

Campylobacter jejuni 腸炎後ギラン・バレー症候群で検出される 血中 IgA 抗ガングリオシド抗体は腸管以外の臓器で産生される

古賀 道明 結城 伸泰 平田 幸一

目的

われわれは、ギラン・バレー症候群 (GBS) の予後不良因子である *Campylobacter jejuni* 腸炎の先行との相関が、IgG クラスの抗 GM1 抗体よりも IgA クラスでより強いことを以前に報告した。¹⁾ 血清中 IgA は補体結合能や食作用誘導能に乏しいことから、IgA 抗ガングリオシド抗体が GBS の発症においてエフェクター分子として関与しているとは考えにくい。しかし、その産生機序を明らかにすることは、*C. jejuni* 腸炎後 GBS の発症機序の解明につながる可能性がある。IgA は2つのサブクラス (IgA1, IgA2) に分けられ、それらの分布割合は腸管などの粘膜組織で特徴的である。さらに、血清中 IgA の約1%が分泌型 IgA であり、これは腸管粘膜で産生された分泌型 IgA が腸管で吸収されて血中に移行したものと考えられている。そこで本研究では、IgA 抗ガングリオシド抗体のサブクラスを調べ、さらに分泌型 IgA であるか否かを検討することで、IgA 抗ガングリオシド抗体の産生部位の同定を目的とした。

材料と方法

1. GBS 152 例、他の神経疾患 78 例、健常者 69 例の血清を用いた。
2. ELISA により IgG 抗 *C. jejuni* 抗体を測定した。
3. 抗 α 鎖抗体を二次抗体として用いて ELISA を行い、GM2、GM1、GM1b、GD1a、GalNAc-GD1a、GD1b、GT1b、GQ1b に対する IgA 抗体を測定した。
4. IgA 抗ガングリオシド抗体が検出された例では、抗 α 1 抗体や抗 α 2 抗体、抗分泌因子抗体を用いて、IgA サブクラスと分泌型 IgA 抗ガングリオシド抗体を測定した。

結果

1. IgG 抗 *C. jejuni* 抗体の陽性率は、他の神経疾患 (3%) や健常者 6 例 (9%) と比較し、GBS (24%) で有意に高かった ($p < 0.0001$, $p = 0.009$)。
2. GM1、GM1b、GD1a に対する IgA 抗体は、それぞれ 7 例 (5%)、16 例 (11%)、7 例 (5%) で検出された。それ以外のガングリオシドに対する IgA 抗体は陰性であった。他の神経疾患や健常者では IgA 抗ガング

Table 1 Relation between anti-ganglioside antibodies and *Campylobacter jejuni* serology in Guillain-Barré syndrome

	GBS (n=152)	n (%)	<i>C. jejuni</i> serology		P value	Odds ratio	95% CI
			+ve (n =36)	-ve (n =116)			
Anti-GM1	IgG +ve	33 (22%)	22 (61%)	11 (9%)	<0.0001	15.0	6.7-33.8
	IgM +ve	19 (13%)	12 (33%)	7 (6%)	<0.0001	7.8	3.1-19.8
	IgA +ve	7 (5%)	6 (17%)	1 (1%)	0.0007	23.0	4.9-108.9
Anti-GM1b	IgG +ve	44 (29%)	24 (67%)	20 (17%)	<0.0001	9.6	4.4-20.9
	IgM +ve	21 (14%)	10 (28%)	11 (9%)	0.01	3.7	1.5-9.3
	IgA +ve	16 (11%)	9 (25%)	7 (6%)	0.003	5.2	1.9-14.1
Anti-GD1a	IgG +ve	30 (20%)	18 (50%)	12 (10%)	<0.0001	8.7	3.9-20.0
	IgM +ve	4 (3%)	0 (0%)	4 (3%)	0.6	-	-
	IgA +ve	7 (5%)	4 (11%)	3 (3%)	0.055	-	-
Anti-GalNAc-GD1a	IgG +ve	11 (7%)	5 (14%)	6 (5%)	0.1	-	-
	IgM +ve	7 (5%)	2 (6%)	5 (4%)	0.7	-	-
	IgA +ve	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	-	-	-

95% CI, 95% confidence intervals.

Differences in proportions were tested by chi-square test or Fisher's exact test.

リオシド抗体は検出されなかった。抗 *C. jejuni* 抗体陽性例では、IgA 抗 GM1 抗体と IgA 抗 GM1b 抗体の陽性率が有意に高かった ($p=0.0007$, $p=0.003$) (Table 1)。

3. 検出された IgA 抗ガングリオシド抗体のサブクラスはすべて IgA1 であり、分泌型 IgA 抗体は検出されなかった (Table 2)。

4. IgA 抗ガングリオシド抗体陽性例 20 例中 17 例 (85%) で、抗 *C. jejuni* 抗体ないし下痢の先行を認めた。末梢神経伝導検査結果に関する情報が得られた IgA 抗ガングリオシド抗体陽性例 13 例中 9 例 (69%) で軸索優位の障害を認めたが、脱髄型優位の障害を認めた症例はなかった (Table 2)。

Table 2 Guillain-Barré syndrome with IgA anti-ganglioside antibodies

No.	Subgroup	Prior diarrhea	Anti- <i>C. jejuni</i>	Anti- GM1		Anti- GM1b		Anti- GD1a	
				IgA	IgA1	IgA	IgA1	IgA	IgA1
1	Axonal	+	2000	4000	4000	500	500	0	0
2	NA	+	32000	4000	2000	2000	2000	0	0
3	Unclassified	-	2000	2000	2000	0	0	0	0
4	NA	+	8000	2000	2000	4000	4000	0	0
5	Axonal	+	8000	2000	2000	0	0	0	0
6	Axonal	-	16000	1000	500	0	0	0	0
7	Axonal	+	0	500	500	2000	2000	0	0
8	Not evoked	-	4000	0	0	4000	2000	0	0
9	Axonal	+	16000	0	0	4000	4000	4000	4000
10	Axonal	+	0	0	0	4000	2000	2000	2000
11	NA	+	2000	0	0	2000	2000	0	0
12	Not evoked	-	4000	0	0	2000	2000	1000	1000
13	NA	+	0	0	0	2000	2000	0	0
14	Axonal	+	0	0	0	2000	1000	0	0
15	NA	-	0	0	0	1000	1000	0	0
16	NA	-	64000	0	0	1000	1000	1000	500
17	Axonal	-	0	0	0	1000	500	500	0
18	NA	-	0	0	0	1000	1000	0	0
19	Axonal	+	8000	0	0	500	500	0	0
20	Unclassified	+	4000	0	0	0	0	1000	1000

NA, Information not available.

考察

IgA の産生部位は主に腸管などの粘膜組織と骨髄である。粘膜組織では両方の IgA サブクラスが産生されるのに対し、骨髄では IgA1 だけが産生される。今回、GBS で

検出された IgA 抗ガングリオシド抗体はすべて IgA1 であり、さらに分泌型 IgA ではなかったことから、これらの抗体は腸管ではなく、骨髄由来と考えられた。*C. jejuni* 腸炎患者で検出される IgA 抗 *C. jejuni* 抗体は主に多量体であり腸管粘膜由来とされていることから、通常の感染免疫とは異なる機序が IgA 抗ガングリオシド抗体産生に関与していると考えられる。

GBS の予後不良因子と従来から考えられている IgG 抗 GM1 抗体よりも、IgA 抗 GM1 抗体の方がより強い予後不良因子であることが報告されている。²⁾ 今回の検討でも IgA 抗ガングリオシド抗体陽性の患者では軸索障害を来すしやすいことがわかった。今後、IgA 抗 GM1 抗体の重要性が広く認識されると考えられ、IgA 抗 GM1 抗体の病的意義につき、検討を要する。

まとめ

C. jejuni 腸炎後 GBS で高頻度に検出される IgA クラスの血清中抗ガングリオシド抗体のサブクラスを調べ、さらに分泌型 IgA であるか否かを測定した。GBS で検出された IgA 抗ガングリオシド抗体はすべて IgA1 であり、さらに分泌型 IgA ではなかったことから、これらの抗体は腸管ではなく、骨髄由来と考えられた。さらに IgA 抗ガングリオシド抗体を有する GBS 症例では、軸索型の末梢神経障害を来しやすく、後遺症を認めやすいことが示唆された。

参考文献

- 1) Koga Met al: Close association of IgA anti-ganglioside antibodies with antecedent *Campylobacter jejuni* infection in Guillain-Barré and Fisher's syndromes. J Neuroimmunol 81: 138-143, 1998
- 2) Hadden R et al: Anti-ganglioside-GM1 antibodies, neurophysiological classification and prognosis in Guillain-Barré syndrome. Abstract, Peripheral Nerve Society Meeting, 1997, Cambridge, England.

