

自己免疫性橋本脳症における抗原検索

藤井 明弘¹⁾ 米田 誠¹⁾ 鈴木 寛²⁾ 栗山 勝¹⁾

目 的

自己免疫性甲状腺炎である橋本病では、甲状腺の機能低下により痴呆、精神異常、小脳失調などの種々の神経症状を合併することがよく知られている。しかし、甲状腺の機能低下に基づかない自己免疫性脳症が存在し、橋本脳症と呼ばれている¹⁾。昨年の本会議で、我々は橋本脳症と考えられる2例の患者血清中に中枢神経組織と特異的に反応する自己抗体が存在することを指摘した。今回、我々はこれらの橋本脳症患者血清中に存在する中枢神経組織特異的自己抗体が反応する抗原蛋白の同定を試みた。

方 法

(1) 抗原候補蛋白の N 末端アミノ酸配列分析・アミノ酸ホモロジー解析：昨年の本会議で報告したごとく、2例の橋本脳症患者血清を用いた免疫プロットにおいて中枢神経組織と特異的に反応するバンドが認められた(症例1：灰白質において79 kDaと60 kDaの蛋白に反応するバンド、症例2：灰白質において60 kDaの蛋白に反応するバンドと大脳白質、灰白質において48 kDaの蛋白に反応するバンド)。今回、2例の橋本脳症患者血清と反応した灰白質における60 kDaの蛋白と症例2の患者血清と反応した大脳白質、灰白質の48 kDaの蛋白を抗原候補蛋白とし、N末端アミノ酸配列分析とアミノ酸ホモロジー解析を施行した。N末端アミノ酸配列分析は、灰白質ホモジェネートを電気泳動し、PVDF膜にウエスタンブロットを行った。PVDF膜より目的のバンドを切り出し、リジルエンドペプチダーゼを用いて酵素消化した後、逆相 HPLC により断片化ペプチドを分離し N 末端アミノ酸配列を決定した。得られたアミノ酸配列よりアミノ酸ホモロジー解析を行い、既知の蛋白との照合を行った。

(2) リコンビナント蛋白による抗原性の確認：神経芽腫細胞の mRNA から RT-PCR により抗原候補蛋白の cDNA を増幅し、蛋白発現ベクター (glutathione-S-transferase(GST)融合蛋白発現ベクター) に挿入した。この組み換え遺伝子を用いて大腸菌を形質転換し、大腸菌内で目的蛋白を GST と結合したリコンビナント蛋白を発現させ、目的蛋白を融合蛋白より切断し精製した(この蛋白発現ベクターは GST と目的蛋白の間にトロンピンプロテアーゼ認識部位を有するためトロンピンプロテアーゼ処理をすることにより目的蛋白と GST に分離できる)。この精製したリコンビナント蛋白と患者血清を一晩反応させ(吸収試験)、吸収前後の患者血清を用いて免疫プロットを施行した。

結 果

(1) 2例の橋本脳症患者血清と反応した灰白質における60 kDaの蛋白の N 末端アミノ酸配列分析の結果は以下の通りであった。

Asp - Ala - His - Lys - Ser - Glu - Val - Ala - His - Arg

この確定した配列を蛋白質データベースでアミノ酸ホモロジー解析をしたところ、syntaxin binding protein 1 の2残基目からの配列に完全一致した。また、症例2の患者血清と反応した大脳白質、灰白質における48 kDaの蛋白の N 末端アミノ酸配列分析の結果は以下の通りであった。

Ala - Arg - Gly - Lys - Ala - Lys - Glu - Glu - Gly - Ser

同様にホモロジー解析をしたところ、sodium / potassium - transporting ATPase β -1 chain の2残基目からの配列に完全一致した。

(2) 症例1の患者血清を用いた syntaxin binding protein 1 リコンビナント蛋白の吸収試験では、吸収試験後で、syntaxin binding protein 1 蛋白と反応していると考えられるバンドは淡明化した(図1)。また、症例2の患者血清を用いた sodium / potassium - transporting ATPase β -1 chain 蛋白の C 末側より

¹⁾ 福井医科大学第二内科

²⁾ 福井県立大学分子生物学科

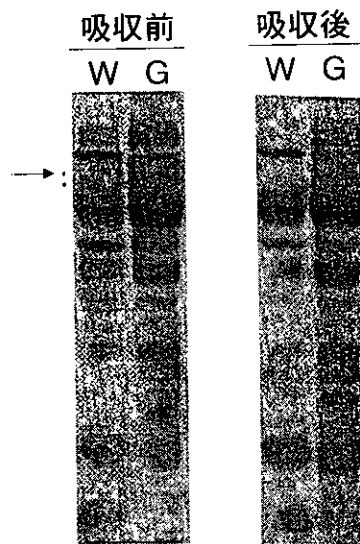


図1. syntaxin binding protein 1 リコンビナント蛋白による吸収試験
W: 大脳白質
G: 灰白質

約 60%の部分のリコンビナント蛋白の吸収試験では、吸収試験後で、sodium / potassium - transporting ATPase β -1 chain 蛋白と反応していると考えられるバンドの淡明化・消失は認めなかった。

考 察

橋本脳症は、自己免疫性甲状腺炎である橋本病患者に発症する脳症であり、また、ステロイド治療が著功することより、自己免疫性脳症と考えられている。昨年の班会議で橋本脳症患者血清中にはいくつかの神経組織特異的自己抗体が存在することを提示した。今回、その自己抗体が反応する 2 蛋白について検討したところ、60kDa の蛋白が syntaxin binding protein 1 であり、48kDa の蛋白が sodium / potassium - transporting ATPase β -1 chain であることが示唆された。そして、その抗原性の確認のために施行した syntaxin binding protein 1 のリコンビナント蛋白を用いた吸収試験では、吸収前後の比較でバンドの淡明化が認められ、患者血清中に syntaxin binding protein 1 に反応する抗体が存在する可能性が考えられた。しかし、抗体力価は低く、病因との関連については多数例の検討や抗体力価の測定をする必要がある。

一方、sodium / potassium - transporting ATPase β -1 chain 蛋白の C 末側より約 60%の部分のリコンビナント蛋白を用いた吸収試験では、吸収前後の比較でバンドの淡明化・消失は認められず、C 末側より約 60%の部分には抗原提示部位はないと考えられた。今後、sodium / potassium - transporting ATPase β -1 chain の N 末側の蛋白を用いた検討をする必要がある。

まとめ

(1) N 末端アミノ酸配列分析から 60kDa と 48kDa の蛋白は、それぞれ、syntaxin binding protein 1 と sodium / potassium - transporting ATPase β -1 chain と推定された。

(2) 大腸菌で発現・精製した syntaxin binding protein 1 のリコンビナント蛋白を用いた吸収試験では、60kDa のバンドの淡明化が認められた。

(3) 大腸菌で発現・精製した sodium / potassium - transporting ATPase β -1 chain の C 末側のリコンビナント蛋白を用いた吸収試験では、48kDa のバンドの淡明化・消失は認められなかった。

謝辞：貴重な橋本脳症患者血清（症例 2）を供与していただいた那覇市立病院内科・比嘉秀正先生に深謝致します。

文 献

- 1) Shaw P.J. et al: Hashimoto's encephalopathy : A steroid-responsive disorder associated with high anti-thyroid antibody titers-report of 5 cases. Neurology 41: 228-233, 1991

亜急性硬化性全脳炎患者における Th1/Th2 サイトカイン 関連遺伝子多型解析

吉良龍太郎¹⁾ 井上岳彦^{1,2)} 中尾 太¹⁾ 井原健二¹⁾ 楠原浩一¹⁾
竹下研三²⁾ 原 寿郎¹⁾

目 的

亜急性硬化性全脳炎 (subacute sclerosing panencephalitis; SSPE) は麻疹ウイルス (MV) の脳内持続感染による遅発性ウイルス感染症であるが、その正確な病因は未だ解明されていない^{1,2)}。SSPE 患者の脳から分離された MV には遺伝子の広範な変異による matrix(M)蛋白の欠損や F 蛋白の変異があり、エンペローブに関連した遺伝子の広範な変異が特徴とされてきたが、最近になりいくつかの M 蛋白遺伝子変異は最近の分離株と同じであることが報告された³⁾。したがってこれらの変異が SSPE 発症を決定する因子かどうか現在のところ不明である。

一方、宿主側の因子として免疫能および中枢神経系の未熟性が SSPE 発症に関与すると考えられている。2歳以前に麻疹に罹患した幼児において SSPE を起こすリスクが高いからである⁴⁾。SSPE 患者において普遍的な免疫の異常は見られないが、血清および髄液中の抗 MV 抗体が高値を示し、MV 特異的細胞性免疫が高率に障害されているとの報告がある^{4,5)}。われわれはこれまでに、SSPE 患者における末梢血単核球の生 MV 特異的 T helper (Th) 1/Th2 サイトカイン産生測定を行い、大部分の SSPE 患者において Th1 サイトカインのひとつであるインターフェロン(IFN)γ産生能が低下し、Th2 サイトカインの産生は保たれていることを示した⁶⁾。このように SSPE 患者において MV に対する Th2 反応が優位であるのは、MV 初感染時に認められる Th2 優位性が持続することを示している可能性がある。そして麻疹罹患時、Th2 反応がより強く働いた場合に、MV 排除が不十分となり持続感染が起こりやすくなる可能性も考えられる。

本研究では SSPE 患者における Th1/Th2 サイトカイン反応の遺伝的背景を明らかにするため、アトピー喘息、SLE、結核感染などとの関連がすでに報告され機能変化が推定されている Th1/Th2 サイトカイン遺伝子およびその関連遺伝子の多型を解析した。

対象と方法

SSPE 青空の会 (親の会) の協力により採血可能であった日本人の SSPE 患者 38 例 (男性 25 例、女性 13 例) および正常な日本人 100 例を対象とした。文書により同意を得た上で末梢血より DNA を抽出した。

