

実験的アレルギー性脳脊髄炎に対する Phosphodiesterase Inhibitor の抑制効果

奈良県立医科大学神経内科学教室

田 丸 司

EFFECTS OF COMBINED THERAPY OF PHOSPHODIESTERASE INHIBITORS ON EXPERIMENTAL ALLERGIC ENCEPHALOMYELITIS

TSUKASA TAMARU

Department of Neurology, Nara Medical University

Received July 5, 2004

Abstract : The effects of combined therapy of subtypes of phosphodiesterase inhibitors (PDEIs), which can inhibit the production of $TNF\alpha$, were studied in rats with actively induced experimental allergic encephalomyelitis (EAE) by myelin basic protein. The rats with EAE were treated with a single PDEI or the combination of two or three PDEIs (amrinone: type3 PDEI, 50mg/kg/day, papaverin HCl: non-specific type, 20mg/kg/day, and dipyridamole, 50mg/kg/day). Each agent or the combination was injected throughout days 1-10 or days 1-21 or days 8-21 (only three PDEIs). In the group treated with three PDEIs for days 1-21, the incidence of the disease was less than half and the clinical score was significantly decreased compared to the control group treated with normal saline. The other groups treated with one or two PDEIs were partially effective. On pathological examination, mononuclear cell infiltration in the spinal cord was decreased in the most effective group. The mRNA expression of $TNF\alpha$ by the RT-PCR method in peripheral blood cells and spinal cord was decreased in the group treated with three PDEIs. This study suggests that the combination therapy of three subtypes of PDEIs is effective in the treatment of EAE in the rat and the combination therapy of PDEIs may be of benefit in the treatment of multiple sclerosis.

Key words : experimental allergic encephalomyelitis, phosphodiesterase inhibitor, multiple sclerosis

緒 言

多発性硬化症 (Multiple sclerosis; MS) は、中枢神経系の炎症性脱髄疾患である。その発症機序はいまだ明らかではないが、髄鞘構成成分に対する自己免疫性脱髄であり $TNF\alpha$ などのサイトカインがその発症に重要な役割を果たすことが知られている^{1,2)}。急性期の MS の髄液中で $TNF\alpha$ が高値であり^{3,4)}、組織上で炎症部位に $TNF\alpha$ の存

在が確認されていること¹⁾などから、 $TNF\alpha$ はある程度病勢を反映していると考えられている。また、 $TNF\alpha$ は培養オリゴデンドロサイトに傷害性に働き⁵⁾、MS の動物モデルである実験的アレルギー性脳脊髄炎 (Experimental Allergic Encephalomyelitis: EAE) の発症を抗 $TNF\alpha$ 抗体が抑制すること^{2,6)}などから発症機序にも重要な役割を果たしている。以上のことから、 $TNF\alpha$ の抑制が、MS の治療に有用である可能性が示唆される。

TNF α の抑制効果をもつ薬剤として、phosphodiesterase inhibitor (以下 PDEI と略す)とよばれる薬剤群がありすでに臨床応用もされている⁷⁻¹²⁾。PDEI は、作用機序からタイプ1からタイプ5のPDEI及び非選択的PDEIの6種類に分類される⁷⁾。それぞれ薬理的機序が異なるため、数種のPDEIを併用することでTNF α を有効に抑制しようと考えられる。これまで我々は、マイクログリアを用いた in vitro 実験系で、数種のPDEI併用することにより、単剤より低濃度でTNF α 産生を抑制すること、かつ非選択的PDEIとタイプ3およびタイプ5のPDEIを組み合わせが有効であることを確認している⁸⁾。そこで本研究において、EAEを誘導したラットに非選択的 /type 3/type5 PDEIを組み合わせて投与し、発症抑制効果を検討した。また末梢血リンパ球、脊髄内でのTNF α と抑制性サイトカインであるIL-10の動態をRT-PCR法を用い確認した。

材料と方法

1) 実験動物および EAE の作成

1. 動物

動物は6週令の雌Lewisラット(日本SLC, 浜松)170匹を購入し、1週間の馴化の後、6週齢にて実験に用いた。ラットはステンレス製金網ケージに個別に収容し、温度23℃、相対湿度55±5%、換気回数10-15回/時間、12時間明暗サイクルの条件下にて飼料水道水を自由に与えて飼育した。

2. EAE の誘導

EAEの誘導にはミエリン塩基性蛋白(MBP)の能動的

免疫法を用いた。MBPの合成ペプチド(Sigma, St. Louis, MO)80mgを乾燥結核死菌10mg, Freund Incomplete Adjuvant (CFA) 1mlを混合してアジュバントを作成し、一足のfoot padに一匹あたり0.1mlを皮下投与し免疫した¹³⁾。予備実験として20匹のLewisラットを用い、EAE発症率を調べた。

3. 臨床重症度スコアの観察

感作動物は十分な給餌のもとに毎日観察を行い、個々の尻尾や四肢の筋力の程度から以下の臨床スコア¹⁰⁾をつけ記録した。

- 0 : 正常,
- 1 : 尻尾の脱力
- 2 : 軽度の下肢脱力
- 3 : 完全な下肢脱力
- 4 : 四肢麻痺
- 5 : 死亡

臨床スコアは各群について病理学的検討およびRT-PCR法のために使用した個体を除いた10匹を平均し、EAE発症日やスコアの変化についてコントロール群と比較した。

2) 薬剤投与

150匹のLewisラットにEAE誘導をおこない、薬剤投与をした。Yoshikawaら⁸⁾の報告より、type 3 PDEIのamrinone (Meiji), type 5 PDEIのdipyridamole (Boehringer / Yamanouchi), 非選択的PDEIのpapaverin HCl (Dainippon)の3種類のPDEIを使用した。これらの薬剤は水溶性であるため動物に確実に投与できることも利点であった。薬剤投与期間およびその組み合わせ