ギラン・バレー症候群患者血清による神経・筋接合部の伝導障害

田口 恭治* 結城 伸泰 宮武 正*

目的

われわれは、*Campylobacter jejuni* 腸炎後に発症するギラン・バレー症候群 (GBS)患者の急性期に血中 IgG 抗 GM1 抗体価が上昇することを見出した¹⁾。さらに、ギラン・バレー症候群患者から分離された *C. jejuni* 菌体外膜に位置するリポ多糖が GM1 ガングリオシド様構造を有し、分子相同性の存在を明らかにした²⁾。そうした事実に基づいて、われわれは、「GM1 様リポ多糖を有する *C. jejuni* に感染し、IgG 抗 GM1 抗体産生が誘導される。その IgG 抗 GM1 抗体が運動神経の伝導を障害し、運動麻痺を惹起し、ギラン・バレー症候群発症に至る」という分子相同性仮説を提唱している。しかしながら、抗 GM1 抗体が運動神経の伝導を障害する^{3,4)}か否か⁵⁾の意見が分かれている。そこで本研究では、分子相同性仮説を検証するために、IgG 抗 GM1 抗体が運動神経、神経・筋接合部の機能を障害するかを検討した。

対象と方法

1 筋・脊髄の培養法

Wistar 系ラット (妊娠 17 日齢) の胎児を Tyrode 液で満たしたシャーレーに無菌的に取り出した。実体顕微鏡下で最初に胎児の大腿の筋を採取し、その後胎児の内臓を削ぎ落とした。別のシャーレーに移して肋骨等を剥離し、腹側の背骨を上に向けて首から尾の先までハサミを入れて 2 分割した。脊髄を取り出し、細かく脊髄を輪切りにした。

採取した大腿の筋をシャーレーの中で細切し、これを CMF-PBS 液 (Ca²⁺、Mg²⁺-Free Tyrode) で洗浄後、0.1% コラゲナーゼ CMF 液で 37°C、20 分間インキュベーターで振とうした。その後、遠心分離し、組織をピペッティングして筋細胞を分離した。

採取した脊髄切片と筋細胞を培養液の入ったシャーレーに入れ CO₂ インキュベーターで 1 週間同時培養した。

2 筋活動電位の測定

記録電極は 3M KCL 微小ガラス管電極を用いて顕微鏡下で筋細胞から筋活動電位を測定した。電極の抵抗値は 15-25 MΩであった。記録には微小電極増幅器、オシロスコープ、ペンレコーダー、データ収集・解析 AXON を用いた。

3 患者血清の投与

培養した系に、IgG 抗 GM1 抗体陽性の GBS 患者 5 例の血清と正常対照 3 例、疾患対照として筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 3 例、急性感覚性ニューロパチー患者 1 例の血清をアプライした。

さらに筋の自動収縮の抑制に補体が関与しているか、検討を加えた。IgG 抗 GM1 抗体陽性の GBS 患者血清を 56°C で 30 分間加熱し、補体を非働化した血清をアプライした。

IgG 抗 GM1 抗体がエフェクター分子であることを確認するために、さらに検討を加えた。血清から硫酸沈殿にてグロブリン分画を得、プロテイン A カラムで IgG を精製し、GM1 を固定化した Octyl-Sepharose カラムに通して、IgG 抗 GM1 抗体を精製しアプライした。

結果

1 神経・筋接合部の筋活動電位

神経・筋接合部を形成し筋収縮が認められた筋細胞から安定した自発性の筋活動電位が記録された。

2 アセチルコリン受容体拮抗薬ツボクラリンの影響

ツボクラリン (0.3 μg/10 μl) の投与で 3-5 分後から自発性筋活動電位の振幅が徐々に抑制された。洗浄後、抑制された筋活動電位は回復した。同様の現象が、ナトリウムチャンネルの遮断薬テトロドトキシンでも観察された。

3 患者血清の投与

培養した組織に GBS 患者血清をアプライすると、スパイクの数が減少した。液を還流し、血清を除去するとスパイクの数が元に戻った (図 1)。IgG 抗 GM1 抗体陽性の GBS 患者血清では 5 例とも、血清をアプライして筋の自動収縮が抑制され、洗浄後に回復した。

これに対して、ALS 患者血清を加えると、筋の自動収

獨協医科大学神経内科

*昭和薬科大学薬物治療学

縮は抑制されなかった (図 2)。正常対照、ALS、急性感覚性ニューロパチーはすべて、筋の自動収縮は抑制されなかった。

補体を非働化した血清をアプライした場合には投与後約 2 分で筋の自動収縮はまったくみられなくなった。洗浄後、筋の自動収縮は回復した (図 3)。

精製 IgG 抗 GM1 抗体をアプライすると、1 分後には筋の自動収縮はみられなくなった。洗浄後、速やかに筋の自動収縮は回復した (図 4)。

考 察

ラット脊髄と筋細胞を培養して神経・筋接合部を形成した筋細胞の筋活動電位の測定方法を検討した。脊髄と筋細胞の同時培養により神経・筋接合部を形成し筋収縮が認められ、この筋細胞から安定した筋活動電位を測定することが可能となった。

神経・筋接合部の系に IgG 抗 GM1 抗体陽性の GBS 患者の血清を投与すると自動収縮が抑制されることがわかった。補体を非働化した血清をアプライした結果よりこの運動神経終末の可逆性の現象には補体は関与していないことがわかった。さらに、精製 IgG 抗 GM1 抗体をアプライした結果から IgG 抗 GM1 抗体が GBS の筋力低下に関与していることが強く示唆された。

ま と め

ギラン・バレー症候群の患者血清を用いて運動神経終末への影響を検討する方法を確立した。今後、患者リンパ球からモノクローナル抗 GM1 抗体を樹立し、この系にアプライしたい。

文 献

- 1) Yuki et al: Acute axonal polyneuropathy associated with anti-GM1 antibodies following *Campylobacter* enteritis. *Neurology* 40: 1900-2, 1990
- 2) Yuki et al: A bacterium lipopolysaccharide that elicits Guillain-Barré syndrome has a GM1 ganglioside-like structure. *J Exp Med* 178: 1771-5, 1993
- 3) Arasaki et al: Acute conduction block in vitro following exposure to antiganglioside sera. *Muscle Nerve* 16: 587-93, 1993
- 4) Takigawa et al: Antibodies against GM1 ganglioside affect K⁺ and Na⁺ currents in isolated rat myelinated nerve fibers. *Ann Neurol* 37: 436-42, 1995
- 5) Roberts et al: Multifocal motor neuropathy human sera block distal motor nerve conduction in mice. *Ann Neurol*

38: 111-8, 1995

- 6) Hirota et al: The physiological effect of anti-GM1 antibodies on saltatory conduction and transmembrane currents in single motor axons. *Brain* 120: 2159-69, 1997

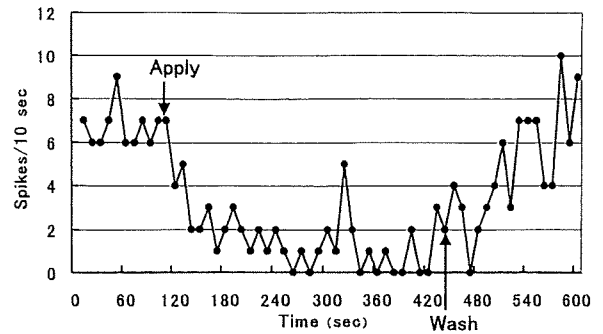


図 1 ギラン・バレー症候群患者血清をアプライすると、自発性の筋電位のスパイク数は減少し、洗浄後スパイク数は回復した

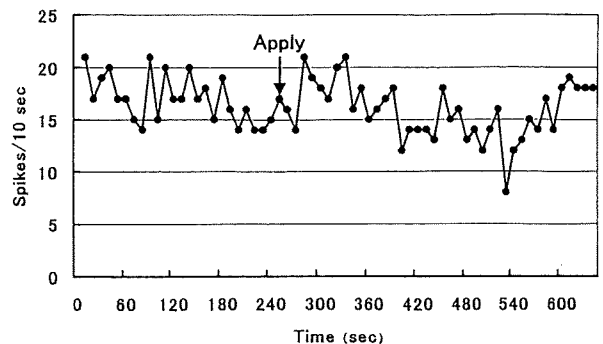


図 2 ALS 患者血清をアプライしてもスパイク数は減少しなかった

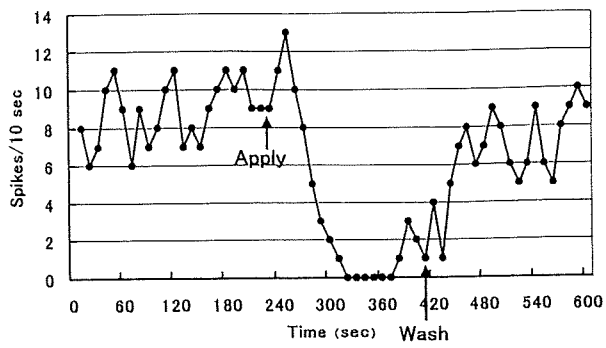


図3 補体を非働下したギランバレー症候群患者血清をアプライすると、自発性の筋電位のスパイク数は減少し、洗浄後スパイク数は回復した

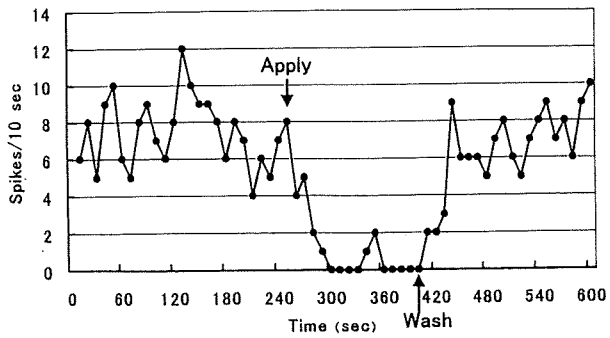


図4 精製した抗 GM1 抗体をアプライすると、自発性の筋電位のスパイク数は減少し、洗浄後スパイク数は回復した

HNK-1エピトープに対する免疫反応の多様性についての検討

水澤 英洋 山脇 正永 神田 隆

目 的

HNK-1エピトープは硫酸基とグルクロン酸基を含む糖鎖であり、myelin-associated glycoprotein (MAG), P0 glycoprotein, neuronal cell adhesion molecule (NCAM), sulfoglucuronosyl glycosphingolipids (SGGLs: SGPGとSGLPG)等の神経系の構成分子に含まれる神経系特異抗原である。近年これらの物質は細胞接着に関与していることが明らかとなり、HNK-1エピトープが接着に関与している可能性が示唆されている。抗HNK-1抗体（いわゆる抗MAG/SGPG抗体）はIgM gammopathyを伴う末梢神経炎をはじめとする種々の神経疾患に認められる。近年抗HNK-1抗体等の抗糖脂質抗体が種々の神経疾患にみられるがその病因的意義は必ずしも明らかではない。今回我々は抗HNK-1抗体の標的抗原の分子構造及び免疫反応性につき検討した。

