞を除いた後、蛍光強度を測定した。

(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、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においてエダラボン投与により重症度は有意に改善しており、発症後投与では高用量群において有意に改善していた。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。急性型 EAE に対する予防的投与において、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 陽性リンパ球と Iba-1 陽性マクロファージの浸潤が抑制されていた。また脊髄の免疫組織化学・ウエスタンプロットにおいて、iNOS, MHC class II, VCAM-1 発現の抑制が認められた。in vitro の解析においては、ミクログリアにおける iNOS 発現がエダラボンの存在により抑制され、adhesion assay においては、リンパ球-内皮細胞間の接着はエダラボンの存在により抑制された。

細胞間の接着はエダラボンの存在により抑制された。

#### 考察

エダラボンは EAE 脊髄とミクログリアにおける iNOS の発現を抑制する効果を持つことが分かった。iNOS は病的環境において NO を産生し神経障害性に働くため、この抑制効果が EAE の重症度抑制に関与している可能性が考えられた。またエダラボンは血球-内皮細胞間の接着を抑制することにより、血球の血液脳関門の通過および中枢神経系への浸潤を抑制している可能性が考えられた。

#### 結論

エダラボンの投与により、EAE の重症度は改善し、その機序のとしては iNOS 抑制効果、および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

## 実験的自己免疫性脳脊髄炎に対する安定化ガレクチン9療法の試み

分担研究者 松井 真<sup>1)</sup>

共同研究者 荒谷信一<sup>1)</sup>、北川陽子<sup>1)</sup>、山内清明<sup>2)</sup>、菌部佳史<sup>3)</sup>、錫村明生<sup>3)</sup>

### 研究要旨

ガレクチン9はβガラクトシドに結合する糖鎖結合蛋白で、2個の糖結合ドメインをリンカーが結合する。ガレクチン9は好酸球遊走因子として同定され、免疫系では活性化リンパ球のアポトーシス誘導、炎症性サイトカイン産生の抑制などがあげられる。今回、安定化ガレクチン9を用い、実験的自己免疫性脳脊髄炎に対する治療を試みた。その結果、コントロール群と皮下注射6μg/マウス群に有意差があつた。ガレクチン9は関節リウマチモデル動物を軽症化させることが知られており、多発性硬化症も含めたヒトの臓器特異的自己免疫疾患の治療に応用できる可能性が示唆された。

### 研究目的

ガレクチン9はβガラクトシドに結合する糖鎖結合蛋白で、2個の糖結合ドメインをリンカーが結合する。ガレクチン9は当初好酸球遊走因子として同定され、免疫系では活性化リンパ球のアポトーシス誘導、炎症性サイトカイン産生の抑制などがあげられる。今回われわれは、安定化ガレクチン9を用い、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) に対する治療を試みた。

### 研究方法

#### 1) 材料

安定化ガレクチン9:ガレクチン9のリンカー部分は蛋白分解を受けやすいので、実験にはリンカー部分を削除したガレクチン9 (安定化ガレクチン9) を用いた。

#### 2) EAE の作製

動物はC57BL/6J ♀を用い、ミエリンオリゴデントロサイト糖蛋白 (MOG) 35 - 55 とフロイント完全アジュバント (CSF) をエマルジョン化しマウス腰背部の皮下注射後、百日咳菌毒素 (PTX) を腹腔注射し作製。

神経症候は臨床スコア (0:正常、1:尾

1) 金沢医科大学脳脊髄神経治療学神経内科学

2) 香川大学医学部細胞制御学

3) 名古屋大学環境医学研究所神経免疫

の脆弱化、尾の低位置保持、2:後肢の脆弱化、3:後肢麻痺、4:全身麻痺、5:全身衰弱、死亡)を用い抗原接種後30日間、観察した。

EAE作製マウスに安定化ガレクチン9を腹腔注射0.6μg/マウス5匹、皮下注射0.6μg/マウス5匹、皮下注射6μg/マウス5匹、コントロール5匹を使用。

(倫理面での配慮)