Th1 サイトカイン関連遺伝子多型として IFN-γ CA repeat、IFN-γ receptor 1 (IFNGR1) codon 14 Val/Met、IFN-γ receptor 2 (IFNGR2) codon 64 Gln/Arg、IFN regulatory factor (IRF)-1 GT repeat、Th2 サイトカイン関連遺伝子多型として IL-4 promoter -589 C/T、IL-4 receptor α chain (IL-4R) codon 50 Ile/Val、IL-10 promoter -627 C/A、さらに Th1 誘導サイトカイン多型として IL-12 receptor β 1 chain (IL-12RB1) codon 214 Gln/Arg、365 Met/Thr、378 Gln/Arg について、PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP)法、PCR- single-strand conformation polymorphism (SSCP)、allele-specific PCR (ASPCR)法、allele-specific amplification method with TaqMan fluorogenic probe (TaqMan-ASA)法などを用いて遺伝子型を決定した。

結 果

IL-4 promoter -589T アレルの頻度が正常コントロールに比べ SSPE で有意に高く (p=0.031)、その他の多型では SSPE とコントロール間に有意差は認めなかった (表 1、2)。ロジスティック回帰分析により IL-4 promoter -589 多型および他の多型との交互作用を解析したところ、IRF-1 アレル 1 が IL-4 promoter -589TT と相互作用をもつ傾向 (p=0.0593) が見られた。IL-4 promoter -589TT と IRF-1 アレル 1 (ヘテロまたはホモ) との遺伝子型の組み合わせの頻度はコントロール(22.0%)に比べ SSPE 患者(47.7%)ではさらに有意に高かった (p=0.003)。2歳以降に麻疹に罹患した SSPE 患者 5 例うち、4 例が IL-4 promoter -589T アレルのホモ接合、1 例がヘテロ接合であった。

前回の研究⁶⁾で MV 特異的 IFNγ産生能の低下を認めた 15 例のうち本研究では 13 例が検査可能であったが、MV 特異的 IFNγ産生能や SSPE の進行と遺伝子多型の間には相関はなかった。

1) 九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野
2) 鳥取大学医学部脳神経小児科

表 1. SSPE 患者およびコントロールにおける Th1/Th2 サイトカイン関連遺伝子多型のアレル頻度

		Controls (total = 200) n (%)	SSPE (total = 76) n (%)	p-value
<i>IL-4 promoter</i> -589	C	69 (34.5)	16 (21.1)	0.031
	T	131 (65.5)	60 (78.9)	
<i>IL-4R</i> codon 50	Ile	76 (38.0)	33 (43.4)	0.411
	Val	124 (62.0)	43 (56.6)	
<i>IL-10 promoter</i> -627	C	76 (38.0)	29 (38.2)	0.981
	A	124 (62.0)	47 (61.8)	
<i>IL-12RB1</i> codon 214	Gln	122 (61.0)	48 (63.2)	0.742
	Arg	78 (39.0)	28 (36.8)	
<i>IL-12RB1</i> codon 365	Met	122 (61.0)	42 (55.3)	0.386
	Thr	78 (39.5)	34 (44.7)	
<i>IL-12RB1</i> codon 378	Gln	121 (60.5)	48 (63.2)	0.686
	Arg	79 (39.5)	28 (36.8)	
<i>IFNGR1</i> codon 14	Val	195 (97.5)	73 (96.1)	0.522
	Met	5 (2.5)	3 (3.9)	
<i>IFNGR2</i> codon 64	Gln	103 (51.5)	34 (44.7)	0.315
	Arg	97 (48.5)	42 (55.3)	

p values were calculated using 2×2 chi square test.

考 察

IL-4 promoter および IRF-1 遺伝子多型が宿主の遺伝的要因として日本人 SSPE の発症に関与していることが初めて明らかになった。

Th1 サイトカインは細胞性免疫を、Th2 サイトカインは抗体産生を主に誘導する。IL-4 は Th2 反応の中心となるサイトカインで、B 細胞を活性化させ未熟 Th 細胞を Th2 細胞へ分化誘導すると同時に、Th1 への分化や Th1 機能（とくに IFN γ 産生）を抑制する働きがある。IL-4 promoter -589T アレルは C アレルよりも IL-4 promoter の活性を高め、Th2 反応優位性を誘導することがすでに知られている⁷⁾。IL-4 promoter -589TT と IRF-1 アレル 1 との遺伝子型の組み合わせが Th2 優位疾患であるアトピー喘息と関係することを最近我々は報告しており⁸⁾、両者の組み合わせによりさらに Th2 優位になると推測される。

麻疹において MV 感染自体が Th1/Th2 反応バランスに影響を与えることが知られている⁹⁾。発疹出現までは Th1 反応が誘導され、回復期には Th2 反応が誘導される。Th1 反応は血液および他の臓器から MV の排除にとって重大な役割を果たしている。一方、Th2

表 2. SSPE 患者およびコントロールにおける IFN- γ 遺伝子 CA リピート および IRF-1 遺伝子 GT リピート多型のアレル頻度

	Controls (total = 200) n (%)	SSPE (total = 76) n (%)	p-value
<i>IFN-γ</i>			
Allele 1	14 (7.0)	10 (13.2)	0.149
Allele 2	117 (58.5)	38 (50.0)	0.223
Allele 3	1 (0.5)	1 (1.3)	0.476
Allele 4	56 (28.0)	24 (31.6)	0.556
Allele 5	10 (5.0)	1 (1.3)	0.299
Allele 6	0 (0.0)	0 (0.0)	
Allele 7	2 (1.0)	2 (2.6)	0.305
Whole distribution			0.175
<i>IRF-1</i>			
Allele 1	49 (24.5)	23 (30.3)	0.359
Allele 2	81 (40.5)	32 (42.1)	0.891
Allele 3	2 (1.0)	0 (0.0)	1.000
Allele 4	0 (0.0)	0 (0.0)	
Allele 5	12 (6.1)	5 (6.6)	0.787
Allele 6	42 (21.2)	12 (15.8)	0.397
Allele 7	14 (7.0)	4 (5.3)	0.787
Whole distribution			0.843

The whole distributions of alleles between patients and controls were evaluated by two-sided Fisher's exact test for 2x7 table.

反応により抗体産生が誘導されウイルス抗原提示が減少した結果、感染細胞が免疫システムから認識されにくくなる可能性がある¹⁰⁾。したがって SSPE 患者にみられた遺伝的な Th2 優位性は、Th1 反応の抑制および抗 MV 抗体の産生増強により、MV の持続感染および SSPE 発症へ関与している可能性が考えられる。

前回の研究⁸⁾で MV 特異的 IFN γ 産生能の低下を認めた症例のサイトカイン遺伝子多型を今回検討したところ、MV 特異的 IFN γ 産生能や SSPE の進行と遺伝子多型の間には相関はなかった。したがって SSPE 発症後は他の遺伝的、あるいは非遺伝的要因が MV 特異的 IFN γ 産生能の低下や SSPE の進行に関与していると考えられた。

早期に麻疹に罹患した方が SSPE を起こすリスクが高いため、免疫能の未熟性が SSPE 発症に関与すると考えられている。同様のことは B 型肝炎ウイルスの持続感染でも認められる¹¹⁾。このようなトランスは単に免疫の未熟性だけでなく Th2 優位への誘導とも関係している¹²⁾。2 歳以降に麻疹に罹患した SSPE 患者 5 例うち、4 例が IL-4 promoter -589T アレルのホ

モ接合、1例がヘテロ接合であった点は興味深い。このように免疫の未熟性があるものや Th2 優位に誘導する遺伝子多型を持つものでは、MV 感染中あるいは感染後に誘導される Th2 反応によって十分にウイルスを排除できず持続感染を起こすのかもしれない。

結 論

宿主の遺伝的要因が SSPE 発症に関与することが初めて示唆された。日本とは異なった遺伝的、環境的背景をもつ他国においても、宿主の遺伝的要因を検討する必要がある。

文 献

- 1) Gascon GG: Subacute sclerosing panencephalitis. *Semin Pediatr Neurol* 3: 260-269, 1996
- 2) Schneider-Schaulies J et al: Measles virus in the CNS: the role of viral and host factors for the establishment and maintenance of a persistent infection. *J Neurovirol* 5: 613-622, 1999
- 3) Kai C et al: Nucleotide sequences of the M gene of prevailing wild measles viruses and a comparison with subacute sclerosing panencephalitis virus. *Virus Genes* 12: 85-87, 1996
- 4) Ewan PW, Lachmann PJ: Demonstration of T-cell and K-cell cytotoxicity against measles-infected cells in normal subjects, multiple sclerosis and subacute sclerosing panencephalitis. *Clin Exp Immunol* 30: 22-31, 1977
- 5) Dhib-jalbut S et al: Impaired human leukocyte antigen-restricted measles virus-specific cytotoxic T-cell response in subacute sclerosing panencephalitis. *Ann Neurol* 25: 272-280, 1989
- 6) Hara T et al: Measles virus-specific T helper 1/T helper 2-cytokine production in subacute sclerosing panencephalitis. *J Neurovirol* 6: 121-126, 2000
- 7) Rosenwasser LJ et al: Promoter polymorphisms in the chromosome 5 gene cluster in asthma and atopy. *Clin Exp Allergy* 25(Suppl 2): 74-78, 1995
- 8) Nakao F et al: Association of interferon- γ and interferon regulatory factor-1 gene polymorphisms with childhood atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* (in press)
- 9) Griffin DE et al: Pathogenesis of measles virus infection: an hypothesis for altered immune responses. *J Infect Dis* 170(Suppl 1): 24-31, 1994
- 10) Fujinami RS, Oldstone MB: Alterations in expression of measles virus polypeptides by antibody: molecular events in antibody-induced antigenic modulation. *J*

Immunol 125: 78-85, 1980

11) Overall JC Jr. Viral infections of the fetus and neonate. In: Feigin RD, Cherry JD, eds. *Textbook of Pediatric Infectious Diseases*. Tokyo: WB Saunders: 856-892, 1998

12) Ridge JP et al: Neonatal tolerance revisited: Turning on newborn T cells with dendritic cells. *Science* 271: 1723-1726, 1996