方 法

1. 抗原：ヒト、ウシ、ラット、モルモットの脳灰白質、脊髄、末梢神経の糖脂質分画、脱脂後のタンパク分画、及び標準糖脂質(SGPG, SGLPG, GM1)を用いた。
2. 血清及び抗体：患者血清としてはGuillain-Barre症候群62例、CIDP 51例、multifocal motor neuropathy 5例を対象とした。モノクローナル抗体としてCD57、モノクローナル抗MAG抗体、モノクローナル抗SGPG抗体を用いた。
3. EAN：guineapig末梢神経ミエリン分画をルイスラットに免疫しEANを作成した。さらに精製SGPGをアジュバントとともに免疫したルイスラットを用いた。
4. 抗体活性：タンパク抗原を用いてSDS-PAGE及びWestern-blotting法を、糖脂質抗原を用いたTLC-immunoblotting法、標準糖脂質を用いたELISA法にて検討した。

結 果

1. 患者血清：SGPGを認識する抗体は同時にMAGを認識した。SGPGを認識する抗体はSGLPGをも同程度に認識した。SGLPGを強く認識する一方でSGPG, MAGに対する活性の弱い血清も認められ、臨床的には感音性難聴及び感覚障害に特異的であった。脱硫酸化したHNK-1を認識する抗体もみられたが、臨床的には特徴的なものは見られなかった。
2. モノクローナル抗体：CD57、モノクローナル抗SGPG抗体はHNK-1部分を認識した。いずれの抗体もMAG, SGPG, SGLPGを認識したがdesulfated SGPGは認識しなかった。SGPGとSGLPGについては同程度に認識した。
3. EAN：myelin注射後7日目より抗HNK-1抗体価の上昇を認めた。これらの抗体はMAGを認識した。SGPG免疫によるラットではブースターによりはじめて高い抗体価の抗HNK-1抗体を認めた。抗HNK-1抗体はブースター後約2週目にIgMクラスが、その後IgGクラスが出現しクラススイッチをきたしていた。

考 察

HNK-1を持つ種々の分子に対して患者血清・モノクローナル抗体は異なった抗体活性を示した。ヒト抗HNK-1抗体では一般的にMAG, SGPG, SGLPGを強く認識したがP0に対する活性は弱く、CD57とは異なり神経系特異的な活性を持つものと考えられた。また、一部の群ではSGLPGに強い活性を有するがMAG, P0, SGPGには弱い活性を呈するものも見られ、これらの群は特徴的な臨床像・治療反応性を呈していた。また、一般に硫酸基は極性が強く強い抗原性を呈するが、脱硫酸化したHNK-1を認識する血清もみられ、glucuronic acidが抗原決定により重要である可能性も示唆された。EANを用いた検討ではMAG, SGPG, SGLPGは強い免疫反応惹起する事が明

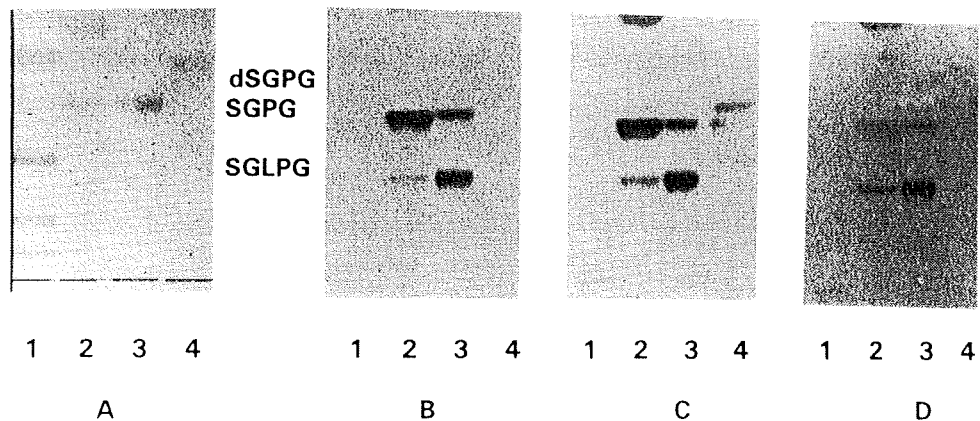


Fig. Binding of polyneuropathy patient's sera and mAb on high-performance TLC plates. Lanes 1 and 2 contained human brain and peripheral nerve gangliosides ($1\mu\text{g}$ of total sialic acid), respectively. Lane 3 contained authentic samples of SGLs (300ng each of SGPG and SGLPG) and lane 4 $1\mu\text{g}$ of desulfated SGPG (dSGPG). A) Stained with orcinol-sulfuric acid reagent; B) immunoblot with 1:100 diluted mAb NGR50; C) and D) immunoblots with sera from patients of polyneuropathy with paraproteinemia (patient I and II). Each plate was developed in solvent system chloroform:methanol:0.2% CaCl_2 (50:45:10). Sera from both patients reacted with SGPG and SGLPG, but only that from Patient I reacted with desulfated SGPG. MAb NGR50 reacted specifically with SGPG and SGLPG, but not with desulfated SGPG.

らかになった。これらの抗HNK-1抗体の病因的意義は未だ不明であるが、末梢神経障害の増悪・遷延化の因子となる事も示唆され、治癒のマーカーとなる可能性がある。さらに今回のEANを用いた解析より抗HNK-1抗体はIgMからIgGへのクラススイッチをきたしており、今後はHNK-1に対する細胞性免疫反応の解析も必要である。

結 論

1. 患者血清の抗HNK-1抗体はCD57と異なりMAG, SGPG, SGLPGをよく認識するがP0については抗体活性が低かった。
2. 患者血清の抗HNK-1抗体のうちで、MAG, SGPG, SGLPGそれぞれの分子に対する反応性に多様性がみられた。
3. EANをもちいた解析では患者血清の抗HNK-1抗体と同様の活性を持つ自己抗体が得られ、HNK-1 エピトープは強い免疫原性を持つことが示唆された。

文 献

1. Kanda T. et al. Glycosphingolipid antigens in cultured bovine brain microvascular endothelial cells: sulfoglucuronosyl paragloboside as a target of monoclonal IgM in demyelinating neuropathy. *J Cell Biol* 126; 235-246, 1994.
2. Kanda T. et al. IL-1 β upregulates expression of sulfoglucuronosyl paragloboside, a ligand for L-selectin, in brain microvascular endothelial cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 92; 7897-7901, 1995.
3. Yamawaki M. et al. Generation and characterization of anti-sulfoglucuronosyl paragloboside (SGPG) monoclonal antibody (NGR50) and its reactivity with peripheral nerve. *J Neurosci Res* 44; 586-593, 1996.
4. 山脇正永・神田隆：炎症性神経疾患における硫酸化グルクロン酸含有糖脂質(SGPG)の役割 *神経内科* 46; 650-661, 1997.
5. Yamawaki M. et al. Sulfoglucuronosyl glycolipids as putative antigens in autoimmune inner ear disease. *J Neuroimmunol* 1998.
6. 山脇正永・水澤英洋：硫酸化グルクロン酸含有糖脂質(SGPG)と末梢神経疾患 *脳の科学* 20; 1129-1134, 1998.

ALSにおけるNF-Hリン酸化部位類似エピトープに対する抗体の検討

荻野 裕 齋藤 豊和 荻野 美恵子
金澤 直美* 坂井 文彦

目 的

IgA型M蛋白血症を有した筋萎縮性側索硬化症（以下ALS）患者において剖検で残存脊髄前角細胞にIgA抗体の局在を認め、この抗体の病態への関与が強く考えられた。これまでに我々はこの抗体がhigh molecular neurofilament（以下NFH）と神経細胞膜に存在する65kD膜蛋白を認識し、そのエピトープがNFHリン酸化部位のセリンを含むエピトープ”EXAKSPXK”であることを明らかにした。他のALS患者血清中におけるこのNF-Hエピトープに対する抗体の存在を検討したが、同様の抗体を有する例はなかった。このエピトープの微細特異性を検討したところ、NFHに特徴的なセリンβロリンはエピトープ認識には必須でなく、むしろアミノ酸の置換を行った方が反応性は強く、本抗体がNFH以外のタンパク質をむしろ強く認識すると考えた。したがってNFHの配列には反応性が高くないもののアミノ酸置換をしたエピトープには反応する抗体は前回のスクリーニングでは検出できなかった可能性がある。そこで、NFHアミノ酸配列をもとにアミノ酸置換を行ったペプチドを用いて、他のALS患者血清中に本抗体と近い特異性を持ち、NFHの配列そのものでなく、類似したエピトープを強く認識している抗体の存在の有無を検討した。

対 象

M蛋白血症を伴う5例を含むALS38例、正常人20例、及び疾患対照として他の神経疾患11例（パーキンソン病4例、脊髄小脳変性症3例、多発性硬化症3例、IgA型M蛋白血症を有する瘧性対麻痺1例）の血清を対象とした。

方 法

NFHアミノ酸配列をもとに1アミノ酸残基の置換を行ったペプチド計21個をN末端にピオチンを付加して合成した（Chiron Mimotope社 Australia）（表1）。このペプチドを抗原としてELISAを用いて患者血清の反応性を検討した。血清は1：200希釈、二次抗体は抗ヒトIg Total（G+A+M）1：1000でスクリーニングし、陽性例はさらにIg classの決定と抗体価の検討を行った。

0.5μg/wellのアビジンで1時間Pre-coatしPBSで洗浄

北里大学東病院 神経内科

*北里大学医学部生物化学系

し、二次抗体はペルオキシダーゼ標識抗ヒトIg Total（陽性例の検討では抗ヒトIgG、IgA、IgMを用いた）を1：1000の希釈で2時間 incubate した。洗浄の後、o-phenylenediamineを基質として発色させ、450nmの吸光度を測定した。