Table 1. Experimental design

Group	Treatment(s)	Days of treatment
C	Normal saline	1-21
A(1-10)	Amrinone	1-10
P(1-10)	Papaverin HCl	1-10
D(1-10)	Dipyridamole	1-10
AP(1-10)	Amrinone + Papaverin HCl	1-10
APD(1-10)	Amrinone + Papaverin HCl + Dipyridamole	1-10
A(1-21)	Amrinone	1-21
P(1-21)	Papaverin HCl	1-21
D(1-21)	Dipyridamole	1-21
AP(1-21)	Amrinone + Papaverin HCl	1-21
APD(1-21)	Amrinone + Papaverin HCl + Dipyridamole	1-21
APD(8-21)	Amrinone + Papaverin HCl + Dipyridamole	8-21

Table 2. Sequences of primer sets

Nucleotides		
TNF α	sense	5' TACTGAACTTCGGGGTGATTGGTCC 3'
	antisense	5' CAGCCTTGTCCCTTGAAGAGAACC 3'
IL10	sense	5' GACTTTAAGGGTTACTTGGGTTGC 3'
	antisense	5' CACTGCCTTGCTCTTATTTTCACA 3'
β actin	sense	5' TTGTAACCAACTGGGACGATATGG 3'
	antisense	5' GATCTTGATCTTCATGGTGCTAGG 3'

せについて12群に分けた (Table 1). 薬剤投与は MBP の感作をおこなった日を第 1 日とし, 1 日 1 回の投与を行った. C 群は 1-21 日間生理食塩水投与, A(1-10), P(1-10), D(1-10) 群はそれぞれ amrinon, papaverin HCL, dipyridamole を 1-10 日単独投与, AP(1-10) 群は, amrinone と papaverin HCL の 2 剤投与, APD(1-10) 群は, amrinone, papaverin HCL, dipyridamole の 3 剤投与とした. 以下同様に A(1-21), P(1-21), D(1-21), AP(1-21), APD(1-21) 群は, 1 から 21 日間投与した群である. APD(8-21) は 3 剤を 8 から 21 日間投与とした. 薬剤投与量は下記とした.

- a) 生理食塩水(1ml/日, 皮下投与)
- b) amrinone (30mg/kg/日, 腹腔内投与)
- c) papaverin HCl (30mg/kg/日, 皮下投与)
- d) dipyridamole (50mg/kg/日, 腹腔内投与)

3) 病理学的検討

感作後第 14 日目に, 12 群より一匹ずつ動物を抽出し, 十分なエーテル麻酔のもとに 4%パラホルムムアルデヒドを用いて灌流固定をおこない脊髄を採取した. 凍結固定後に薄切切片を作成しヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色をおこない, 光学顕微鏡下で単核細胞の浸潤を観察した.

4) Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法によるサイトカイン (TNF α , IL-10) mRNA の発現

末梢白血球成分および脊髄を取り出し RT-PCR 法による mRNA の検討を行なった. 第 7, 14, 21 日に C 群, AP(1-10) 群, APD(1-21) 群より 3 匹ずつ動物を無作為に抽出し, 十分なエーテル麻酔のもとに腹部を切開し, 下大静脈を注射器で穿刺し全血を採取した. 次いで背部を切開し, 下部脊髄を採取した. 採血した全血は Ficoll gradient 法を用いてリンパ球成分を抽出し, 細胞数をカウントした. 脊髄内については EAE の免疫反応に関わるすべてのサイトカイン産生細胞を採取するため, 単核細胞 (浸潤 T 細胞, マクロファージ) のみならずミクログ

リア, アストロサイトを含む全ての細胞を対象として mRNA の抽出をおこなった.

採取したリンパ球 5×10^7 , あるいは脊髄 100mg に対し, 1ml の TRIZOL 液 (GIBCO/BRL, Grand Island 社, New York) 中でホモジナイズし, プロトコールに従って全 RNA を抽出した.

RNA は水 12 μ l (RNase-free) に溶解し, 10 分間 56 $^{\circ}$ C で加温後, -80 $^{\circ}$ C で保存した. RNA 1 μ g を RNase-free の DNase (Boehringer Mannheim 社, Indianapolis, IN) 処理後, random primers と GeneAmp RNA PCR Kit (Perkin-Elmer, Roche Molecular 社, Branchburg, NJ) を用い, プロトコールに従い逆転写 (RT) 反応をおこなった. 次に合成された cDNA について, 50pmol の TNF α , IL-10, β アクチンの各 primer (Table 2) を加え, 95 $^{\circ}$ C 1 分, 55 $^{\circ}$ C 1 分, 72 $^{\circ}$ C 1 分で 40cycle の PCR 反応をおこなった (Perkin Elmer Model 480 thermocycler). PCR 産物 (10 μ l) は 3% アガロースゲル電気泳動後, ethidium bromide (0.5 μ g/ml) 染色し, ポラロイドフィルム記録を, 512 \times 512-pixel gray-scale images でデジタル化し, 濃度分析をおこなった. サイトカイン (TNF α , IL-10) と β アクチンの比を各群で表示した.