ELISPOT法を使ったヒト多発筋炎特異的細胞エピトープ同定の試み

河内 泉¹、田中 恵子¹、田中 正美²、辻 省次¹

目的

ヒト多発筋炎 (Polymyositis; PM) は、非壊死筋線維を活性型 CD8 陽性 T 細胞が取り囲むように浸潤していること¹⁾、更に筋組織浸潤 CD8 陽性 T 細胞は、培養自己分化筋細胞に対して細胞傷害活性を有すること²⁾から、細胞傷害性 CD8 陽性 T 細胞による筋細胞傷害が病態形成機序として推測されているものの、T 細胞エピトープ及び、自己標的抗原さえも解明されていない。そこで、昨年、我々は自己標的抗原同定目的に、強力な細胞傷害活性を誘導する樹状細胞を使い、ヒト HLA A*2402 多発筋炎のモデル動物を作成した³⁾。当モデルは、MHC class I 結合 motif を有し、比較的骨格筋に多数存在するペプチドを候補とし、樹状細胞に呈示させることで、実験的筋炎 (EAM) を誘導した系である。実際には、ヒト HLA A*2402 と同一結合モチーフである H-2K^d を有す BALB/c mice に Pyruvate kinase M1/M2 peptide を樹状細胞に呈示させたもので EAM を作成することができた。そこで、今回、同ペプチドが実際にヒト HLA A*2402 多発筋炎患者の標的自己抗原の候補になり得るか ELISPOT 法を使って検討した。

方法

既報³⁾に従い、Ten-day IFN- γ ELISPOT 法を行った。HLA A*2402 を有す PM 患者より同意を得、末梢血単核球 (PBMC) を分離し、同ペプチドと共培養する。8日後、同一患者から採取した PBMC を使い、ペプチドで再刺激し、更に1日培養する。次に ELISPOT 法で IFN- γ 産生リンパ球を算定する。Triplicate で検討し、 10^6 細胞中の IFN- γ 産生細胞数 (spot-forming cells; SFC) として定量化した。ペプチドの有無で IFN- γ 産生細胞数に有意な差 (Mann-Whitney 検定) が存在したものを、ペプチド特異的リンパ球が存在すると推測した。尚、症例間では、ペプチド非存在下での SFC を subtraction して比較し、疾患群間で one-way ANOVA 解析をした。今回、疾患対照としては、同 HLA (HLA A*2402) を有する寛解期の筋無力症患者及び MCTD 患者とした。また、使用したペプチドは

Pyruvate kinase M1/M2 peptide (LYRGIFPVL), Sodium channel protein skeletal muscle alpha-subunit (MYLYFVIFIIIF) とした。

更に、HLA A*2402 を有す PM 及び MCTD 患者において、疾患活動期 (未治療) の時点で採取した筋生検組織より、RNA を抽出し、family RT-PCR 法の後、subcloning し、TCR V β 13.1 遺伝子 CDR3 領域の塩基配列を決定し、そのパターンも合わせ解析し、ELISPOT 法と共に考察を加えた。

結果

1. 臨床症例結果

ELISPOT 法に関しては、HLA A*2402 を有す PM 4 名、MCTD 2 名、重症筋無力症 (Myasthenia gravis; MG) 3 名を対象とした。尚、PM 患者に関しては全例治療中である為、可能な限り罹病期間の短い症例を対象とした (表 1)。TCR 遺伝子解析に関しても、同様に HLA A*2402 を有する PM 3 名 (うち 1 名は ELISPOT 法対象症例)、MCTD 1 名 (ELISPOT 法対象症例) を対象とし、疾患活動期の生検筋組織を使用した。

2. IFN- γ ELISPOT 法

2.1. Pyruvate kinase M1/M2 peptide 反応性 T 細胞についての検討

HLA A*2402 を有す PM 患者の半数 (4 名中 2 名) で、各症例において、ペプチド特異的リンパ球の存在を認めた。尚、HLA A*2402 を有す MCTD 及び MG 患者には、有意に反応するリンパ球を認めなかった。(図 1)

2.2. Sodium channel protein skeletal muscle alpha-subunit peptide 反応性 T 細胞についての検討

HLA A*2402 を有す PM 患者の半数 (4 名中 2 名) で、ペプチド特異的リンパ球を認めた。尚、同陽性症例は、前述の pyruvate kinase M1/M2 peptide に反応しない症例であった。また、HLA A*202 を有す MCTD 患者 1 名でも、反応リンパ球を認めたが、MG 患者全例では有意に反応するリンパ球を認めなかった (図 2)

2.3. 疾患群での検討

Pyruvate kinase M1/M2 peptide 及び Sodium channel skeletal muscle peptide 両者において (特に前者において)、PM 群では、疾患コントロールである MG 群に比較して、SFC が高い傾向にあったが、有意差を見出すことができなかった。検討症例数が少ないことも影響してい

¹ 新潟大学脳研究所神経内科

² 国療西新潟中央病院

ると考えられる (図3及び図4)。

3. 筋組織浸潤T細胞受容体解析

HLA A*2402を有するPM全てで、VB13.1鎖を有するT細胞のCDR3領域に、優位に出現するcloneが得られ、oligoclonalにT細胞が浸潤していることが推測された。一方、MCTDでは、優位に出現するcloneは得られず、polyclonalな出現様式をとることが推測された。更に、PMでは、JB鎖が比較的限定して出現し、CDR3領域に特定のモチーフ構造 (G-X-GSG, YS-XXX-G, G-XX-G) が認められることから、PM筋組織では、T細胞はantigen-drivenな形式で標的臓器内に浸潤し、更にその標的自己抗原は、比較的均一であることが推測された (表2及び表3)。また、今回ELISPOT法で解析した症例で、HLA A*2402 PM (case: MT) は、pyruvate kinase M1/M2 peptide 特異的リンパ球が存在し、かつTCR CDR3領域の検討からoligoclonal expansion, すなわち比較的均一な抗原の存在が推定できた。逆にHLA A*2402 MCTD (case: IK) は、今回使用したpeptideに反応するリンパ球は存在しなかったことは、TCR CDR3解析でpolyclonalな浸潤形態を呈することに対応すると考えられる。

考察

昨年、我々は、ヒトHLA A*2402 PMのモデル動物である樹状細胞移植モデルを樹立した。このモデルは以下の特徴を有す。第一に、従来、横紋筋である骨格筋を標的に免疫誘導する困難性 (非常に巨大で多核細胞であること、human IAP like molecule⁹⁾が表出していること等のため) から、EAMの誘導は難しいとされ、T細胞が認識する抗原ペプチドの同定、アミノ酸や分子レベルの解析が困難であったが、我々のモデルは分子レベルでの抗原解析の一助になる可能性を有すこと。第二に、樹状細胞移植が、実験的自己免疫動物モデル (実験的自己免疫性糖尿病モデル¹⁰⁾、実験的アレルギー性脳脊髄炎¹¹⁾、実験的傍腫瘍症候群 (心筋炎¹²⁾) を誘導し得ることが知られており、当モデルも自己免疫性疾患に樹状細胞が関与する可能性を示したこと。第三に、依然として未同定であったPM標的自己抗原候補に、pyruvate kinase M1/M2の可能性を示唆したこと。以上から、今年度は、同ペプチドがヒトPMの標的抗原である可能性を探るべく解析を開始した。

マウスに筋炎惹起性を呈したpyruvate kinase M1/M2 peptideに反応しIFN- γ を産生するリンパ球は、HLA A*2402 PM症例の中で半数存在した。この事実は、同peptideがヒトHLA A*2402 PMにおいても、標的自己抗原の可能性があること、更に同ペプチドがT細胞エピト

ープになりうるということが推測された。一方で、今回解析に使用した検体採取が疾患寛解期であることから、単にepitope spreadingの結果を見ている可能性もある。今後は、ペプチド反応性リンパ球を単離し、TCR解析等から、筋組織内に浸潤しているT細胞との関連を解析する方針である。また、今後、検討症例数及びペプチドの候補を増やし、検討する必要性もある。

文献

- 1) Arahata K. & Engel A.G. : Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies. I: Quantitation of subsets according to diagnosis and sites of accumulation and demonstration and counts of muscle fibers invaded by T cells. *Ann. Neurol.*, **16**:193, 1984.
- 2) Arahata K. & Engel A.G. : Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies. IV: Cell-mediated cytotoxicity and muscle fiber necrosis. *Ann. Neurol.*, **23**:168, 1988.
- 3) Lemoine N.R., Ryan J.F., Cox E.L., et al. : Immunohistochemical analysis of mononuclear cell subsets in inflammatory and non-inflammatory myopathies. *J. Clin. Pathol.*, **39**:271, 1986.
- 4) Behan W.M., Behan P.O., Durward W.F., et al. : The inflammatory process in polymyositis: monoclonal antibody analysis of muscle and peripheral blood immunoregulatory lymphocytes. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **50**:1468, 1987.
- 5) Hohlfeld R. & Engel A.G. : Coculture with autologous myotubes of cytotoxic T cells isolated from muscle in inflammatory myopathies. *Ann. Neurol.*, **29**:498, 1991.
- 6) 河内 泉, 田中恵子他: Pyruvate kinase M1/M2 peptideはHLA A*2402ヒト多発筋炎の原因となる候補ペプチドである。平成11年度免疫神経疾患に関する調査研究班研究報告書, 116, 2000.
- 7) Fiorillo M.T., et al. : CD8+T-cell autoreactivity to an HLA-B27-restricted self-epitope correlates with ankylosing spondylitis. *J. Clin. Invest.*, **106**:47, 2000.
- 8) McCutcheon M., et al. : A sensitive ELISPOT assay to detect low-frequency human T lymphocytes. *J. Immunol. Methods.*, **210**:149, 1997.
- 9) Li M. & Dalakas M.C. : Expression of human IAP-like protein in skeletal muscle: a possible explanation for the rare incidence of muscle fiber apoptosis in

T-cell mediated inflammatory myopathies. J. Neuroimmunol., 106:1, 2000.

10) Ludewig B., Odermatt B., Landmann S., et al. :Dendritic cells induce autoimmune diabetes and maintain disease via de novo formation of local lymphoid tissue. J. Exp. Med., 188:1493, 1998.