表1：合成ペプチド配列 No. 3~23の計21個

3)	M	K	K	E	A	K	S	P	E	K	A
4)	M	K	R	E	A	K	S	P	E	K	A
5)	M	K	M	E	A	K	S	P	E	K	A
6)	M	K	E	E	P	K	S	P	E	K	A
7)	M	K	E	E	E	K	S	P	E	K	A
8)	M	K	E	E	R	K	S	P	E	K	A
9)	M	K	E	E	A	E	S	P	E	K	A
10)	M	K	E	E	A	Q	S	P	E	K	A
11)	M	K	E	E	A	P	S	P	E	K	A
12)	M	K	E	E	A	K	M	P	E	K	A
13)	M	K	E	E	A	K	E	P	E	K	A
14)	M	K	E	E	A	K	R	P	E	K	A
15)	M	K	E	E	A	K	S	M	E	K	A
16)	M	K	E	E	A	K	S	K	E	K	A
17)	M	K	E	E	A	K	S	E	E	K	A
18)	M	K	E	E	A	K	S	P	E	E	A
19)	M	K	E	E	A	K	S	P	E	Q	A
20)	M	K	E	E	A	K	S	P	E	P	A
21)	M	K	E	E	A	K	S	P	E	K	A
22)	P	K	K	A	A	K	S	P	A	K	A
23)	A	E	I	V	T	K	S	P	V	V	S

21) NF-H 原配列
22) ヒストン 1a配列
23) Tau 蛋白配列

結 果

発端症例のIgA抗体は強い反応性をペプチド番号15（MKEEAKSMEKA）、16（MKEEAKSKEKA、Titerは1：12800以上）、17（MKEEAKSEEKA）に示し、弱い反応性を22（PKKAAKSPAKA;NFHと相同性の強いHiston 1aの配列）及び21（NF-H原配列）に示した。

ALS38例中15例(39.5%)がいずれか1つ以上の合成ペプチドに対して反応性を有していた。それに対し疾患対照では11例中2例（18%）、正常者では20例中1例（5%）にしか反応性を認めなかった。（正常者対照の平均+3SD以上を陽性と判定した。またALS患者群と正常者群との陽性率には統計学的に有意差があった。）

抗合成ペプチド抗体陽性例

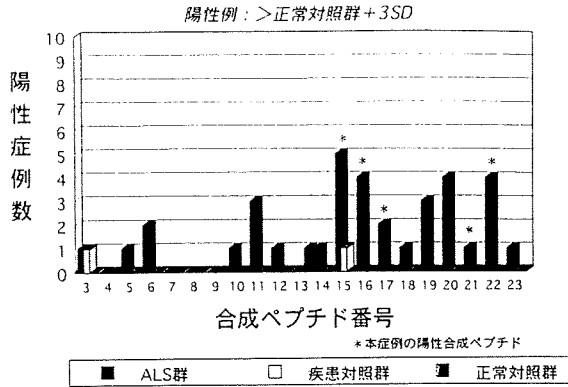


図1：それぞれの合成ペプチドに対する各血清の反応性

ALS患者血清のそれぞれの合成ペプチドに対する反応性を検討すると、我々の症例と共通するペプチド15に対するもの5例、16に対するもの4例を認めた。

また、ペプチド15、16に対する反応性を有する者は正常人では認めなかった。

ペプチド15あるいは16に反応する症例のうち5例の血清のグロブリンクラスと抗体価を測定したところ、IgA3例、IgG1例、IgM1例であり、抗体価は1：800～1：3200であり我々の症例に比して低かった。

陽性症例はいずれもM蛋白を有さない症例であった。

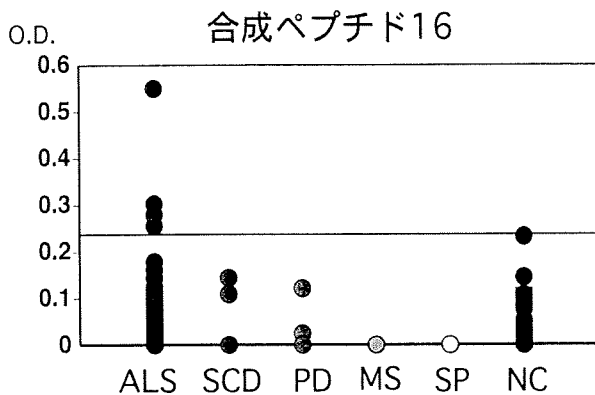
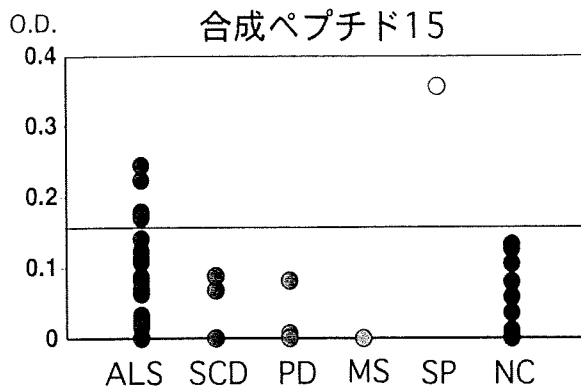


図2：ペプチド15、16に対するALS,PD,MS,SCD,spastic paraparesis(SP),normal control(NC)血清の反応性。横線はNCの平均値+3SDをしめす。

考案

ALSにおけるM蛋白や抗ニューロフィラメント抗体の存在などの免疫異常の存在は以前より指摘されてきた事である。しかし、その病態における意義については未だ明かではない。

今回の結果から、38例中15例のALS患者でNF-Hリン酸化部位の1アミノ酸残基置換を行った合成類似エピトープセットの1つ以上に対する反応性を有していることが明らかになった。また反応するペプチドについては我々の症例と共通のペプチド15、16に反応性を有する例が多く見られた。このことから一部ALS患者においてはNF-H及び類似エピトープ配列を有する蛋白質に対する免疫反応があり、そのことが運動ニューロンの障害に関与した可能性を示唆するものである。

今後、今回陽性であった血清について神経芽細胞種蛋白を用いて65kD蛋白を含む他の神経蛋白との反応性の有無、標的蛋白の同定を含みさらに検討を続ける。

文献

荻野裕, 荻野美恵子, 斎藤豊和：筋萎縮性側索硬化症患者にみられたNF-Hおよび60kD神経細胞蛋白を認識するIgA lambda型抗体の微細エピトープ特異性. 北里医学, 28: 201-205, 1998.

Ogino, Y., Latov, N. and Sadiq, S.A.: Epitope mapping of a monoclonal anti-neurofilament antibody in a patient with amyotrophic lateral sclerosis. 北里医学, 25(3):274-278, 1995.

全身型重症筋無力症に対する胸腺摘出術前ステロイド、血漿交換併用療法による入院期間短縮の試み—ステロイド漸増法との比較—

服部孝道 吉山容正 朝比奈真由美 新井 洋

目 的

われわれはこれまで全身型重症筋無力症患者に対してステロイドを導入し、その後に胸腺摘出を行う「ステロイド・胸腺摘除併用療法」を行い約 80%の緩解を得てきた [1]。ステロイドの導入は初期増悪の予防、ステロイドの副作用確認のため、プレドニゾン 10mg~25mg 隔日の少量から開始し、4日から7日ごとに 10mg づつ 80mg から 100mg まで増量する漸増法により行ってきた (図 1)。そのため入院期間と胸腺摘除術施行までの期間が長期になり、全体としてのステロイド投与量も多くなる問題点があった。またステロイド少量からの導入であっても初期増悪のために、血漿交換を併用することがあった。そこで、今回われわれは入院期間の短縮とステロイド導入による初期増悪を予防するため、当初から血漿交換を施行し、ステロイドを 80~100mg 隔日導入する血漿交換併用ステロイド導入法を行った。

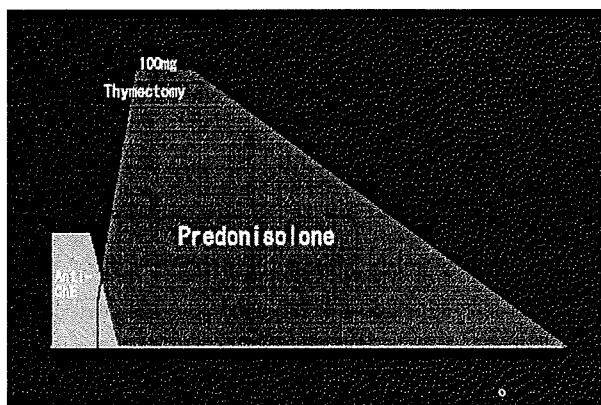


図 1. 漸増法

初期増悪を予防する目的でステロイドを少量から開始し、徐々に投与量を増やし、隔日 100mg まで増量し胸腺摘除術を施行する。

千葉大学神経内科

対象・方法

全身型重症筋無力症の患者 4 名 (表 1) に二重濾過による血漿交換を 1 回施行した翌日から 80-100mg のプレドニゾンを隔日に開始した。その後 1 日おきに 3 回、トリプトファンカラムにより免疫吸着を施行した。ステロイド漸増法を用いた 44 例と初期増悪の有無、ステロイド導入後の手術までの期間、術後の経過等を比較した。臨床経過は Besinger [2] の評価法を一部改変し用いた (表 2)

表 1 併用法対象者

年齢	性	罹病期間	重症度 (前)	重症度 (後)	AchR 抗体	胸腺組織
17	F	20 mo	12	13	N. D.	過形成
48	F	37 mo	12	0	81	正岡 II 型
38	F	2 mo	9	5	26	過形成
52	F	85 mo	9	8	770	過形成