5) 統計

統計学的解析は Student's t-test と一元配置法によりおこない危険率 5% 未満を有意とした.

結 果

1) 臨床スコア

a) EAE の発症とコントロール群 (Fig.1 A-C)

EAE の発症の確認では 20 匹すべての個体で EAE は発症し発症率は 100%であることを確認した. C 群でも発症率は 100%であり, 感作後約 7 日目に発症し, 第 13 日目に臨床スコアがピークとなり, 第 23 日目にはほぼ正常化する単相性の経過をとった.

b) 第 1-10 日間の薬物投与群 (Fig.1 A)

A(1-10) 群, P(1-10) 群, D(1-10) 群の単独薬剤投与群

では、発症がやや遅れたが、ピークスコアはC群と有意な変化はみられなかった。AP(1-10)群と、APD(1-10)群は、ピークスコアがC群と比べ有意に減少した。APD(1-10)群は、発症が第12日目となり、有意に遅延した。いずれの群でも発症率は100%であった。第1-10日間の投与では、単剤の投与ではほとんどコントロール群と変化がなく、2剤、3剤と併用することで、発症を遅延、重症度を改善させた。

c) 第1-21日間の薬物投与群 (Fig.1 B)

A(1-21)群、P(1-21)、D(1-21)群の単剤投与群は、第10日目に発症しピークスコアもやや低下したが、ともに有意ではなかった。AP(1-21)群では発症日、ピークスコアとも有意に改善した。これら3群はいずれも100%の発症率であったが、APD(1-21)群では発症率は40%であり、発症そのものが抑制された。発症した個体も有意に発症は遅延し、ピークスコアも1以下となった。第1-21日投与群でも第1-10日投与群と同様の経過を示し、3剤投与にて発症そのものも抑制された。

d) 第8-21日間の薬物投与群 (Fig.1 C)

APD(8-21)群では、発症日はC群とほぼ同様で、ピークスコアはやや低下したが有意差は得られず、EAEの経過を大きく抑制するものではなかった。

2) 病理学的検討 (Fig.2)

C群では脊髄実質内や軟膜周囲、血管周囲などに単核細胞が著明に浸潤していた (Fig.2a, b)。その他の群でもEAEの発症した個体では細胞浸潤はいずれも認められたが、臨床スコアの低い個体ではその程度が少なかった (Fig.2c,d)。APD(1-21)群の発症しなかった個体の脊髄では、C群でみられたような細胞浸潤はほとんどみられなかった (Fig.2e)。

2) RT-PCR 解析によるサイトカイン mRNA 発現

TNF α mRNA は、 β アクチン mRNA との比で表し Fig.3 の a に末梢血からの TNF α 、b に脊髄での TNF α

を示した。各群とも末梢血、脊髄ともに第7、14、21日目で発現し、第14日目に高値を示す傾向があった。C群より、AP(1-10)、APD(1-21)で、AP(1-10)群よりAPD(1-21)群で、TNF α 発現は減少した (Fig.3 a,b)。この傾向は末梢血と脊髄ともに同様に認められた。

IL-10 についても Fig.3 の c に末梢血での IL-10、d に脊髄での IL-10 を示す。第7、14、21日目で各群および末梢血、脊髄ともに発現し、第14日目に高値を示した (Fig. 3 c,d)。C群より、AP(1-10)、APD(1-21)群で IL-10 はより高く発現した。この傾向は末梢血、脊髄ともに認められた。以上より PDEI を併用し臨床改善した群において、炎症性サイトカインである TNF α 産生は抑制され、抑制性サイトカインである IL-10 は増加したことを mRNA レベルで確認した。

考 察

PDEI による EAE 抑制実験は現在までも試みられてきたが^{10,14-20)}、投与濃度や副作用のためその効果を疑問視する報告もなされてきた^{15,19)}。そこで、PDEI を単剤ではなく異なるタイプを併用することにより、薬剤を低濃度でより効力を発揮しうることが推察され、また有効な PDEI の組合せを確認する必要があると指摘されていた^{8,9)}。EAE の免疫学的な反応は、まず感作が行われると、末梢血内で免疫抗原が抗原提示細胞に取り込まれ細胞表面抗原上に提示、これを T 細胞が認識して増殖、活性化する導入期がある。次に活性化 T 細胞が中枢神経に移行し特異抗原を認識し、この過程を経て中枢神経に炎症巣を形成する効果期となる¹⁰⁾。ラットの MBP による EAE では、導入期は通常感作から1週間程度、その後症状軽快までが効果期と考えられている。今回の結果より、これら3種類の PDEI を導入期を含む全経過に用いることで、EAE の発症そのものを抑制する可能性があることがわかった。また、中枢神経内で免疫反応および炎症を抑

Fig. 1. Clinical scores of EAE rats

Fig.1.A. Amelioration of EAE by preventive application of several types of PDEIs. 60 Lewis rats were immunized with MBP in CFA (into one hind footpad and divided into 6 groups. From the beginning day, amrinone (A; 30mg/kg/d), papaverine (P; 30mg/kg/d), dipyridamole (D; 50mg/kg/d), amrinone and papaverine (AP; A; 30mg/kg/d, P; 30mg/kg/d), or amrinone, papaverine and dipyridamole (APD ; A; 30mg/kg/d, P ; 30mg/kg/d, D; 50mg/kg/d) were injected i.p. and continued until day 10. Control rats were sham-treated with saline (1ml/d) i.p. Clinical scores are described in Section 1(3). The clinical scores are improved in the group AP(1-10) and APD(1-21).