11) Dittel B.N., Visintin I., Merchant R.M., et al. :Presentation of the self antigen myelin basic

protein by dendritic cells leads to experimental autoimmune encephalomyelitis. J.

Immunol., 163:32, 1999.

12) Ludewig B., Ochsenein A.F., Odermatt B., et al. :Immunotherapy with dendritic cells directed against tumor antigens shared with normal host cells results in severe autoimmune disease. J. Exp. Med., 191:795, 2000.

Case	age / gender	duration	treatment
HLA A24 PM			
T.S.	61y.o. / male	1.5 Y	PSL 10mg / CPA 60mg
A.K.	58y.o. / male	4 Y	PSL 20mg
M.T.	34y.o. / female	4 Y	PSL 14mg
H.N.	56y.o. / female	1 Y	PSL 12mg / CyA 150mg
HLA A24 MCTD			
I.K.	47y.o. / female	6 Y	PSL 12.5mg / MTX
K.T.	43y.o. / female	5 Y	PSL 10mg
HLA A24 MG			
T.M.	61y.o. / female	8 Y	PSL 2mg
S.E.	72y.o. / man	10 Y	PSL 7.5mg
M.K.	64y.o. / man	6 Y	PSL 0mg

表 1 ELISPOT assay 対象症例臨床結果

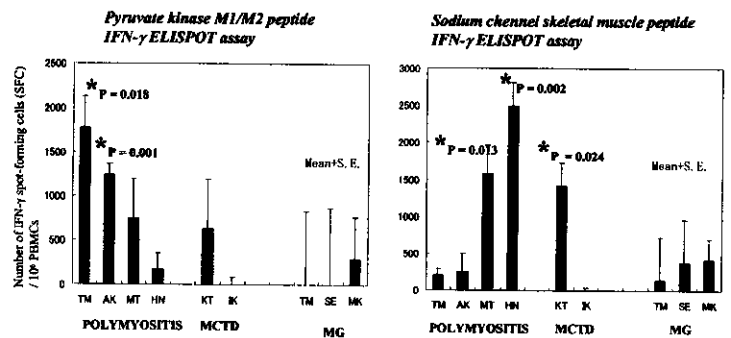


図 1 Pyruvate kinase M1/M2 peptide IFN-γ ELISPOT assay

図 2 Sodium channel skeletal muscle peptide IFN-γ ELISPOT assay

*p < 0.05 (Mann-Whitney test) (peptide存在下と非存在下のSFCを比較)

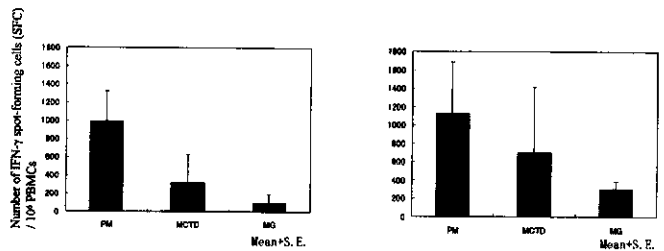


図 3 Pyruvate kinase M1/M2 peptide IFN-γ ELISPOT assay 疾患群間検討

図 4 Sodium channel skeletal muscle peptide IFN-γ ELISPOT assay 疾患群間検討

Amino acid sequence of the CDR3 region of TCR Vβ13.1 human POLYMYOSITIS / muscle infiltrating T cells

POLYMYOSITIS (pt. 1 HLA A*2402/2402)						
VB family	VB	DB	JB family	JB	Cβ	No.
13.1	FCAS	SPLGQSG	ELFDGEG	2.2	2	3/12 (25%)
13.1	FCAS	TYRWD	SGNTYFQSGS	2.1	1	2/12 (17%)
13.1	FCAS	YVVRADT	QYFQPTRL	2.3	2	2/12 (17%)
13.1	FCAS	KVS	SYNEQFFQPG	2.1	2	2/12 (17%)
13.1	FCAS	SKTGEP	YNEQFFQPGT	2.1	2	1/12
13.1	FCAS	SFSGAS	SYNEQFFQPG	2.1	2	1/12
POLYMYOSITIS (pt. 2 HLA A*2402/2402)						
13.1	FCAS	SRGSRNF	DEQFFQPGY	2.1	2	9/24 (38%)
13.1	FCAS	SGFLGLAAG	EQFFQPG	2.1	2	6/24 (25%)
13.1	FCAS	SGQEVGY	GYTFGSTR	1.2	1	6/24 (25%)
13.1	FCAS	BEQYA	YEYFQPTRL	2.7	2	4/24 (17%)
POLYMYOSITIS (pt. 3 HLA A*2402/2402)						
13.1	FCAS	SYRMOQGGQ	TDTQYFQP	2.3	2	4/12 (33%)
13.1	FCAS	RYRKGAD	NYFQAGTR	2.3	2	4/12 (33%)
13.1	FCAS	RLTQGGG	YQYFQSTR	1.2	1	3/12 (17%)
13.1	FCAS	RPYRGLYDEQFFQPGT		2.1	2	2/12 (17%)

< Motif : n-D-n region > 空-X-QGG 空-X-X-X-X 空-X-X-X

表 2 TCR Vβ 13.1 CDR3 アミノ酸配列 (HLA A*2402/PM)

Amino acid sequence of the CDR3 region of TCR Vβ13.1 human MCTD / muscle infiltrating T cells

MCTD / BK (HLA A*2402/3191)						
VB family	VB	DB	JB family	JB	Cβ	No.
13.1	FCAS	RL	EAFFQGGTRL	1.1	1	2/17
13.1	FCAS	PFADLQ	NRQY	2.4	2	1/17
13.1	FCAS	AYRBAF	YQELFF	2.2	2	1/17
13.1	FCAS	KWTRSRHS	YNSP	1.8	1	1/17
13.1	FCAS	SGPKRDRD	NQPG	2.3	1	1/17
13.1	FCAS	SEW	GELFFQENS	2.2	2	1/17
13.1	FCAS	SYRDKT	QYFQPG	2.3	2	1/17
13.1	FCAS	SYRGR	DQYFQPG	2.3	2	1/17
13.1	FCAS	SGQORQPORLHFQNG		1.8	1	1/17
13.1	FCAS	SYRNDRO	NTEAFFQG	1.1	1	1/17
13.1	FCAS	SPDQGN	EQYFQPG	2.7	2	1/17
13.1	FCAS	GEQDGRWDEQFFQPG		2.1	2	1/17
13.1	FCAS	SYFQGL	NTEAFFQGG	1.1	1	1/17
13.1	FCAS	SEAGAYN	EQFFQPG	2.1	2	1/17
13.1	FCAS	SYRQDD	EQFFQPG	2.1	2	1/17
13.1	FCAS	SYWTH	TEAFFQGG	1.1	1	1/17

表 3 TCR Vβ 13.1 CDR3 アミノ酸配列 (HLA A*2402/MCTD)

神経変性疾患における免疫機序の関与；

CD4 bright⁺ CD8 dull⁺ T リンパ球の検討

久永 欣哉¹⁾、浅黄 美沙¹⁾、糸山 泰人²⁾、岩崎 祐三¹⁾

目 的

パーキンソン病、多系統萎縮症、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症などのいわゆる孤発性神経変性疾患の原因として酸化ストレス、ミトコンドリア機能異常、神経毒や興奮性アミノ酸の関与、遺伝的素因などと伴に、免疫異常の関与も検討されている。例えば病変部での活性化ミクログリアの増加、髄液中の HLA-DR⁺単核球の増加、末梢血における CD45RO⁺メモリー T リンパ球、CD38⁺活性化 T リンパ球、CD25⁺単核球の増加などが報告されている。

我々は昨年度、パーキンソン病患者の末梢血において、CD3⁺ CD4 bright⁺ CD8 dull⁺ T リンパ球の割合が対照者 (p=0.0054) や軽症脳血管障害患者 (p=0.0022) に比して有意に高値を示すことを報告した。カットオフ値を 1%とした場合、対照者では 1%以上が 22 中 4 人 (18%) であったのに対し、パーキンソン病患者では 40 人中 23 人 (58%) であった。これまでも CD4 bright⁺ CD8 dull⁺ T リンパ球は健康成人の一部にみられることが報告されているが、これらのリンパ球がどのような性質を示すものかは明らかでない。またパーキンソン病の病態に何らかの関与をしているのかも定かではない。

今年度は、これらの T リンパ球がどのような性格を有するのかを調べる目的で、他の様々な表面抗原の発現を 3 color-flow cytometry を用いて検討した。

方 法

前回の検討で CD3⁺ CD4 bright⁺ CD8 dull⁺ T リンパ球の割合が高値であったパーキンソン病患者 23 例のうち 7 例と新規患者 10 例より末梢血を採取し、同様に ficoll を用いて単核球を単離し、CD4 抗体-FITC および CD8 抗体-PC5 を用いて免疫染色を施し、flow cytometry により CD4 bright⁺ CD8 dull⁺ T リンパ球の割合を調べた。また、CD4 bright⁺ CD8 dull⁺ T

リンパ球が高値を示したサンプルを用いて、さらにもう一つの抗体 (CD1a、CD8β、CD16、CD25、CD26、CD28、CD38、CD45RA、CD45RO、CD54、CD56、CD95、CD124、CD126、CD154、HLA-DR) ·PE で免疫染色を施し、3 color-flow cytometry により CD4 bright⁺ CD8 dull⁺ T リンパ球におけるこれらの免疫染色性を検討した。

結 果

今回の検討では、前回の採血から 1 年 5 ヶ月ないし 2 年 1 ヶ月が経過していたが、末梢血中の CD4 bright⁺ CD8 dull⁺ T リンパ球の割合は 7 例全例がカットオフ値の 1%以上の高値を示し、年単位で高値が持続していることが示唆された。新規患者 10 例中 5 例において CD4 bright⁺ CD8 dull⁺ T リンパ球は 1%以上の高値を示し、前回同様の結果が再現性よく得られた。CD4 bright⁺ CD8 dull⁺ T リンパ球における上記 16 抗体の免疫染色の結果を表 1 に示す。特記すべきこととして、これらのリンパ球は CD45RO dull⁺ CD95 (Fas) dull⁺ で、CD25 (IL-2Rα) および CD126 (IL-6Rα) は陰性であったこと (表 1、図 1) などがあげられる。