表 2. 評価方法

テスト手技	Grade	Score			記載方法
		0	1	2	
眼症状	1 右方視時の減弱 ** 2 左方視時の減弱 ** 3 眼直下垂 (上方視)	60秒以上 60秒以上 上眼筋の挙動にかかると60秒以上	60>X≥20秒 60>X≥20秒	20>X>0秒 20>X>0秒 20>X>0秒	常時 秒数 常時 秒数 常時 秒数
球症状	4 顔面筋力 5 咀嚼力 6 VC(L), %VC 7 嚥下 8 臥位で頭部45度挙上	正常 正常 60%以上 正常 120秒以上	完全閉眼しむあり 固形物咀嚼で疲労 60>%VC≥60% 普通食で飲み込み<1 120>X≥60秒	完全閉眼しむあり 柔らかい物のみ可能 60>%VC むせ・鼻声あり 60>X>0秒	完全閉眼不可能 秒数 Grade L (%) 秒数 不可能
四肢症状	9 座位で両上肢90度前方挙上 10 臥位で右足45度挙上 ** 11 臥位で左足45度挙上 ** 12 右握力 ** 13 左握力 **	120秒以上 60秒以上 60秒以上 男:2kg以上 女:2kg以上	120>X≥60秒 60>X≥20秒 60>X≥20秒 20>X≥1kg 20>X≥1kg	60>X≥10秒 20>X>0秒 20>X>0秒 15>X≥2kg 10>X≥2kg	10秒未満 不可能 不可能 kg未満 kg未満

* 姿勢の10は座位で検査
** 両側が1kg未満を1kgと記録
* それぞれ悪い方で判別する。

結 果

初期増悪はステロイド漸増法 (漸増法) では約 60%に認められたが、血漿交換併用ステロイド導入法 (併用法)

では認められなかった。漸増法では初期増悪により1名がクリーゼになった。初期増悪の改善のために3例で血漿交換が施行された。手術までのステロイド導入からの期間は漸増法で平均63日、併用法で31日と著明に短縮した。漸増法でステロイドによる臨床症状の明らかな改善は75%に認められた。併用法では全例で改善が認められた。術後の症状悪化は漸増法では16%、7名に、併用法では48歳女性例で認められた。

表3. 漸増法と併用法の比較

方法 (人数)	初期増悪	寛解/ 改善	胸腺摘除 までの 日数	胸腺摘除 までの ステロイド (mg)
漸増法 (44)	63%	75%	72	2695
併用法 (4)	0%	100%	26	1225

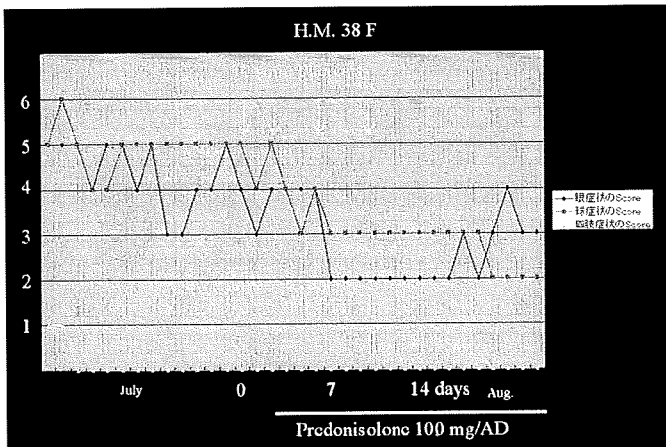


図2. 患者HM48歳女性例の臨床経過

考 察

ステロイドの術前投与は胸腺摘除術後の症状増悪によるクリーゼを減少させることが知られている[1]。術後のクリーゼと臨床症状の相関では、術前の全身状態が最も影響を与えることを考えると少なくとも日常生活に制限があるような症例に関してはステロイドによる術前の全身状態の改善が必要と考えられる[2]。ステロイドの投与は初期増悪を引き起こすことがあり、時にはクリーゼにまでいたる。その予防のため少量のステロイドから漸増

する方法をわれわれはとってきたが、少量から開始しても初期増悪が半数以上に認められ、手術までの平均期間は2か月以上におよんでいた。しかし併用法では初期増悪は認められず、また約1か月で手術がおこなえた。治療開始から約2週間後には既に安定した状態になっていたことから今後は、さらに手術までの期間を短縮する事も可能と考えられる。問題点としては、漸増法ではほとんどみられない術後クリーゼが1例で認められたことである。術前の長期にわたるステロイドの使用が術後のクリーゼを予防している可能性は否定できず、今後、併用法の症例を増やし、術後を含めた長期予後の観察が必要である。

引用文献

- 1) 新井 洋、伊藤直樹、平山恵造：全身型重症筋無力症に対するステロイド・胸腺摘除併用療法の長期効果. 神経治療 1995 ; 12 : 437-443
- 2) Besinger UA et al: Myasthenia gravis: long term correlation of binding and bungarotoxin blocking antibodies against acetylcholine receptors with changes in disease severity. Neurology 1983;33: 1316-1321
- 3) 木田博文、有村公良、納 光弘：重症筋無力症の術後クリーゼを示唆する要因と治療. 神経治療 1998 ; 49 : 155-160

SCID マウスを使った重症筋無力症における自己免疫機序の研究

吉川 弘明 Vanda A. Lennon* 高守 正治

目 的

重症筋無力症 (MG) が, 神経筋接合部のアセチルコリン受容体 (AChR) を標的とした自己免疫疾患であることは既に明らかとなっているが [1], なぜ MG 患者において特異的に抗 AChR 抗体 (AChRab) が産生されるようになるのかは不明のままである. ラットやマウスに AChR を免疫して作製する実験的重症筋無力症モデル (EAMG) は, MG 類似の臨床症状を呈するものの, 免疫異常という点からは外部からアジュバントとともに与えた AChR に対して作製された抗体が, 動物の AChR に交差反応を起こしているために発症するモデルであり, 発症の引き金が何かという点では MG の病態とは異なっている. MG における免疫異常の解明は, これまで多くの制約があり困難であった. すなわち患者のリンパ器官サンプルとして得られるのは末梢血リンパ球 (PBL) が主であること, 患者に抗原などを投与して免疫系の反応をみることはできないことなどのためである. Severe combined immune deficiency (SCID) マウスは, 常染色体劣性遺伝形式の突然変異であり機能を持った T 細胞, B 細胞が形成されない [2]. そのため, SCID マウスに移植したヒト・リンパ球は, マウス免疫系の標的となることなく機能をもったヒト免疫系を構築することができる [3, 4]. これまで, primary biliary cirrhosis (PBC) [5], systemic lupus erythematosus (SLE) [6], rheumatoid arthritis (RA) [7], Graves' disease [8] そして MG [9, 10] において SCID マウスとヒトのモデル (hu-SCID model) が研究されてきた. hu-SCID モデルは細胞培養よりも, より生理的な条件でヒト免疫細胞の解析を可能とする手段として有用と考えられ, 我々はこの系を使って MG の免疫異常の解明を試みた.

対象および方法

MG 患者リンパ組織として, 摘出胸腺を用いた. 全ての患者に十分な説明をし, インフォームドコンセントを得た. 患者は AChRab が高値の症例を選んだ (表 1). 胸腺は金属メッシュを通して単細胞浮遊液とした. メス C.B-17 scid/scid (SCID) マウスは無菌的条件下で飼育した. これらの SCID マウス一匹あたり $1.6 - 4.0 \times 10^7$ 個のヒト細胞を腹腔内に注入した (MG-SCID マウス). SCID マウスは毎週体重を調べるとともに 10 日ごとに採血をして, 血清中

のヒト IgG, IgM ならびに AChRab 価を測定した. ヒト IgG, IgM は ELISA 法により測定し, AChRab はヒト骨格筋 AChR を ^{125}I - α -bungarotoxin で標識し, 免疫沈降法により測定した. 全ての MG-SCID マウスには組み換えヒトアセチルコリン受容体 (AChR) α_1 subunit (残基番号 1-210; H α 1-210) を間欠的に腹腔内投与した.

MG-SCID マウスの腹腔内細胞を集めるためには, 培養液で数回腹腔内を洗浄した. Histopaque 1077 により細胞を遠心分離した後, スライドグラスに細胞を固定し, ヒトリンパ球の表面抗原に対するモノクローナル抗体 (anti-CD3, CD20, HLA-DR, CD45) で免疫染色した. 胸腺細胞注入後 218 日経過した一匹の MG-SCID マウス腹腔内細胞から, 放射線照射したドナーの末梢血リンパ球を抗原提示細胞に使い, H α 1-210 と IL-2 存在下に T 細胞クローニングを試みた. 得られた T 細胞ラインは, フローサイトメーターを使いリンパ球表面抗原 (CD3, CD4, CD8, CD20, HLA-DR) の発現を解析した.

結 果

ヒト IgG, IgM は, MG 胸腺細胞注入後 30 日以内に SCID マウス血中より検出できた. IgG, IgM の値はともに 20-70 日にピークとなり, 以後低下していった. 同じ数の細胞を注入しても, 最大値はマウスによって異なっていた (表 2). IgG の値が IgM よりも大きかった. SCID マウス血中 AChRab は, 20-40 日後にピークとなり以後急速に低下していった. その最大値はやはり同じ細胞を注入してもマウスにより異なっていた. 胸腺細胞注入後 170 日, 260 日経過した MG-SCID マウスの腹腔内洗浄液中にはヒト・リンパ球が存在し, T もしくは B 細胞であり, その多くが HLA-DR 陽性であった (表 3). T 細胞クローニングにより 21 個の T 細胞ラインが得られた. そのうち 13 個のラインが H α 1-210 に反応し, stimulation index (S.I.) が 1.0 以上で増殖することがわかった (図 1). そのなかの一つの T 細胞ラインをフローサイトメーターにより解析すると, 60% が T helper subset (CD3+ CD4+ CD8- CD20- HLA-DR+) であり, 13% が T cytotoxic/suppressor subset (CD3+ CD4- CD8+ CD20- HLA-DR+), 20% が NK cell (CD3- CD4- CD8- CD20- HLA-DR+) であることがわかった (表 4).