Fig.1.B. 60 Lewis rats were divided same as described above. Those PDEIs are injected from day 1 to day 21. Clinical scores are improved in the group AP(1-21) and APD(1-21), especially in APD(1-21), peak scores are suppressed significantly.

Fig.1.C. Therapeutic application of three PDEIs (amrinone; 30mg/kg/d, papaverine; 30mg/kg/d and dipyridamole; 30mg/kg/d) does not alter the course of EAE. Three PDEIs were injected from day 8 to 21. After scoring on day 14 one rat from each 12 groups was removed for histological investigations.

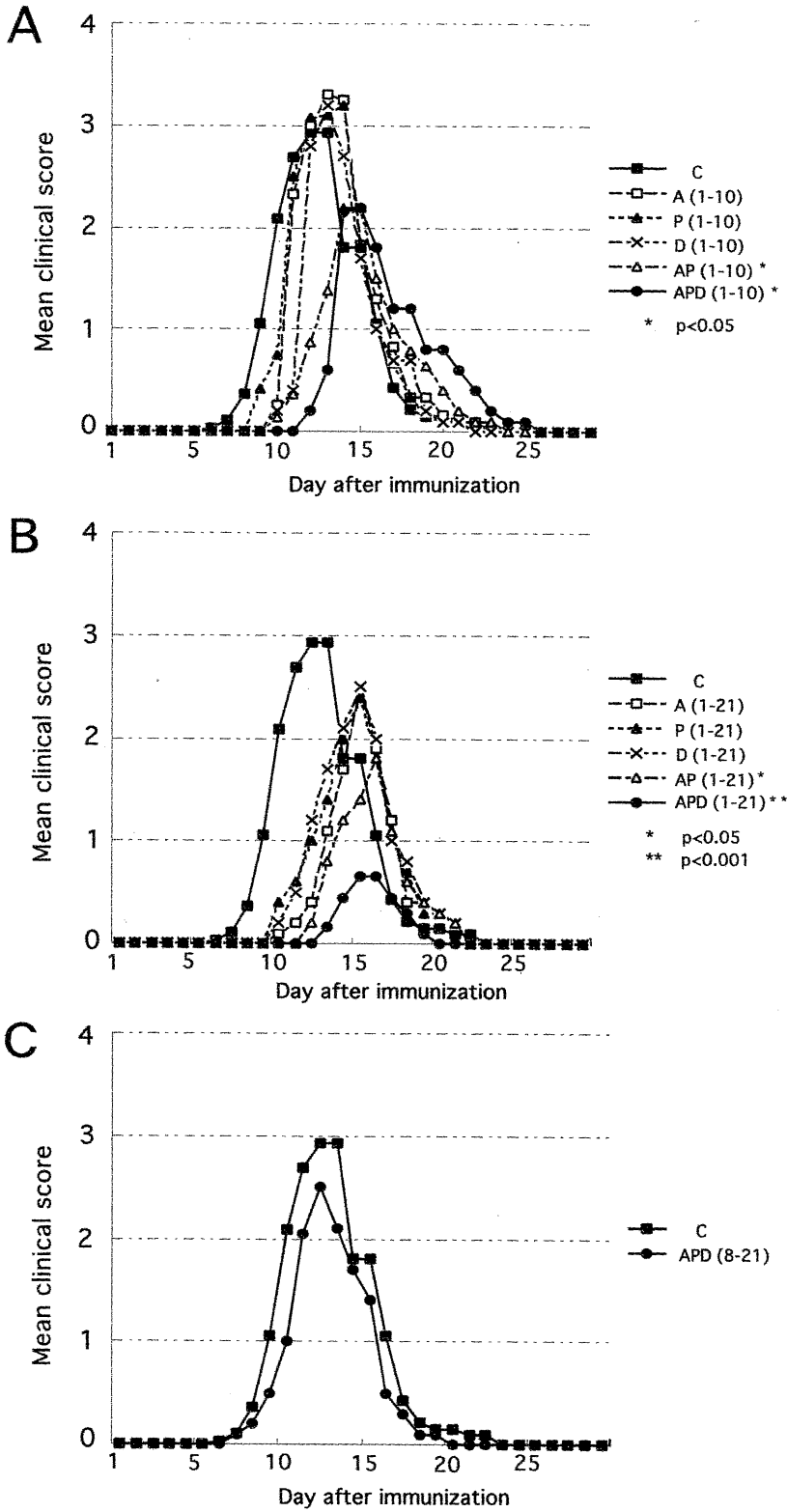


Fig. 1.