考 察

これまで CD4⁺CD8⁺double positive T リンパ球の増加は重症筋無力症や多発性硬化症で報告されているが、その役割は明らかでない。CD4⁺CD8⁺double positive リンパ球は CD4 dull⁺ CD8 bright⁺ リンパ球および CD4 bright⁺ CD8 dull⁺ リンパ球にわけて僅かに報告されている (文献 1、2)。CD4 dull⁺ CD8 bright⁺ リンパ球は cytomegalovirus、EB virus (Epstein-Barr virus)、HTLV-1 (human T cell leukemia virus type-1)、HHV-6 (human herpes virus-6) などの感染により CD4⁻CD8 bright⁺ リンパ球が CD4 を発現して一過性 (1 ヶ月以内) に出現する細胞障害性 αβ T 細胞で、HLA-DR⁺、CD38⁺、CD45RO⁺といわれている。一方 CD4 bright⁺ CD8 dull⁺ リンパ球は健康人の一部および

1) 国立療養所 宮城病院 臨床研究部/神経内科

2) 東北大学大学院 神経内科学分野

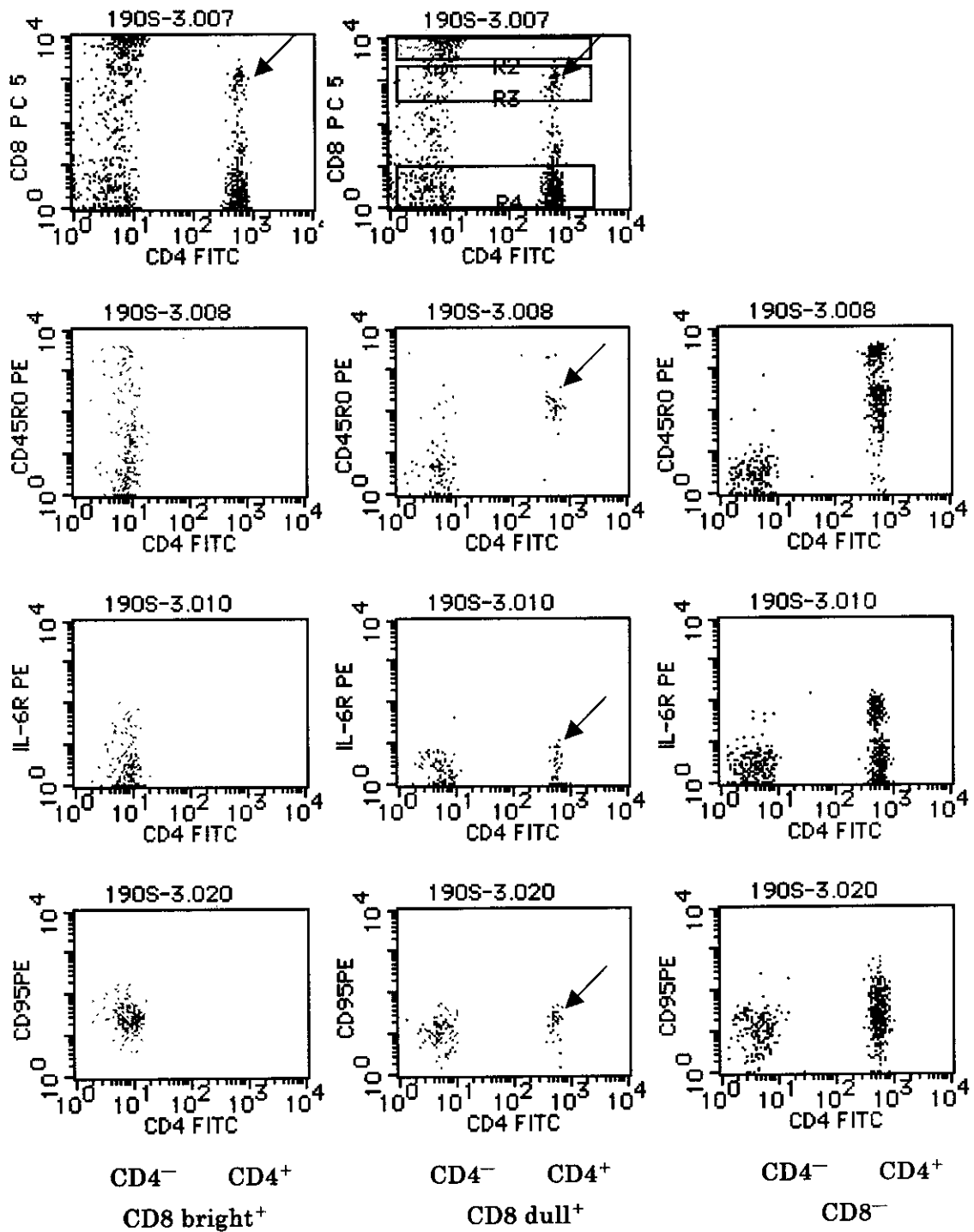


図 1. CD4 bright⁺ CD8 dull⁺ T リンパ球の 3 color-flow cytometry

1 段目左の矢印が CD4 bright⁺ CD8 dull⁺ T リンパ球。1 段目中央のように CD8 bright⁺ (上のボックス)、CD8 dull⁺ (中のボックス)、CD8⁻ (下のボックス) に分画。2 段目、3 段目、4 段目はそれぞれ CD45RO、CD126 (IL-6R α)、CD95 (Fas) との 3 重染色。それぞれ左が CD8 bright⁺、中央が CD8 dull⁺、右が CD8⁻。CD4 bright⁺ CD8 dull⁺ T リンパ球は CD45RO dull⁺、CD126⁻、CD95 dull⁺。

表 1. CD4 bright⁺ CD8 dull⁺ T リンパ球における各種抗原の免疫染色性

CD1a :	(-)
CD8 β :	(-)
CD16 :	(-) 大部分
CD25 (IL-2R α) :	(-)
CD26 :	(-) 大部分
CD28 :	(-)
CD38 :	(dull+)・(-) 混在
CD45RA :	(+) 大部分
CD45RO :	(dull+)
CD54 (ICAM-1) :	(+)
CD56 :	(+)・(-) 混在
CD95 :	(dull+) 大部分
CD124 :	(-)
CD126 (IL-6R α) :	(-)
CD154 :	(-)
HLA-DR :	(+)・(-) 混在

癌患者で長期的 (年単位) にみられる α β T 細胞で、微生物の関与など詳細は不明である。in vitro では CD4 bright⁺ CD8⁻ リンパ球も刺激により CD8 を発現して CD4⁺CD8⁺ double positive リンパ球になりうると報告されており、そのようにして出現したリンパ球である可能性もある。

今回、パーキンソン病で増加している CD4 bright⁺ CD8 dull⁺ T リンパ球は CD1a⁻ であり、胸腺で見られる未成熟な CD4⁺CD8⁺ 細胞が漏れ出したものではなく、成熟した T リンパ球であると考えられる。また、様々な抗体を用いた 3 color-flow cytometry で隣接する CD4 bright⁺ CD8⁻ リンパ球とは異なった免疫染色パターンを示し、特徴をもったリンパ球の一群であると

考えられる。特に末梢血メモリー T リンパ球のマーカーである CD45RO dull⁺ であり、活性化 T リンパ球で発現が増加する CD95 (Fas)⁺ であったことより、なんらかの免疫活性を有する T リンパ球である可能性がある。CD4 dull⁺ CD8 bright⁺ リンパ球がウイルス感染と関連していることを考慮すれば、CD4 bright⁺ CD8 dull⁺ T リンパ球もなんらかの微生物感染と関連していることも考えられる。これらのリンパ球が長期にわたって高値を示すことは、緩徐に進行するパーキンソン病の病態、特に多因子のひとつとしての微生物感染の可能性も含めて、今後研究を進めていく必要がある。

まとめ

(1) パーキンソン病患者の多くで末梢血の CD4 bright⁺ CD8 dull⁺ T リンパ球が年単位で高値を持続していることがあきらかとなった。

(2) これらの T リンパ球は CD1a⁻ CD45RO dull⁺ CD95 (Fas) dull⁺ などの性質を示し、なんらかの免疫活性をもった成熟した T リンパ球であることが示唆された。

CD4 bright⁺ CD8 dull⁺ T リンパ球は緩徐に進行するパーキンソン病の病態に多因子の一つとして関与する可能性がある。

文献

- 1) Ortolani C, et al. Cytofluorimetric identification of two populations of double positive (CD4⁺, CD8⁺) T lymphocytes in human peripheral blood. *Biochem Biophys Res Commun* 191:601-609, 1993
- 2) Rentenaar RJ, et al. CD4^{dull}CD8^{bright} double-positive T-lymphocytes have a phenotype of granzyme B^{pos} CD8^{pos} memory T-lymphocytes. *Nephrol Dial Transplant* 14:1430-1434, 1999

最近承認された神経疾患治療薬の審査プロセスと承認審査に必要な事項について

1) 吉野 英

1) 医薬品医療機器審査センターについて

血液製剤によるHIV感染訴訟の和解、ソリブジンによる薬害を契機として、医薬品等による健康被害の再発を防止するための薬事行政全般の見直しが行われ、承認審査の専門性、透明性を確保し、医薬品等の副作用に対して迅速かつ弾力的に対応できる体制を構築することとなった。従来医薬品の審査は主として調査会を中心とする外部審査で行われていたが、臨床的意義の高い医薬品についても申請から承認されるまで長い年月を要していた。

平成9年7月1日に発足した医薬品医療機器審査センターは、医薬品等の治験から承認、市販後に至る一貫した内部審査体制の充実を目指している。70名の審査官の中には医師(10名)も含まれ、癌、循環器、精神・神経をはじめとしたナショナルセンター病院などから派遣されている。

医系審査官の役割は、国内で行われている治験薬の有害事象(年間約15,000件)の検討、国内治験届け品目について被験者の安全性が確保されているかの検討、GCP評価、海外GCP査察、医薬品機構で行われる治験相談に対する臨床的観点からの助言、などである。最も重要な責務は、申請品目の臨床試験成績の評価が中心であるが、臨床的有用性に比して安全性に懸念の高い品目については不承認とする一方、とりわけ臨床的意義の高い医薬品については各専門分野担当官を中心に承認に向けて迅速に審査を進めている。