考 察

金沢大学医学部神経内科

*Mayo Clinic, Neuroimmunology Laboratory

SCID マウス腹腔内でヒト・リンパ球は長期間 (すくなくとも 260 日) 生存していることがわかった。また腹腔内に注入後, 間欠的に抗原 (Hα1-210) 刺激された胸腺細胞からは, Hα1-210 に特異的な T 細胞ラインが得られた [11]。そのラインは T helper, T cytotoxic/suppressor, NK cell の 3 種類の細胞群よりなり, これらの細胞が MG の発症に深く関わっている可能性が考えられた。以上の結果は, MG の免疫異常が SCID マウス体内で再現されることを示している。また MG 患者の血清 AChRAb 価と, その患者の胸腺細胞を移植した MG-SCID マウスの血清 AChRAb 価が相関することも報告されている [12]。今後さらにこの系を用いて, 正常と MG の免疫機構の違いを明らかにしていくことが必要と思われる。

まとめ

MG 患者の胸腺細胞を SCID マウス腹腔内に移植し, 以下の結果を得た。

- 1) MG 患者胸腺細胞は SCID マウス腹腔内で, 長期間 (少なくとも 260 日) 生存可能であり, AChR に対する抗原特異性を保持している。
- 2) MG-SCID マウスの解析は, MG における免疫異常の解明に有用な情報を与えてくれる可能性がある。

文 献

- 1) Drachman, DB : Myasthenia gravis. N Engl J Med 330: 1797-1810, 1994
- 2) Bosma MJ et al : A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. Nature 301: 527-530, 1983
- 3) McCune JM et al : The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. Science 241: 1632-1639, 1988
- 4) Bosma MJ et al : The SCID mouse mutant: definition,

characterization, and potential uses. Annu Rev Immunol 9: 323-350, 1991

5) Krams SM et al : Generation of biliary lesions after transfer of human lymphocytes into severe combined immunodeficient (SCID) mice. J Exp Med 170: 1919-1930, 1989

6) Duchosal MA et al : Transfer of human systemic lupus erythematosus into severe combined immunodeficient (SCID) mice. J Exp Med 172: 985-988, 1990

7) Tighe H et al : Autoantibody production by severe combined immunodeficient mice reconstituted with synovial cells from rheumatoid arthritis patients. Eur J Immunol 20: 1843-1848, 1990

8) Davies TF et al : The SCID-hu mouse and thyroid autoimmunity: characterization of human thyroid autoantibody secretion. Clin Immunol Immunopathol 60: 319-330, 1991

9) Schönbeck S et al : Transplantation of thymic autoimmune microenvironment to severe combined immunodeficiency mice. Transplantation of thymic autoimmune microenvironment to severe combined immunodeficiency mice. A new model of myasthenia gravis. J Clin Invest 90: 245-250, 1992

10) Martino G et al : The human-severe combined immunodeficiency myasthenic mouse model: a new approach for the study of myasthenia gravis. Ann Neurol 34: 48-56, 1993

11) Yoshikawa H : Engraftment of myasthenia gravis thymocytes into severe combined immunodeficiency (SCID) mice. Autoimmunity 28: 217-224, 1998

12) Yoshikawa H et al : Acetylcholine receptor autoantibody secretion by thymocytes: relationship to myasthenia gravis. Neurology 49: 562-567, 1997

表 1. Successfully reconstituted MG-SCID mice and donor's serological data

Mouse #	Donors	Cell # (x 10 ⁷)	Donor's serum autoantibody profile		
			AChR Bi (nM)	AChR Bi (%)	AChR Mod (%)
1, 2	MG-1	1.6	5646	57	90
3, 4, 5	MG-2	4.0	131	61	92
6, 7, 8	MG-3	1.9	61.8	56	84

表 2. Serological finding for successfully reconstituted SCID mice

Mouse #	Thymus	Peak value		
		IgG ($\mu\text{g/ml}$)	IgM ($\mu\text{g/ml}$)	AChR Bi (nM)
1	MG-1	880	7.8	0.98
2		576	5.2	0.62
3	MG-2	656	5	4.08
4		1190	18	2.04
5		1935	51	2.56
6	MG-3	20	0.8	0.12
7		100	1	0.07
8		258	3.9	0.19

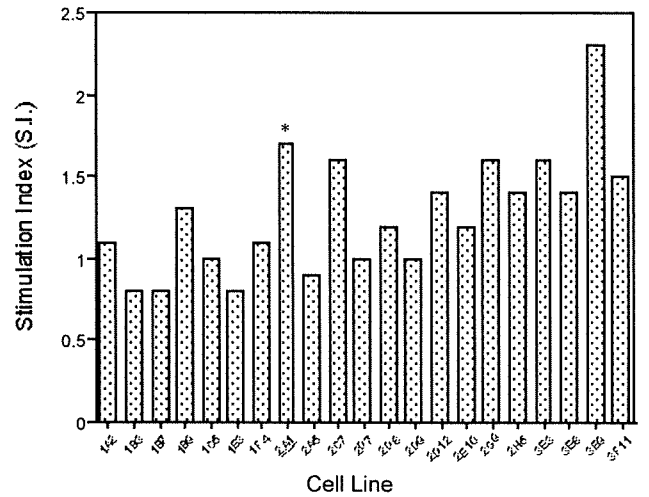


图 1. Histogram of stimulation index (S.I.) of T cell lines from MG-SCID mouse #2 against rH α 1-210 (3 pmol/l). Underlined 2A1 was further analyzed by FACS.

表 3. Immunocytostaining of MG-SCID mice peritoneal cells

Mouse #	Donor	CD3 (%)	CD20 (%)	DR (%)	CD45 (%)	Peritoneal cell [#] ($\times 10^5$)
3	MG-2	7.0	4.0	5.5	10.5	6.8
4		11.0	12.5	17.5	23.5	3.4
5		0.0	0.0	1.5	4.5	4.8
6	MG-3	10.5	12.5	19.0	23.5	3.6
7		13.5	11.0	30.0	31.5	9.6
8		16.5	14.5	26.5	30.0	7.5
mean \pm SD		9.8 \pm 5.2	9.1 \pm 5.2	16.7 \pm 10.3	20.6 \pm 9.9	6.0 \pm 2.2

*Leukocytes of density ≤ 1.077 isolated by Histopaque centrifugation.

表 4. Summary of FACS analysis of T cell line 2A1 phenotype

	CD3	CD4	CD8	CD20	DR	%
A	+	+	-	-	+	60
B	+	-	+	-	+	13
C	-	-	-	-	+	20

Cell transfer よる実験的筋無力症の発症機序の検討

松尾 秀徳 福留 隆泰 後藤 公文 一瀬 克浩
藤下 敏 澁谷 統寿 本村 政勝* 吉村 俊朗**

目 的

重症筋無力症 (MG) は骨格筋の神経筋接合部に存在するアセチルコリン受容体 (AChR) に対する自己抗体により神経筋伝達障害を生じる自己免疫疾患である。これまでに、抗 AChR 抗体の抗原への特異的結合性や、AChR で実験動物を免疫した場合に同様の親和性をもつ抗体が誘導できることなどから、MG は AChR そのものに対する抗体により発症すると考えられている。また、この自己抗体の産生には B 細胞のみならず自己反応性 T 細胞が重要な役割を持っていることが示されている。しかし、どのような機序で AChR に対する抗体産生が起こり始めるか、また、自己反応性 T 細胞や胸腺がどのように関わっているかについては明らかではない。本研究では、AChR に反応する T 細胞を passive transfer することにより、運動終板や胸腺にどのような変化が起こるかを検討した。

方 法

1) 抗原特異的 T 細胞ラインの作成：シビレエイ由来 AChR で免疫した Lewis ラットの所属リンパ節細胞浮遊液より AChR 特異的 T 細胞および AChR α -subunit の一部のペプチド T α 100-116 に特異的 T 細胞ラインを誘導した。また、Keyhole limpet hemocyanin (KLH) で免疫したラットの所属リンパ節より KLH 特異的 T 細胞ラインを作成した。

2) 抗原特異的 T 細胞ラインの passive transfer：それぞれの抗原で再刺激した T 細胞芽球を比重遠心で分離後、Hanks 液で 3 回洗浄し、 $2-3 \times 10^6$ 個ずつを静脈内に 1 回または 7-10 日毎に 4 回注入した。

3) 抗体の測定：それぞれの抗原特異的 T 細胞ラインを

国立療養所川棚病院神経内科 *長崎大学第一内科

**長崎大学医療技術短期大学部

静注後に経時的に採血し血清中の抗ラット AChR 抗体の測定を行った。抗ラット AChR 抗体の測定は、可溶化したラット除神経骨格筋由来 AChR を ^{125}I - α -bungarotoxin (BTX) で標識し、抗ラット IgG 血清を用いた免疫沈降法で行った。

4) 運動終板の観察：前肢伸筋の生検を行い、ペルオキシダーゼ標識 α BTX による運動終板 AChR の染色性と IgG の沈着の有無を検討した。さらに、グルタルアルデヒド固定標本を作成し、電顕にて運動終板の形態学的変化を観察した。また、横隔膜神経筋標本を作成し微小電極法により微小終板電位 (MEPP) と終板電位 (EPP) の記録を行った。

5) 胸腺の観察：摘出胸腺の病理学的検討を行った。

6) Thymectomy の効果の検討：AChR 特異的 T 細胞ラインの passive transfer の 2 週間前 (4 週齢) に thymectomy を行い、抗体産生に与える影響を検討した。

結 果

1) 抗原特異的 T 細胞ラインの specificity：AChR 特異的 T 細胞ラインは、シビレエイ由来 AChR に特異的に反応したが、精製したラット除神経骨格筋由来 AChR にも弱いながらも反応することを確認した。しかし、ペプチド T α 100-116、ヒト AChR α -subunit の合成ペプチド H α 125-147 には反応を示さなかった。T α 100-116 に反応する T 細胞ラインはシビレエイ由来 AChR にも強く反応したが、ラット除神経骨格筋由来 AChR にはほとんど反応しなかった。