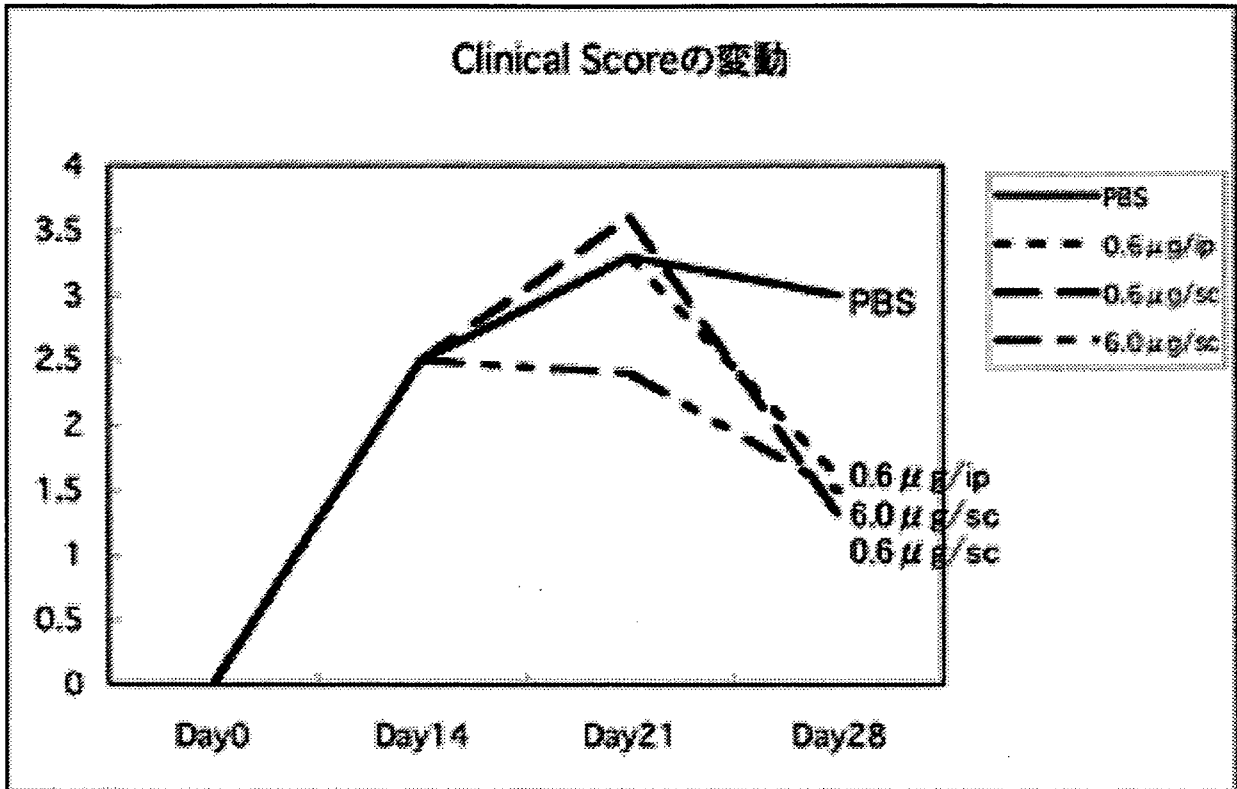
すべての動物実験は、動物愛護の観点から、金沢医科大学動物実験委員指針に従って行われた。

### 研究結果

次頁の図に示すように、皮下注射6μg/マウス群 (2点鎖線) において、コントロール群に比し回復が有意に促進していた (Two-way ANOVA 最小有意差法多重比較)。

### 結論

自己免疫疾患の病因や病態の進行に関与するTh1リンパ球細胞膜上のTim3分子にガレクチン9が結合すると活性化Th1リンパ球のアポトーシスが誘導される事が示されている。実験的自己免疫性脳脊髄炎においても、同様な機序による軽症化の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

## ウイルス性脱髄モデルの中樞神経病変における 免疫担当細胞の組織学的検討

分担研究者 大原 義朗<sup>1)</sup>  
共同研究者 鈴木 博義<sup>2)</sup>、齊藤 峰輝<sup>1)</sup>、谷浦 直子<sup>1)</sup>、大桑 孝子<sup>1)</sup>

### 研究要旨

タイラーウイルス DA 亜群の非性構成 L 蛋白のセリンをプロリンに置換した変異ウイルス DAL<sub>Pro</sub> は慢性期においても大脳白質に強い壊死巣を形成する事を報告してきた。今回はミクログリアと組織障害性 CD8+リンパ球の時間的出現パターンおよびそれらの免疫担当細胞の変化を免疫染色により経時的に観察し、病変の広がりや強さの推移を他のタイラーウイルス亜群と比較検討した。いずれのウイルスにおいてもはじめに活性化型ミクログリアが出現し、3 日ないしは 7 日にはさらに CD8+リンパ球が多数出現した。DA、DAL<sub>Pro</sub> では慢性期(45 日、90 日)では脊髄にミクログリア、CD8+リンパ球が持続的に認められ、両者での差はなかったが、大脳においては DA では活性化型ミクログリア、CD8+リンパ球は減少し、DAL<sub>Pro</sub> ではさらに白質の海綿状変化、壊死などの変化が強くなるとともに活性化型ミクログリア、CD8+リンパ球が増加した。初期の免疫反応が起こる急性期においてはミクログリア、CD8+の出現パターンにはウイルス間で差異は見られなかったが、病変の推移とこれらの細胞の浸潤には相関があり、病変の形成にこれらの免疫担当細胞が関与があるものと考えられた。

### 研究目的

我々は変異ウイルス DAL<sub>Pro</sub> により慢性感染期において従来の DA 株で生じるマウス脊髄の白質脱髄病変に加えて大脳白質に壊死が起こることを報告してきた。今回は脳内の病変の形成に免疫担当細胞がどのように関与しているか検討するために病変部のミクログリアおよび CD8+リンパ球の動態を免疫染色に検索し、強毒株 GDVII および弱毒株 DA と比較検討する。

### 研究方法

DAL<sub>Pro</sub>、DA、GDVII をマウス脳内に接種後、3 日、7 日の急性期、さらに DAL<sub>Pro</sub>、DA では 45 日、90 日に深麻酔下、経心的に中性ホルマリンで灌流固定し、脳および脊髄を取り出しパラフィンに包埋して組織標本を作製した。標本はヘマトキシリン・エオジン・ルクソールファストブルー (HE-LFB) 染色で組織学的評価を行った。更にアビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ法でミクログリアのマーカーとして Iba1 (和光純薬、希釈 2000 倍)、抗マウス CD3 (Santa Cruz Biotechnology 希釈 10

<sup>1)</sup> 金沢医科大学 医学部 生体感染防御学部門

<sup>2)</sup> 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