1997年7月に神経内科専門医が赴任してから申請された品目は、有効性が十分示されておらず承認困難な品目も存在する一方、ベタフェロン(多発性硬化症再発防止、伸展抑制)、タクロリムス(難治性重症筋無力症)、ベニロン(ギランバレー症候群)については申請から承認まで12ヶ月以内に短縮されている。

2) オープン医薬品審査

通常の医薬品開発では第Ⅲ相試験において一群約100症例組み入れることにより、既存治療薬に対する同等性の検証、またプラセボ対照の優越性の検証試験が行われる。しかしながらオープン医薬品の開発対象となる疾患である免疫性神経疾患、変性疾患はほとんどすべて患者数

50,000人以下の希少疾病であり、HAMをはじめ1,000人程度かそれに満たない疾患も少なくない。これらの疾患では通常の医薬品開発のように1群100名の患者数をリクルートするのは不可能な場合が多く、製薬企業にとっての開発費、リスク等から開発が敬遠されがちである。厚生省はオープン医薬品開発のインセンティブを製薬企業に与えるべく種々の制度を設けているが、対照薬の設定、プラセボ対照が困難な場合は、わが国の医療環境における当該疾患の、historical controlが重要である。例え対照群を置かないシングルアーム数本でも、生命予後をはじめ重要な臨床的評価項目において、既存治療に優ることが強く示唆されれば、承認可能な場合がある。したがって、オープン医薬品承認にとって、なるべく規模が大きく、かつ国際的にも頻要されているスコアを用いた、本邦における当該疾患の疫学調査が重要であり、かつその調査が厚生科学研究費をはじめとした公的研究事業により行われたものであれば、審査上評価に重みを置いている。

しかしながら効能効果追加の追加を含めた医薬品の承認にあたっては、あくまで薬事法上製薬会社による申請が大前提である。Pivotalな申請資料となる臨床試験については、信頼性評価、GCP査察の対象となる以上、製薬会社がスポンサーとなる必要がある。

3) 適応外使用と医学薬学上公知

「適応外使用に係わる医療用医薬品の取り扱いについて」(平成11年2月1日、研究開発振興課長・審査管理課長発)の通知により、適応外使用されている医薬品に関して、学会からの要望書、当該品目を販売する製薬企業からの申請に加え、以下の3つの場合に、「医学薬学上公知」と認められ、臨床試験の全部又は一部が省略されていても承認可能となった。

- ① 外国での承認、使用実績、承認申請資料の存在
 - ② 外国での承認、使用実績、国際的な学術雑誌の論文又は、国際機関で評価された総説等の存在
 - ③ 公的な研究事業による臨床試験成績の存在
- 国際的な学術雑誌の論文又は国際機関で評価された総説等とは、以下に掲載されたものを例に想定している。

N Eng J Med

Lancet

米国の主要な医学会の会誌

WHOの作成した診療・治療ガイドライン 等

1) 厚生労働省医薬品医療機器審査センター審査第3部
(国立精神・神経センター国府台病院神経内科併任)

審査センター設立後の「医学薬学上公知」の適用例は、未だ以下の3品目に過ぎず、適応外使用の実態の解消を図るためにも、学会からの Evidence に基づいた要望を出していただくことを期待している。

シスプラチン（骨肉腫、小細胞肺癌。日本癌治療学会）

カルボプラチン（非小細胞肺癌。日本癌治療学会）

アスピリン（下記疾患における血栓・塞栓形成の抑制：狭心症（慢性安定狭心症、不安定狭心症）、心筋梗塞、虚血性脳血管障害（一過性脳虚血発作(TIA)、脳梗塞）。冠動脈バイパス術(CABG)あるいは経皮経管冠動脈形成術(PTCA)施行後における血栓・塞栓形成の抑制。日本循環器学会及び日本脳卒中学会）

全身型重症筋無力症拡大胸腺摘出術に対する

術前ステロイド投与の有用性についての検討

服部 孝道¹⁾ 川口 直樹

根本 有子 宗像 紳 吉山 容正 新井 洋

目的

重症筋無力症 Myasthenia gravis (MG) の自己免疫性受容体病としての機序が明らかになるにつれ、治療の原則も従来の抗コリンエステラーゼ剤による対症療法から免疫療法が中心となっている。すなわち早期からの副腎皮質ステロイド剤導入、拡大胸腺摘出術 (Extended thymectomy: ET)、血液浄化療法 (血漿交換・免疫吸着療法)、アザチオプリン、タクロリムスをはじめとする免疫抑制剤の併用などが積極的に施行されている。全身型 MG に対する ET の有用性は示されているが¹⁾、術後の MG 症状の悪化に苦慮することが稀でない。我々は、術前にステロイドを導入することにより抗アセチルコリン受容体抗体の産生を抑制し、アセチルコリン受容体機能の安定化を図ることから術後増悪を予防出来るものと考え、初期増悪を予防する目的で少量からプレドニゾロンを開始し、徐々に投与量を増やして隔日 100mg まで増量して ET を施行するステロイド漸増法、二重濾過による血漿交換を 1 回施行した翌日から 80-100mg のプレドニゾロンを隔日に開始し、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てから ET を施行するステロイド血漿交換併用療法のいずれかを行い、漸増法により約 80% の緩解を得²⁾、併用療法によっても同等の治療効果を得ている。この 2 群に術前治療を行わずに ET を行う直接法を加え、3 群間でステロイド術前導入の妥当性について検討した。

対象および方法

1991 年 4 月から 2000 年 10 月までに当院に入院し ET を施行した全身型 MG 50 症例 (平均年齢 42.9 ± 15.0 歳、男性 18 例、女性 32 例) について retrospective に検討した。術前治療の有無による周術期の症状増悪、術後経過、発症から手術までの期間、ステロイド導入による問題点などを比較した。重症度分類は MGFA の臨床分類³⁾を用いた。

結果

患者背景において併用法では重症例が多く、発症後から ET に至るまでの期間は直接法が一番短時間で ET を施行でき、ついで併用法、漸増法の順だった (表 1)。

表 1. 患者背景

	漸増法(n=26)	併用法(n=11)	直接法(n=13)
年齢(歳)	39	48.3	49.3
性比(男/女)	12例/14例	2例/9例	4例/9例
治療前重症度	2	3.1	1.9
手術前期間(月)	14.1	10.7	4.5

各治療法における平均重症度の推移に関して、ET 前後の重症度変化の 3 群間の検討で有意差を認め(Kruskal-Wallis test, $p=0.0226$)、直接法においてのみ術後増悪していた (表 2)。術後の経過 2 年での重症度における有意差は認められないが、ステロイド使用群の約 50% に寛解を認める一方でステロイドを使用しない群での寛解例は殆ど得られなかった。

表 2. 経過 (n=症例数)

治療法	術前重症度	術後2ヶ月	術後1年	術後2年
漸増法	2.0(n=26)	1.5(n=22)	1.0(n=21)	1.0(n=21)
併用法	3.1(n=11)	2.1(n=11)	1.4(n=9)	0.7(n=21)
直接法	1.9(n=11)	2.5(n=11)	1.4(n=8)	1.5(n=4)

球症状を伴う群では伴わない群と比べ術後増悪を来しやすい傾向にあり、直接法ではごく軽症例を含め、球症状を有す 4 例全例で術後増悪を来し、内 2 例は集中治療室管理を要した。一方、ステロイド術前投与を行った 2 群では術後増悪を示す例を約 1/3 まで有意に抑制でき($p=0.0290$)、ステロイド術前投与の有用性が示された (表 3)。

表 3. 球症状を有する群の術後増悪

	増悪あり	増悪なし
漸増法	7	15
併用法	3	7
直接法	4	0

¹⁾ 千葉大学医学部神経内科

ステロイド導入に伴う初期増悪の出現率は併用群と比べて漸増群で有意に高かったが($p=0.039$)、両群とも臨床的には極く軽度の悪化にとどまり問題となることは無かった。症状安定に要する期間は漸増法で約6週間、併用法で約2週を要した。

しかし、加療を必要とするステロイドの主要な副作用は導入6ヶ月以内の早期に既に18.9%の症例に出現した。ステロイドは2-3年の投与に及ぶ症例が多く、総投与期間中に35.1%の症例に副作用が認められた。特に耐糖能異常を27.0%、骨粗鬆症13.5%と高率に認められた。

考察

ステロイド術前投与は胸腺摘出術後のクリーゼを減少させ¹⁾、さらに術後の維持療法によって易疲労性をほぼ消失させ、術後2-6ヶ月以内に社会生活を可能にする⁴⁾ことが知られている。今回の結果と併せて検討すると拡大胸腺摘出術周術期の管理において、軽症であっても球症状が存在すればステロイド術前投与を積極的に検討することが望ましいと考えられる。ステロイド血漿交換併用法はステロイド導入時の初期増悪が少なく、ステロイド導入から手術までの期間を短縮することが出来るため、球症状があっても早期に手術したい症例などには積極的な導入も考えられる。しかし医療費は高額となり、これまで感染などの副作用の出現を認めてはいないが、著明な免疫抑制状態となることが危惧される。

さらには術後のステロイド維持療法をいつまで続けるべきか問題となる。本療法は副作用の出現率が低いとはいえないが、MG症状を寛解に導くためには有力な治療であり、継続にあたっては慎重な検討を症例毎に要する。今後の症例の集積、長期予後の観察が必要であり、更には全国的な治療の実情の把握・分析およびprospective study施行により、より適切なMG治療法確立が必要であると思われた。

まとめ

拡大胸腺摘出術を施行した全身型重症筋無力症症例を対象に、ステロイド術前治療の有無による周術期の症状増悪、術後経過、発症から手術までの期間、ステロイド導入による問題点などを比較検討した。