2) 1 回の passive transfer：passive transfer 後 8 週までの観察では、血中には抗ラット AChR 抗体は検出できなかった。しかし、passive transfer 後 7 日目の筋生検で、実験群では α BTX による運動終板 AChR の染色性の低下が疑われ、運動終板への IgG の沈着が認められた。また、運動終板への細胞浸潤は認められなかった。

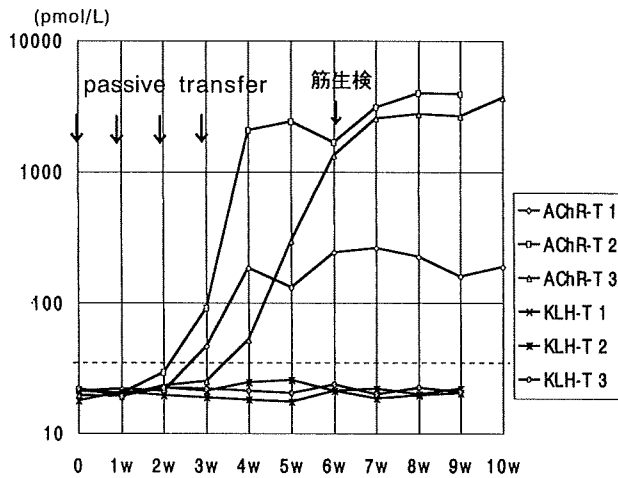


図1. AChR 特異的T細胞ライン passive transfer 後の抗ラット AChR 抗体価

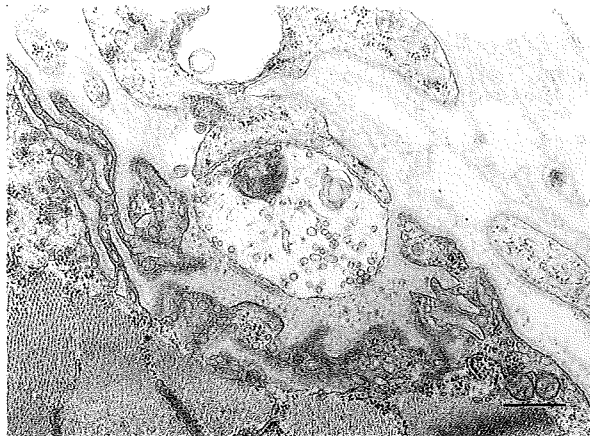


図2. 実験群ラット運動終板の微細構造 (Bar=500 nm)

3) 4回の passive transfer : 臨床症状はなかったが抗ラット AChR 抗体価は、実験群では、passive transfer 後3週前後より上昇していた(図1)。筋生検では実験群で α BTX による運動終板 AChR の染色性の低下があり、さらに運動終板への IgG の沈着が認められた。電顕ではシナプス間隙の開大とシナプスひだの平坦化が認められた(図2)。実験群の MEPP 振幅はコントロール群に比して低下していた。quantal content は両群で差はなかった(表1)。胸腺の病理学的検討では、抗体が上昇したラットの胸腺はコントロールと明らかな相違はなく、germinal center の形成は認めなかった。

4) T α 100-116 特異的T細胞ラインの passive transfer : passive transfer を4回繰り返したが、血清中には抗ラット AChR 抗体は検出できなかった。

表1. 微小電極法による神経筋伝達の解析

	対照群	実験群
数	2	2
微小終板電位		
静止膜電位 (mV)	78 \pm 1.5	69 \pm 2.3
頻度 (/sec)	0.90 \pm 0.07	0.28 \pm 0.02 ^b
振幅 (mV)	1.39 \pm 0.10	0.70 \pm 0.02 ^b
終板電位		
単位素量 (m)	43.9 \pm 4.9	38.6 \pm 5.6 ^c
クラレ (mg/ml) ^a	0.84	0.48, 0.24

Values are means \pm S.E.

Values of *m* are corrected for non-Poisson release

^a Curare concentration required for neuromuscular block.

^b P<0.001; ^c not significant (paired Student's t-test)

5) Thymectomy の効果 : thymectomy 後に AChR 特異的T細胞ラインの passive transfer を繰り返したラットの抗ラット AChR 抗体価は胸腺非摘出群に比して著しく低値であった(図3)。

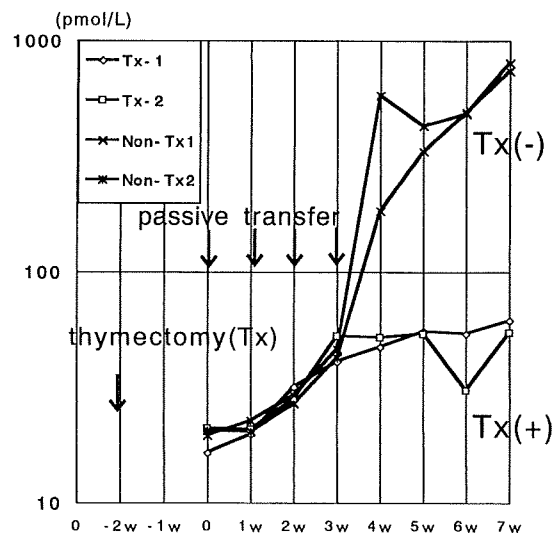


図3. Thymectomy の AChR 特異的T細胞ライン passive transfer への影響 (抗ラット AChR 抗体価)

考 察

AChR に反応するT細胞を passive transfer することで、自己抗体が産生される可能性が示唆された。1回の passive transfer では血中には抗体は検出できなかったが、運動終板に結合する抗体が証明された。passive transfer を繰り返すことにより、さらに抗体が上昇するものと推

測された。抗体が上昇したラットでは、明らかな症状はなかったが、運動終板の形態学的変化や電気生理学的変化からはMGを発症していると考えられた。一方、T α 100-116 特異的T細胞の passive transfer では、抗ラット AChR 抗体は検出できなかった。その理由として、この部分のペプチドがラットとシビレイで異なることから、T α 100-116 特異的T細胞がラット AChR を認識できず、passive transfer しても抗体産生にいたらなかったと考えられる。したがって、抗体産生の誘導には passive transfer されたT細胞が、自己の AChR (ラット AChR) を認識することが重要と考えられる。しかし、今回の実験系では抗原を取り込んだ dendritic cell などが混入し免疫反応を引き起こした可能性は否定できず、今後さらに検討を加える必要がある。また、検討した限りでは胸腺には異常がなく、抗体産生の部位など今後の検討が必要である。しかし、passive transfer 前に thymectomy を施行したラットでは抗 AChR 抗体の産生が著しく低値であったことから、この自己抗体産生には胸腺が何らかの関与をしているものと推測された。

ま と め

AChR 特異的T細胞が自己抗原 (ラット AChR) を認識し、抗体産生を誘導した可能性が示された。また、この自己抗体産生には胸腺が関与しているものと推測された。

文 献

- 1) Lehmann PV et al: Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen. *Nature* 358: 155-157, 1992
- 2) Vincent A et al: Response to human acetylcholine receptor α 138-199: determinant spreading initiates autoimmunity to self-antigen in rabbits. *Immunol Lett* 39: 269-275, 1994.
- 3) Tarrab-Hazdi R et al: Passive transfer of experimental autoimmune myasthenia by lymph node cells in inbred guinea pigs. *J Exp Med* 142: 785-789, 1975
- 4) Wykes M et al: Dendritic cells interact directly with naive B lymphocytes to transfer antigen and initiate class switching in a primary T-dependent response. *J Immunol*

胸腺細胞分化におけるアポトーシスの解析

藤井義敬 横山智輝 棚橋雅幸 山川洋右 桐山昌伸
斉藤雄史 矢野智紀 中島義明 森山 悟

目 的

重症筋無力症に胸腺摘出術が有効であることは知られている¹⁾²⁾が、その理由は明らかではない。また、重症筋無力症患者に高頻度に胸腺腫が合併することより、胸腺における異常が重症筋無力症の発症に関与していると考えられる。胸腺では自己反応性 T cell が除去されるという観点より、胸腺細胞分化におけるアポトーシスについて解析を試みた。

方 法

小児開心術の際、手術のため胸腺切除が必要となった症例のヒト正常胸腺より胸腺細胞を抽出し、解析に用いた。胸腺細胞分化における bcl-2 family の関与 CD4, CD8, CD69, bcl-2, bcl-x, bax に対する各抗体を用い、その発現を FACSCan にて解析をおこなった。

アポトーシスの解析

dexamethasone, etoposide を投与し、アポトーシスを誘導し、ANNEXIN V の発現を経時滴に FACSCan を用いて解析および DNA fragmentation を電気泳動によるラダー形成にて評価。さらにヒト胸腺細胞アポトーシスにおける caspase 3 の関与を検討するため dexamethasone, etoposide によるアポトーシス誘導後 caspase 3 activity (CPP32 activity assay) (MEDICAL&BIOLOGICAL LABORATORIES CO.LTD. CPP32/Caspase-3 colorimetric protease Assay Kit) を測定。

caspase inhibitor 投与による効果

caspase 1 inhibitor (Y-VAD · fmk), caspase 3 inhibitor (DEVD · CHO), broad specific caspase inhibitor (Z-VAD · fmk) (ペプチド研究所) で、preincubation 後、dexamethasone, etoposide にて、