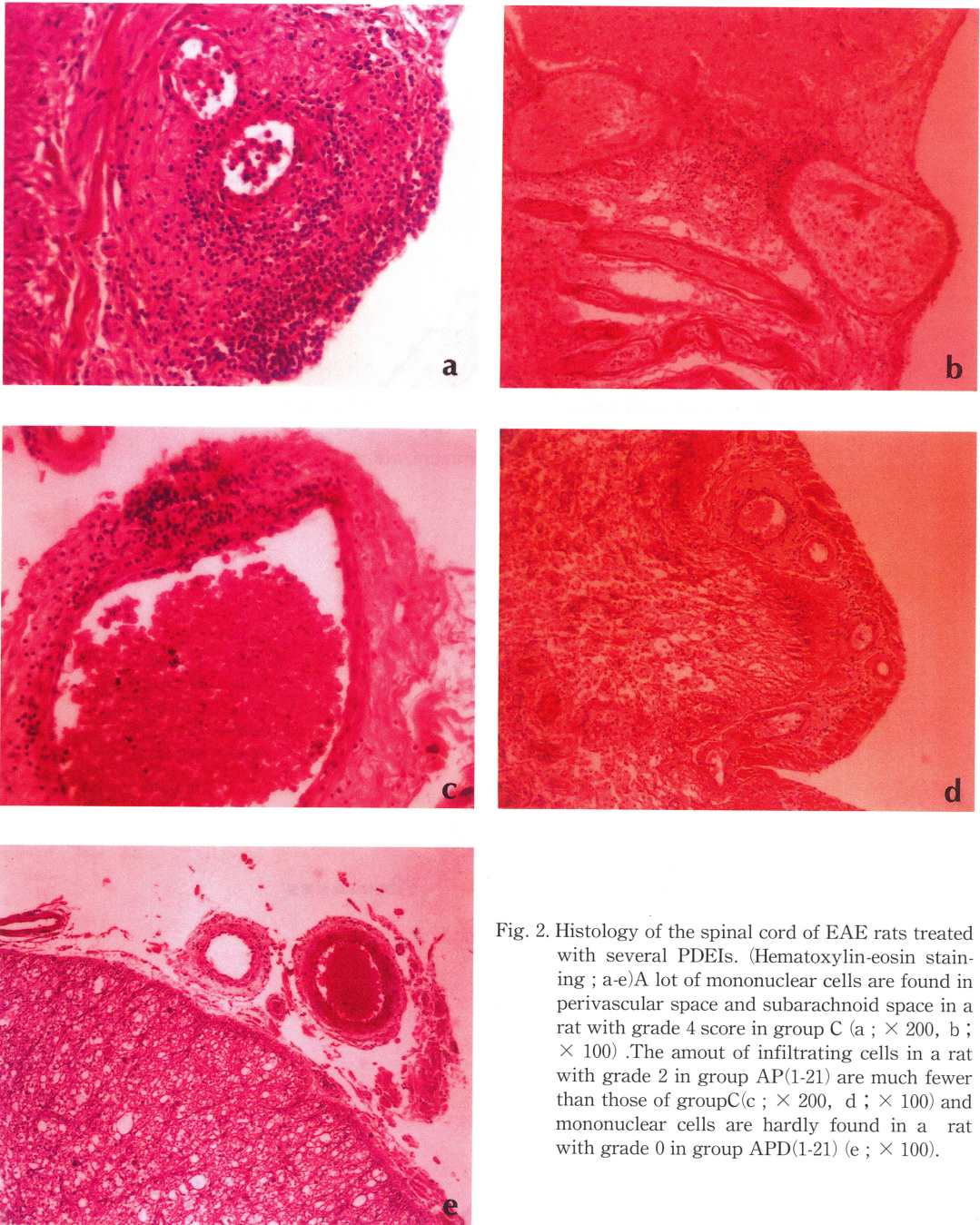


Fig. 2. Histology of the spinal cord of EAE rats treated with several PDEIs. (Hematoxylin-eosin staining ; a-e)A lot of mononuclear cells are found in perivascular space and subarachnoid space in a rat with grade 4 score in group C (a ; $\times 200$, b ; $\times 100$). The amount of infiltrating cells in a rat with grade 2 in group AP(1-21) are much fewer than those of group C (c ; $\times 200$, d ; $\times 100$) and mononuclear cells are hardly found in a rat with grade 0 in group APD(1-21) (e ; $\times 100$).