- (1) ステロイド術前投与により術後増悪は減少した。
- (2) ステロイド術前投与をしない場合、球症状は術後増悪を来す危険因子だった。
- (3) 発症から拡大胸腺摘出術にいたるまでの期間は術前治療により延長した。
- (4) ステロイド投与による主要な副作用は症例中35.1%に認められた。

文献

- 1) Gronseth GS, Barohn RJ: Practice parameter: Thymectomy for autoimmune myasthenia gravis (an evidence-based review); Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology, *Neurology* 2000;55:7-15
- 2) 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・胸腺摘除併用法の長期効果. *神経治療* 1995;12:437-443
- 3) Task Force of the Medical Scientific Advisory Board of the Myasthenia Gravis Foundation of America; Jaretzki III A, Barohn RJ, Ernstoff RM et al.: Myasthenia gravis: Recommendations for clinical research standards, *Neurology* 2000;55:16-23
- 4) 平山恵造, 伊藤直樹, 小宮山 純: 重症筋無力症のステロイド・胸腺摘除併用法—とくにステロイド術前・術後投与を中心に—. *神経進歩* 1986;30:160-171

胸腺摘出に抵抗する難治性重症筋無力症に対する免疫抑制療法

サイクロスポリンA長期投与の可能性と安全性に関する報告

奥村明之進¹⁾ 三好新一郎¹⁾ 松田 暉¹⁾ 藤井 義敬²⁾

目的

重症筋無力症(MG)治療における胸腺摘出術の意義は確立しており、現在最も一般的な術式である胸骨正中切開下の拡大胸腺摘出術により90%近い奏効率が得られることが既に報告されている。

しかしながら、拡大胸腺摘出術後も症状の改善が得られず、プレドニンの大量経口投与、繰返すステロイドパルス療法、血漿交換を必要とする、いわゆる難治性重症筋無力症も10%前後に認められる。

ステロイド剤の長期使用には、骨粗鬆症・糖尿病・胃潰瘍・組織の脆弱化・創傷治癒遅延・精神症状・満月様顔貌などの種々の副作用が出現し、ステロイドパルス療法の場合には治療直後の一過性増悪に対する呼吸管理が必要となることもあり、クリーゼの発生とその対処のため約3週間程度の入院が必要となる。加えて、重症例では効果が3、4ヶ月しか継続しないこともしばしばである。同様に、血漿交換療法の効果も一過性であることが多い。従って、これらに替わる治療法の導入が必要となる。

胸腺摘出術が無効で、大量のプレドニンを必要とするか、ステロイドパルス療法を頻回に必要とする、いわゆる難治性重症筋無力症に対し、当科では1993年以来、サイクロスポリンA(CsA)を中心とする免疫抑制療法を施行してきたので、当科での経験をもとにCsAの効果と長期投与の可能性・安全性に関して検討する。

対象と方法

拡大胸腺摘出術の施行後も症状が継続し、プレドニンを25mg/2日以上以上の投与が必要となったか、ある

1) 大阪大学大学院医学系研究科 機能制御外科学(第一外科)

2) 名古屋市立大学第2外科

いは頻回のステロイドパルス療法を必要とした症例(11例)、プレドニンの開始・増量を拒否した症例(2例)の計13例(男性5例、女性8例、胸腺腫合併は7例)に対して、CsAによる免疫抑制療法を施行した。各患者に対しては、副作用の説明と、CsAがMGに対する保険診療適応外であり大阪大学の研究校費による診療となることを説明の上、CsAの投与および研究への同意を得た。CsAの投与量は3~5mg/kg/日を目安とし、血中CsA濃度をTrough値で80~160ng/mlの維持を目標とした。1ヶ月に一度、外来診察により握力測定、眼症状・球麻痺症状の評価、末梢血液像・生化学的検査・尿検査・抗アセチルコリンレセプター抗体(抗AchR抗体)価の測定を行なった。

結果

対象症例13例中、7例が現時点で2年以上、最長7年7ヶ月の長期のCsA投与を受け、現在も継続している。7例の治療期間と投与量、血中濃度を表1に示す。

表1. CsAの投与期間、投与量と血中濃度

症例	CsAの投与期間	投与量(mg/day)	血中濃度(Trough, ng/ml)
1	7年7ヶ月	250	150
2	4年4ヶ月	150	80
3	3年2ヶ月	225	100
4	2年10ヶ月	150	120
5	2年4ヶ月	150	100
6	2年2ヶ月	150	100
7	2年1ヶ月	150	130

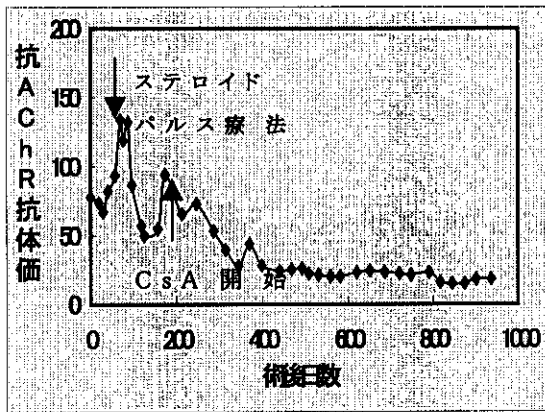


図1. CsAによる免疫抑制療法後の抗AchR抗体価の推移（代表的症例の経過）

代表的な一症例（症例6）の経過を紹介する。症例6は、胸腺腫合併重症筋無力症(Osserman IIB)の診断のもと、1998年3月当院にて胸腺腫摘出を含む拡大胸腺摘出術を受け、肺への浸潤を伴う正岡分類Ⅲ期症例であったため放射線治療を施行された。その後、抗AchR抗体価の上昇と全身の脱力が著明となったため、プレドニンの内服を開始しステロイドパルス療法を施行した。退院後、再度、全身脱力が再燃し、プレドニンを増量、隔日投与6錠でも脱力の改善が十分に得られなかったため術後6ヶ月目、CsAの投与(150mg/日)を開始した。本症例の経過と抗AchR抗体価の推移を図1に示す。

本症例においては、CsAの血中濃度(Trough level)は80~120で維持され、抗AchR抗体価の低下と症状の改善を認めた。またこの間、入院治療を必要とせず外来診療にて管理が可能であった。

表2に、上記症例を含めた7例の診療経過をまとめた。

7例中、症例1から6までの6例で自覚症状の改善と繰り返す入院加療からの離脱を達成した。また、これら6例中5例でプレドニンの減量が可能であり、抗AchR抗体価陽性の5例中4例で明らかな抗体価の減少を認めた。症例4でCsA投与開始後2年10ヶ月の現在、抗AchR抗体価の上昇を認めている。この症例はCsA投与前にはプレドニン隔日12錠投与から隔日11錠投与への減量も困難であったが、CsA開始後、隔日8錠投与まで漸減しえた1年6ヶ月の時点で抗AchR抗体価も37まで著明に低下した。その後、プレドニン隔日6錠投与までさらに減量したとこ

表2. CsA投与後の臨床経過

症例	プレドニン (T/2日)		抗AchR 抗体価		MG score	
	前	後	前	後	前	後
1	3	1	44	27	11	5
2	5	5	0	0	10	8
3	3	2	60	16	12	8
4	12	7	89	110	11	8
5	8	4	92	30	10	6
6	6	5	94	18	13	7
7	0	1	2	6	8	10

ろ、抗体価の再上昇が認められた。従って、症例4における抗AchR抗体価の上昇は、性急なプレドニン減量によるものと思われる。症例7においても、抗AchR抗体価の上昇が認められているが、これはCsA投与前の抗AchR抗体価が免疫吸着療法により一時的に抗体価の減少していた時点の検査結果であるためと思われる。本症例では、呼吸困難により入院を繰り返していたが、CsA投与により呼吸困難発作から開放され、家事も可能となりQuality of lifeの明かな改善が得られている。

上記の長期投与7例で、副作用として2例に軽度の上部消化管症状、1例に高血圧の出現を見たため投薬治療を追加した。最も危惧される副作用である腎機能障害に関しては、現時点の血清クレアチニン値は、2年以上の長期投与7例全例で1.0以下であり、腎機能は正常であった。1例で帯状疱疹が出現したが、抗ウイルス薬にて治癒した。また、重篤な日和見感染の発症はなかった。胸腺腫合併症例では、現時点で腫瘍再発を認めていない。

上記7例以外の6症例の経過は以下のとおりであった。2例が気分不良のため、1例が手指振戦の出現のため1ヶ月以内にCsA投与を中止した。1例で効果無く、9ヶ月で中止した。さらに1例で、強い胃炎症状のため1年2ヶ月で中止、1例で気管支炎を契機として発症したクリーゼに対し呼吸管理を必要としたため1年6ヶ月で中止した。

考 察

サイクロスポリンA(CsA)は、細胞内でカルシニューリンの機能を抑制することが知られており、この働きを通

じて T リンパ球内では抗原受容体からのシグナルをブロックすることにより Interleukin-2 産生を抑制し、リンパ球の活性化を抑制すると考えられている。

CsA は臓器移植後の免疫抑制を目的として開発された薬剤であり移植後の拒絶反応抑制におけるその効果は既に広く認められているが、1980 年代後半から自己免疫疾患への応用も試みられてきた。現時点では、乾癬、ベーチェット病、赤芽球癩などの自己免疫疾患に対して既にその効果が認められており、保険診療も認可されている。

CsA の重症筋無力症治療への応用も 1980 年代後半に既に始まっており、Tindall らは重症筋無力症の初期治療として CsA を投与し double blind randomized study によってその有効性を報告している (New England Journal of Medicine, 1988)。しかしながら Tindall らの報告における設定は、重症筋無力症の標準的治療法である胸腺摘出術を施行された患者が含まれていないという点で、重症筋無力症の臨床の実際と比して現実的とは言い難い。また、投与期間が最長 1 年と比較的短期間であり長期投与に伴う副作用の評価はなされておらず、その安全性についても未だ不明である。

今回の我々の研究の目的の一つは、胸腺摘出後も症状の改善が得られない、いわゆる難治性重症筋無力症に対する CsA の効果を明らかにすることである。

難治性重症筋無力症症例 13 例に CsA が投与され

その内 10 例において 9 ヶ月以上の期間で投与されており、これら 10 例中 9 例 (90%) において有効であり、すなわち、胸腺摘出が奏効しない難治性重症筋無力症においても CsA の効果が確認された。