アポトーシスを誘導。その後、ANNEXIN V, DNA fragmentation, CPP32 activity assay にて評価する。

結 果

thymocyte differentiation における bcl-2 の発現 bcl-2 / CD4/CD8 3color FACSCan では、CD4/8 double negative (DN) stage で bcl-2 high, double positive (DP) stage で bcl-2 low となり、再び CD4 single positive (4SP) および CD8 single positive (8SP) stage で bcl-2 high となる (図 1)。これは thymocyte が分化・成熟していく過程で、TCR を発現し DP stage においてごく一部が positive selection を受け、CD4SP あるいは CD8SP stage へ分化していくが、多くは bcl-2 が down regulation されたままアポトーシスに陥り、除去されていくと考えられる。そこで、positive selection の marker として CD69 を用いて、bcl-2/CD69/CD8/CD4 4color FACSCan を行ったところ、CD4+8+69+ cell は bcl-2 high であり、positive selection を受ける細胞は、bcl-2 の up regulation がおきて SP stage へ分化していくことが示唆された。

thymocyte differentiation における bax, bcl-x の発現 thymocyte differentiation における他の bcl-2 family の関与について検討をおこなった。bax/CD4/CD8 3color FACSCan では、各 stage で bax の発現に差は認められなかった。一方、bcl-x/CD4/CD8 3color FACSCan では、DP stage において bcl-x の up regulation がおこっており、thymocyte の分化において、その関与が示唆された (図 2)。

dexamethasone, etoposide によるアポトーシスの誘導 dexamethasone, etoposide によるアポトーシスを、FACS での ANNEXIN V の発現により評価を行った。10 μM の dexamethasone あるいは etoposide 投与 6 時間後には十分なアポトーシスが誘導されていることを確認した。

名古屋市立大学第 2 外科

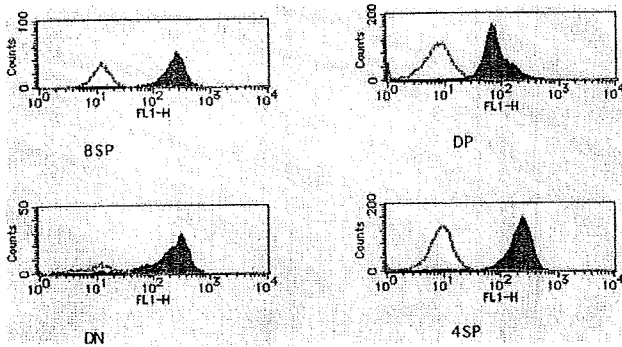


図1 thymocyte 各分画における bcl-2 の発現

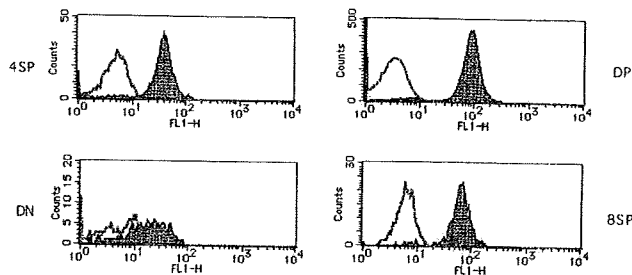


図2 thymocyte 各分画における bcl-x の発現

caspase inhibitor 投与の効果

Y-VAD・fmk, Ac-DEVD・CHO, Z-VAD・fmk にて 1 時間 preincubation 後、dexamethasone あるいは etoposide にてアポトーシスを誘導したところ、caspase inhibitor 投与による、ANNEXIN V の発現に差は認められなかった (図 3)。このことは thymocyte アポトーシスに caspase の関与が小さいことを示唆する。

CPP32 activity assay

dexamethasone、etoposide 投与によりアポトーシスを誘導し、CPP32 の活性を測定したが、その活性に変化は見られなかった (図 4)。これは、dexamethasone、etoposide によるアポトーシスの誘導に caspase 3 の関与が低いことを示す。

DNA fragmentation

dexamethasone にてアポトーシスを誘導し、電気泳動によるラダー形成により、DNA fragmentation を評価した。Z-VAD・fmk preincubation 群で、DNA fragmentation は抑制されていた。

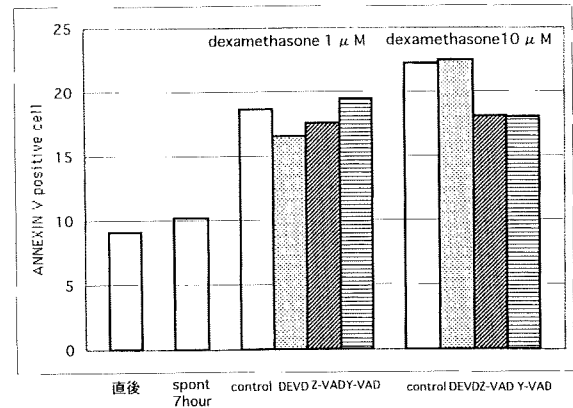


図3 dexamethasone induced apoptosis に対する caspase inhibitor の効果

各 caspase inhibitor 100 μM にて preincubation 後、dexamethasone 10 μM 加え、6 時間 incubation。ANNEXIN V positive cell をフローサイトメトリーにて評価。

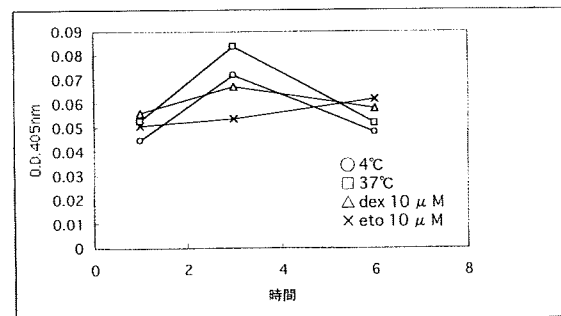


図4 CPP32 activity assay

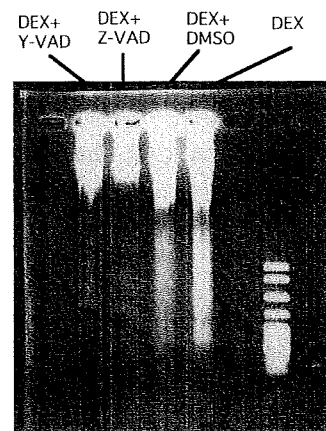


図5 DNA fragmentation

各 caspase inhibitor 100 μM にて preincubation 後、dexamethasone 10 μM 加え、6 時間 incubation。DNA を抽出し、電気泳動。

考 察

胸腺で自己反応性 T cell の除去がおこなわれているが、これらの細胞はアポトーシスにより細胞死をおこす。このアポトーシスに bcl-2 family が深く関与していることが分かってきた³⁾⁴⁾⁵⁾が、thymocyte differentiation においてその詳細は不明で、さらに human thymocyte では検討も不十分である。今回、human thymocyte differentiation における bcl-2 family の変動を FACSCan をおこなうことにより解析し、その役割について検討した。thymocyte が最も未熟な DN stage においては bcl-2 high, bcl-x low であり、TCR を細胞表面に発現し DP stage に至ると、bcl-2 low, bcl-x high となった³⁾。これは、MHC の拘束性をうけ多くの細胞は default あるいは negative selection により不要と判断され、bcl-2 の down regulation がおこり、アポトーシスに陥ると考えられる。事実、DP stage のうち、positive selection をうけたと考えられる CD69+ cell は bcl-2 high であり、TCR のシグナルにより bcl-2 が up regulation されアポトーシスをまぬがれて、末梢に放出されていくと考えられる。一方、bcl-x は DP stage において up regulation をうけており、bcl-2 と逆相関を示した。この結果は Grillot らの mouse における western blotting の結果と一致している²⁾⁴⁾。bcl-x は SP stage で再び bcl-x low となり、positive selection をうけた thymocyte は bcl-2 を up regulation するため、bcl-x が不要となり down regulation をうけるのかもしれない。また bax は各 stage においてその発現量に変化は見られなかった。

次にアポトーシスに serine protease である caspase family が重要であることがいわれているが、我々は dexamethasone, etoposide による thymocyte のアポトーシスにおける、caspase の関与を検討した。ANNEXIN V による評価において、caspase 1 inhibitor, caspase 3 inhibitor, broad specific caspase inhibitor を投与しても、アポトーシスの阻害効果は認めなかった。また、dexamethasone あるいは etoposide 投与によるアポトーシス誘導後も、caspase 3 の活性化を示す CPP32 activity の上昇は見られず、ヒト thymocyte の dexamethasone, etoposide によるアポトーシスには caspase 3 の関与は否定的であった。しかし、DNA fragmentation においては、broad specific caspase inhibitor による阻害効果は認められており、caspase 3 以外の caspase の関与も考えられる。

結 果

1. thymocyte はその分化の過程で、DP stage において positive selection をうけなかった細胞は bcl-2 family の

regulation により、アポトーシスを誘導されている。

2. dexamethasone あるいは etoposide によるヒト thymocyte のアポトーシスにおいては caspase 3 の関与は低いと考えられ、他の caspase あるいは AIF のように caspase をかきさないアポトーシスのシグナルを考えなければならない。

文 献

- 1) Buckingham, J.M., Howard, F.M., Bernatz, P.E., Payne, W.S., Harrison, E.G. Jr., O'Brien, P.C., Weiland, L.H.: The value of thymectomy in myasthenia gravis: Ann. Surg., 184: 453-458, 1976.
- 2) A. Masaoka, Y. Yamakawa, H. Niwa, I. Fukai, S. Kondo, M. Kobayashi, Y. Fujii, Y. Monden.: Extended thymectomy for myasthenia gravis patients: A 20-year Review: Ann. Thorac. Surg. 62: 853-859, 1996.
- 3) Veis, D.J., Sentman, C.L., Bach, E.A., Korsmeyer, S.J.: Expression of Bcl-2 protein in murine and human thymocyte and in peripheral T lymphocyte.: J. Immunol. 151: 2546-54, 1993.
- 4) Grillot DA, Merino R, Nunez G.: Bcl-XL displays restricted distribution during T cell development and inhibits multiple forms of apoptosis but not clonal deletion in transgenic mice: J. Exp. Med., 182: 1973-83, 1995.
- 5) Chao, D.T., Korsmeyer, S.J.: Bcl-XL-regulated apoptosis in T cell development.: J. Immunol. 9: 1375-84, 1997.