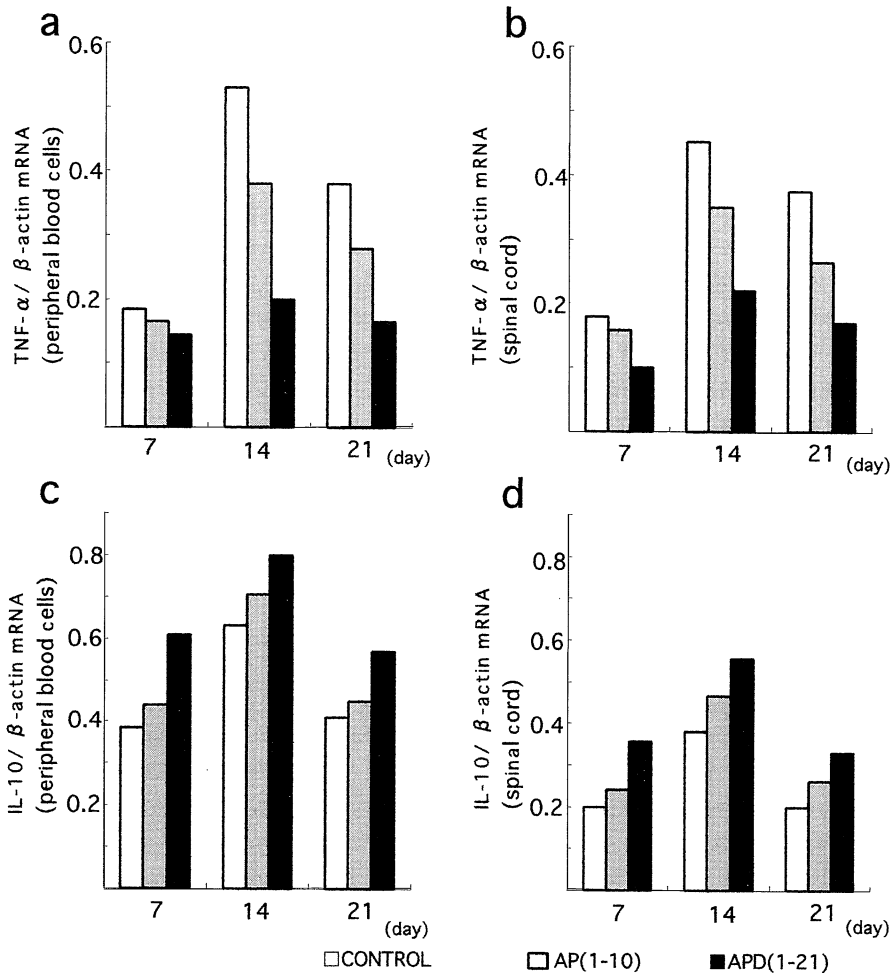


Fig. 3. RT-PCR analyses for the expression of TNF α (a,b), IL-10(c,d) and β -actin in bloods (a,c) or spinal cords (b,d) from EAE-induced rats treated with saline (C) and two (AP) or three (APD) combinations of PDEIs. The concentration of PDEIs and the duration of treatment are same as Fig. 1. Each column indicates mean values of the ratio of cytokine mRNA (TNF α mRNA ; a,b,IL-10 mRNA ; c,d) to β actin mRNA, calculated by each value based on the values obtained from the image analyzer. The TNF α / β actin ratio is suppressed in the group treated with two or three combination of PDEIs (AP or APD) compared with control group. The IL-10/ β actin ratio increases in the group treated with two or three combination of PDEIs (AP or APD) compared with control group.

制するためには、感作直後からの投与が必要かつ重要であり、さらに症状発症後も連続投与することが有用である。多発性硬化症などの中枢神経系の炎症に対する臨床応用の際には、免疫学的導入期である症状発症前より予防的に薬剤を投与することで症状の発現を抑制し、さらに症状出現後も連続的に投与することでその程度を改善させる予防的効果が期待できると考えられる。

中枢内で重要な役割をもつ TNF α は、実験系では LPS

刺激によりアストロサイトやミクログリアから産生されるが²¹⁾、中枢での詳細な働きはまだまだ充分にわかっていない。TNF α は、グリア細胞にサイトカイン産生を促し²²⁾アストロサイトを増生させ²³⁾、オリゴデンドロサイトに傷害性に働き脱髄を引き起こす⁵⁾。また、TNF α -transgenic mice には自然発症的に脱髄が起こり²⁴⁾、実験的に脱髄を引き起こすとさらに傷害が高度になることなどから²⁵⁾、TNF α は脱髄のプロセスに関与して

いるものと考えられる。すべてのタイプの PDEI は、培養グリア細胞にて $TNF\alpha$ の産生を抑制するが²⁶⁾、今回 *in vivo* においても PDEI 併用投与群の末梢血リンパ球、脊髄での $TNF\alpha$ の産生は mRNA レベルで抑制された。

一方、IL-10 は EAE における抑制性サイトカインの代表であるが、IL-10 はタイプ 1 ヘルパー T 細胞 (Th1) のサイトカイン産生を抑制し、ミクログリアの活性化を抑制することなどより EAE の発症を抑制する^{26,27)}。PDEI が $TNF\alpha$ の産生を抑制する機序としては nuclear factor である $NF-\kappa B$ の down-regulation により細胞質内 cAMP を増加させることによると考えられるが²⁸⁾、IL-10 などの抑制性サイトカインを誘導する機序はまた異なるものと思われる²⁹⁾。ミクログリア培養系をもちいた実験では、PDEI は $TNF\alpha$ の産生を抑制するだけでなく、IL-10 の産生を亢進した³⁰⁾。PDEI 併用実験の結果、*in vivo* でも、抑制性サイトカインである IL-10 を増加させ、EAE 発症を抑制した。

多発性硬化症は、再発寛解をくり返し徐々に中枢神経系の機能が低下していく難治性の疾患である。治療は急性期にはステロイド剤が用いられる²⁹⁾。再発を抑制させる薬剤としては、免疫抑制剤やインターフェロン製剤などが使用されているが、いずれも副作用がみられるため³⁰⁾、より有用な薬剤が必要である。PDEI は、抗炎症反応以外の効果から脳循環改善薬、末梢循環改善薬、気管支拡張剤として臨床応用されている⁷⁾。注射剤以外に経口剤もあり種類が豊富であり、長期投与における安全性が確立された薬剤が数多く存在する。これらの PDEI の中から抗炎症反応の比較的強い薬剤を併用投与することが、多発性硬化症の有効な予防的な治療の一つである。今回おこなった PDEI 併用による EAE 抑制実験により、多発性硬化症の実用的な予防治療の一つの可能性を示した。