本研究のもう一つの目的は長期投与に伴う副作用・安全性を明かにすることである。上記の 9 例中 1 例において、対処困難な上腹部痛のために CsA を中止したが、2 年以上の長期投与 7 例では対処不可能の重篤な合併症・副作用の出現は認められなかった。気管支炎を契機としてクリーゼとなり CsA を中止した症例においても、感染症の重篤化はなかった。また重篤な日和見感染は認められていない。

以上より、難治性重症筋無力症に対する CsA を用いた免疫抑制療法は、長期投与においても重篤な副作用の出現はなく、かつ臨床効果を得ることが期待できる優れた治療法であることが示唆された。

まとめ

13 例の難治性重症筋無力症に対して CsA による免疫抑制療法を経験し、7 例において 2 年以上の長期投与が可能であった。これら 7 例では、ステロイドの減量・入院の回避など、Quality of life が得られ、その有効性が示唆された。また長期投与の 7 例において重篤な副作用の出現は無く、CsA による免疫抑制は血中濃度などの厳重な monitoring のもとに、長期にわたっても安全に施行可能であることが示唆された。

新規免疫抑制剤 FTY720 による EAMG モデルの治療的研究

吉川 弘明¹⁾ 岩佐 和夫²⁾ 安川 善博²⁾ 山田 正仁²⁾

目的

重症筋無力症 (MG) は、神経筋接合部のアセチコリン受容体 (AChR) を標的とした自己免疫疾患であり、MG 患者体内では抗 AChR 抗体 (AChRab) が、持続的に産生されている [1]。その治療には、大きくわけて AChR 破壊による神経筋伝達障害を改善させるものと、AChRab の産生を抑えるものがあるが、治療の根本となるのは AChRab 産生を抑える免疫療法となる [2, 3]。近年、胸腺摘出術とステロイド治療の導入により、MG の予後は大幅に改善した。しかし、当班の過去の調査によると ADL が中等度以上に障害されている患者は女性 22.0%、男性 13.4% で、QOL が満足されていない患者は女性で 28.2%、男性で 18.7% とされている [4]。この結果が示すように、MG の治療は未だ満足いくものとは言えないのが現状である。我々は、MG の治療に将来応用可能な薬物として FTY720 (2-amino-2-(2-[4-octylphenyl]ethyl)-1,3-propanediol hydrochloride) に注目した。FTY720 は、「冬虫夏草」菌 *Isalia sinclairii* の培養液中に見出された化合物 myriocin (thermozumocidin) の誘導体で、移植臓器に対する拒絶反応を抑制したり、graft-vs-host disease (GVHD) の抑制、自己免疫性 I 型糖尿病発症阻止に対する効果の報告がある [5]。FTY720 はリンパ球の機能には影響を与えず、血液中の T および B cell をリンパ節、パイエル器官に退避させる [6]。また、最近の研究では FTY720 は G-protein と結合したレセプター (おそらくケモカイン・レセプター) を介し作用し、T および B cell のケモカインに対する反応性を変化させていると考えられている [5]。我々は、この全く新しい機序を持つ免疫抑制剤 FTY720 がラット実験的重症筋無力症モデル (EAMG) の治療に有効であるか検討した。

対象および方法

7 から 9 週のマウス・リスラットを用いて、実験を行った。Torpedo californica 電気器官より精製したアセチルコリン受容体 10 μ g を Freund 完全アジュバントに懸濁させ、皮下に投与した。同時に百日咳菌菌体を皮下に投与して EAMG モデルを作成した。FTY720 投与経路は経口で、3 mg/kg/day を投与した。Group A では AChR で感作後 2 週間目より、FTY720 を連日投与した。Group B では感作前日に一度のみ投与した。ラットは毎週、臨

床的重症度を評価するとともに、2 週間ごとに採血をして、抗ラット AChR に対する抗体価を測定した。

結果

1. EAMG 作成後、2 週間してから FTY720 を連日投与した場合
 - 1) EAMG 臨床重症度は、FTY720 投与により統計学的に有意に改善する (Fig 1)。
 - 2) 筋無力症状のため死亡したラットは、投与群では 10 匹中 2 匹、非投与群では 7 匹であった。
 - 3) 血清 AChRab 価は FTY720 投与により有意に低下する (Fig 2)。
2. EAMG 作成前日に、FTY720 を一度だけ投与した場合
 - 1) EAMG 臨床重症度は、FTY720 投与により統計学的に有意に改善する (Fig 3)。
 - 2) 筋無力症状のため死亡したラットは、投与群では 10 匹中 0 匹、非投与群では 3 匹であった。
 - 3) 血清 AChRab 価は FTY720 投与により有意に低下する (Fig 4)。

考察

MG の治療は、これまでの経験の蓄積と研究に基づきなされてきた [2, 3]。胸腺摘出術の有効性については evidence based medicine (EBM) の概念に基づいて再認識されている [7]。胸腺摘出術後のステロイド療法は、全身型 MG の治療方法として有効であり、患者の予後を改善させたが、治療に抵抗性の患者が存在することも経験上、知られている。そのために、azathioprine の併用療法が以前より試みられ、その有用性も示されている [8]。我が国で発見、開発された FK506 (tacrolimus) も、EAMG モデルにおいて有効性が示された [9]。その結果を踏まえ、胸腺摘出術後の難治性 MG 患者を対象に、他施設間で臨床治験が行われ、有効性が確認された [10, 11]。昨年 8 月に、全身型 MG に対する効能追加が厚生省より認可され、FK506 は多くの MG 患者に使われようとしている。FTY720 は、これらの免疫抑制剤とは全く異なった作用機序を有し、主に移植領域で研究が進められてきた。FTY720 は構造が、セラミドに類似することが指摘されている。セラミドやスフィンゴシンは細胞のアポトーシスを誘導することが知られており [12]、FTY720 にも同様な作用があることが予想される。今後、

¹⁾金沢大学保健管理センター

²⁾金沢大学医学部神経内科

スフィンゴ脂質の免疫系における役割を明らかにする
うえで、FTY720は重要な薬剤となると思われる。また、
これまでの免疫抑制剤とは全く違った作用機序を持つ
薬剤として、cyclosporin AやFK506との併用効果が報
告されていることより[13, 14]、今後、他の薬剤との
併用効果、投与量の検討を行えば、より有効で副作用
の少ないMGをはじめとする自己免疫疾患の治療に結び
つく可能性がある。

まとめ

ラットEAMGモデルを使い、新規免疫抑制剤FTY720
の治療効果を検討した。FTY720はラットをAChRで感
作後2週間経ってから連日投与しても、感作前日に一
度だけ投与してもEAMGの臨床重症度の改善と血清抗
体価の上昇抑制を有意にもたすことがわかった。

文 献

- 1) Yoshikawa H, Satoh K, Yasukawa Y, Yamada M. Analysis of immunoglobulin secretion by lymph organs with myasthenia gravis. *Acta Neurol Scand* 103: 53-58, 2001.
- 2) Drachman, DB: Myasthenia gravis. *N Engl J Med* 330: 1797-1810, 1994
- 3) 吉川弘明、佐藤勝明、高守正治 重症筋無力症治療方針 日内会誌 86: 849-855, 1997
- 4) 佐藤 猛、吉野 英、増田真之、高守正治、瀬川昌也 重症筋無力症患者のQOLの多施設調査。厚生省特定疾患免疫性神経疾患調査研究班平成7年度研究報告書 19~21頁, 1996
- 5) Brinkmann V, Pinschewer D, Chiba K, Feng L. FTY720: a novel transplantation drug that modulates lymphocyte traffic rather than activation. *Trends Pharmacol Sci* 21: 49-52, 2000
- 6) Chiba K, Yanagawa Y, Masubuchi Y, Kataoka H, Kawaguchi T, Ohtsuki M, Hoshino Y. FTY720, a novel immunosuppressant, induces sequestration of circulating mature lymphocytes by acceleration of

lymphocyte homing in rats. I. FTY720 selectively decreases the number of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing. *J Immunol* 160: 5037-5044, 1998

- 7) Gronseth GS, Barohn RJ. Practice parameter: thymectomy for autoimmune myasthenia gravis (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 55: 7-15, 2000.

- 8) Palace J, Newsom-Davis J, Lecky B. A randomized double-blind trial of prednisolone alone or with azathioprine in myasthenia gravis. *Myasthenia Gravis Study Group. Neurology* 50: 1778-1783, 1998

- 9) Yoshikawa H, Iwasa K, Satoh K, Takamori M. FK506 prevents induction of rat experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Autoimmun* 10: 11-16, 1997

- 10) 小西哲朗、吉山容正、高守正治、八木皓一、向井榮一郎、祖父江元、荻田典生、吉良潤一、中村龍文、藤井直樹、齋田孝彦 重症筋無力症におけるFK506 (タクロリムス)の臨床治験 *神経免疫学* 8: 156-157

- 11) Yoshikawa H, Mabuchi K, Yasukawa Y, Takamori M, Yamada M. Low-dose tacrolimus for intractable myasthenia gravis. *J Clin Neurosci* 2001 (in press)

- 12) 小堤保則、中村祥子、川寄敏祐 「スフィンゴシン経路」によるアポトーシスの新しい誘導機構: 免疫抑制物質ISP-1の作用機構解明から見えてきたもの *生化学* 68: 444-452, 1996

- 13) Kawaguchi T, Hoshino Y, Rahman F, Amano Y, Higashi H, Kataoka H, Ohtsuki M, Teshima K, Chiba K, Kakefuda T, Suzuki S. FTY720, a novel immunosuppressant possessing unique mechanisms. III. Synergistic prolongation of canine renal allograft survival in combination with cyclosporine A. *Transplant Proc* 28: 1062-1063, 1996

- 14) Xu M, Antoniou EA, Afford SC, Suzuki S, Pirenne J, McMaster P, D'Silva M. Effect of peritransplant FTY720 alone or in combination with posttransplant FK 506 in a rat model of cardiac allotransplantation. *Transplant Proc* 29: 2964-2966; 1997