結 語

多発性硬化症の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) をラットをもちいて、phosphodiesterase inhibitor (PDEI) による発症抑制効果について検討した。PDEI は、多発性硬化症や EAE における中枢神経系炎症に際し重要な働きをする炎症性サイトカインである $TNF\alpha$ の生成を抑制する。用いた PDEI は、サブタイプの異なる amrinone, papaverin HCL, dipyridamole の 3 種類であり、1 剤単独のほか、amrinone と papaverin HCL の組み合わせ、3 剤を全て投与した群を作成した。投与期間は主として導入期に対応する感作後 1-10 日の間、効果期に対応する 8-21 日の間、および全経過である 1-21

日の間を設定した。臨床スコアを 0 から 5 の 6 段階で評価し、一部の動物を第 14 日目に脊髄病理標本、第 7, 14, 21 日目に末梢血白血球成分、脊髄を採取して mRNA を取り出し、 $TNF\alpha$ 、IL-10 の産生を RT-PCR 法を用いて検討した。

臨床スコアは、1 剤の PDEI よりも 2 剤、2 剤よりも 3 剤の PDEI を投与したグループで、EAE の臨床スコアが小さい傾向がみられ、また全経過を通じて投与をおこなった場合に、臨床スコアは小さくなる傾向を示した。3 剤の PDEI を全経過投与したグループでは、発症率も 40% に減少し、もっとも有効性が認められた。脊髄病理標本では、全般に EAE に特有の単核細胞浸潤がみられたが、発症しなかった個体については、浸潤細胞はほとんどみられなかった。RT-PCR 法による mRNA の解析では、炎症性サイトカインである $TNF\alpha$ が、PDEI を投与することで減少し、抑制性のサイトカインである IL-10 が増加する傾向を認めた。これら $TNF\alpha$ と IL-10 の変化は、PDEI による臨床スコアの減少に対応するものと考えられた。

以上の結果から PDEI はラット EAE において発症や、中枢神経系での炎症の程度を抑制する効果が認められ、機序の異なるサブタイプを併用することでより有効性が増すことが示された。炎症を抑制する機序として炎症性サイトカインである $TNF\alpha$ の産生を抑制することのみならず、抑制性サイトカインである IL-10 を増加させることも共働していると考えられた。PDEI は多発性硬化症などの中枢神経系での炎症性脱髄性疾患の発症を抑制する薬剤として有効である可能性があり、作用機序の異なるサブタイプを同時に投与することでより有効であることが示された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御指導、御校閲を賜りました奈良県立医科大学神経内科教室 上野 聡教授、名古屋大学環境医学研究所神経免疫分野 錫村明生教授に深甚なる謝意を捧げます。

文 献

- 1) Selmaj, K., Raine, C.S., Cannella, B. and Brosnan, C. F. : Identification of lymphotoxin and tumor necrosis factor in multiple sclerosis lesions. *J. Clin. Invest.* **87** : 949-954, 1991.
- 2) Selmaj, K., Raine, C. S. and Cross, A. H. : Anti-tumor necrosis factor therapy abrogates

- autoimmune demyelination. *Ann. Neurol.* **30** : 694-700, 1991.
- 3) **Sharief, M. K., Phil, M. and Hentges, R.** : Association between tumor necrosis factor- α and disease progression in patients with multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **325** : 467-472, 1991.
 - 4) **Hauser, S.L., Doolittle, T. H., Lincoln, R., Brown, R. H. and Dinarello, C. A.** : Cytokine accumulations in CSF of multiple sclerosis patients : frequent detection of interleukin-1 and tumor necrosis factor but not interleukin-6. *Neurology* **40** : 1735-1739, 1990.
 - 5) **Selmaj, K. W. and Raine, C. S.** Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage in vitro. *Ann. Neurol.* **23** : 339-346, 1988.
 - 6) **Ruddle, N.H., Bergman, C.M., McGrath, K. M., Lingenheld, E. G., Grunnet, M. L., Padula, S. J. and Clark, R. B.** : An antibody to lymphotoxin and tumor necrosis factor prevents transfer of experimental allergic encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* **172** : 1193-1200, 1990.
 - 7) **Beavo, J.A.** Cyclic nucleotide phosphodiesterases : functional implications of multiple isoforms. *Physiol. Rev.* **75** : 725-748, 1995.
 - 8) **Yoshikawa, M., Suzumura, A., Tamaru, T., Takayanagi, T. and Sawada, M.** : Effects of phosphodiesterase inhibitors on cytokine production by microglia. *Multiple Sclerosis* **5** : 126-133, 1999.
 - 9) **Suzumura, A., Ito, A., Yoshikawa, M. and Sawada, M.** Ibudilast suppresses TNF α production by glial cells functioning mainly as type III phosphodiesterase inhibitor in the CNS. *Brain Res.* **837** : 203-212, 1999.
 - 10) **Sommer, N., Löschnann, P. A., Northoff, G. H., Weller, M., Steinbrecher, A., Steinbach, J. P., Lichtenfels, R., Meyermann, R., Reithmüller, A., Fontana, A., Dichgans, J. and Martin, R.** : The antidepressant rolipram suppresses cytokine production and prevents autoimmune encephalomyelitis. *Nat. med.* **1** : 244-248, 1995.
 - 11) **Strieter, R. M., Remick, D. G., Ward, P. A., Spengler, R. N., Lynch, III, J. P., Larrick, J. and Kunkel, S. L.** : Cellular and molecular regulation of tumor necrosis factor- α production by pentoxifylline. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **155** : 1230-1236, 1988.
 - 12) **Renz, H., Gong, J. H., Schmidt, A., Nain, M. and Gemsa, D.** : Release of tumor necrosis factor- α from macrophages. Enhancement and suppression are dose-dependently regulated by prostaglandin E2 and cyclic nucleotides. *J. Immunol.* **141** : 2388-2393, 1988.
 - 13) **Swanborg, R. H.** Experimental allergic encephalomyelitis. *Methods Enzymol.* **162** : 413-421, 1988.
 - 14) **Dinter, H., Onuffer, J., Faulds, D. and Perez, H. D.** Phosphodiesterase type IV inhibitors in the treatment of multiple sclerosis. *J. Mol. Med.* **75** : 95-102, 1997.
 - 15) **Jung, S., Zielasek, J., Kölnner, G., Donhauser, T., Toyka, K. and Hartung, H. P.** Preventive but not therapeutic application of Rolipram ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in lewis rat. *J. Neuroimmun.* **68** : 1-11, 1996.
 - 16) **Sommer, N., Martin, R., McFarland, H. F., Quigley, L., Cannella, B., Raine, C. S., Scott, D. E., Löschnann, P. A. and Racke, M. K.** Therapeutic potential of phosphodiesterase type 4 inhibition in chronic autoimmune demyelinating disease. *J. Neuroimmun.* **79** : 54-61, 1997.
 - 17) **Rott, O., Cash, E. and Fleischer, B.** Phosphodiesterase inhibitor pentoxifylline, a selective suppressor of T helper type 1- but not type 2-associated lymphokine production, prevents induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats. *Eur. J. Immunol.* **23** : 1745-1751, 1993.
 - 18) **Nataf, S., Louboutin, J. P., Chabannes, D., Fève, J. R. and Muller, J. Y.** Pentoxifylline inhibits experimental allergic encephalomyelitis. *Acta Neurol. Scand.* **88** : 97-99, 1993.
 - 19) **Jung, S., donhauser, T., Toyka, K. V. and Hartung, H. P.** Propentofylline and iloprost suppress the production of TNF- α by macrophages but fail to ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis in lewis rats. *J. Autoimmun.* **10** : 519-529, 1997.

- 20) **Genain, C. P., Roberts, T., Davis, R. L., Nguyen, M. H., Uccelli, A., Faulds, D., Li, Y., Hedgpeth, J. and Hauser, S. L.** Prevention of autoimmune demyelination in non-human primates by a cAMP-specific phosphodiesterase inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92** : 3601-3605, 1995.
- 21) **Sawada, M., Kondo, N., Suzumura, S. and Marunouchi, T.** Production of tumor necrosis factor- α by microglia and astrocytes in culture. *Brain Res.* **491** : 394-397, 1989.
- 22) **Sawada, M., Suzumura, A. and Marunouchi, T.** TNF α induces IL-6 production by astrocytes but not by microglia. *Brain Res.* **583** : 296-299, 1992.
- 23) **Selmaj, K.W., Farooq, M., Norton, W. T., Raine, C. S. and Brosnan, C. F.** Proliferation of astrocytes in vitro in response to cytokines. A primary role for tumor necrosis factor. *J. Immun.* **144** : 129-135, 1990.
- 24) **Probert, L., Akassoglou, K., Pasparakis, M., Kontogeorgos, G. and Kollias, G.** Spontaneous inflammatory demyelinating disease in transgenic mice showing central nervous system-specific expression of tumor necrosis factor α . *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92** : 11294-11298, 1995.
- 25) **Taupin, V., Renno, T., Bourbonnière, L., Peterson, A. C., Rodriguez, M. and Owens, T.** Increased severity of experimental autoimmune encephalomyelitis, chronic macrophage/microglial reactivity, and demyelination in transgenic mice producing tumor necrosis factor- α in the central nervous system. *Eur. J. Immunol.* **27** : 905-913, 1997.
- 26) **Ho, A. S. Y. and Moore, K. W.** Interleukin 10 and its receptor. *Ther. Immunol. I* ; 173, 1994.
- 27) **Kambayashi, T., Jacob, C. O., Zhou, D., Mezurek, N., Fong, M. and Strassmann, G.** Cyclic nucleotide phosphodiesterase type IV participates in the regulation of IL-10 and in the subsequent inhibition of TNF- α and IL-6 release by endotoxin-stimulated macrophages. *J. Immunol.* **155** : 4909-4916, 1995.
- 28) **Parry, G. C. N. and Mackman, N.** Role of cyclic AMP response element-binding protein in cyclic AMP inhibition of NF- κ B-mediated transcription. *J. Immunol.* **159** : 5450-5456, 1997.
- 29) **Oishi, C. and Sakuta, M.** Steroid therapy for multiple sclerosis. *Nippon Rinsho.* **61** : 1361-1366, 2003.
- 30) **Saida, K.** Treatment of neuro-immunologic diseases by immunosuppressants. *Nippon Rinsho.* **52** : 3046-3052, 1994.